

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DEL PERÚ

Formación y caracterización de partículas de quitosana y alginato para encapsulamiento de agentes antioxidantes.

Tesis para optar el Título de Licenciatura en Química, que presenta el bachiller:

Diego Andrés Córdova Mariño

ASESOR: Dr. Javier Nakamatsu Kuniyoshi

Lima, julio de 2018



A mi familia

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a Dios, por ser mi motor, mi aliado y mi compañero en los buenos y sobre todo en los malos momentos. Por ser mi refugio y saber que siempre me dará fuerzas para seguir adelante.

También quiero agradecer a mi familia. A mis abuelos, a mis tíos, a mis primos y a mis hermanos, sé que siempre podré contar con ellos. Sobre todo, a mis padres, Fernando Luis Calixto Córdova Estabridis y a Patricia Mariño Lanyi, porqué han sido, son y siempre serán mi más grande pilar en mi vida.

A mi asesor Javier Nakamatsu, por su paciencia, sus enseñanzas y su apoyo en la elaboración de la tesis, en mi formación profesional y personal.

A mis amigos de la confirmación, de mi colegio y de mi universidad por su gran cariño que me han brindado. A Gabriela Russac por sus consejos y su sincera amistad. A los integrantes del Team Nakamatsu por tan buenos momentos compartidos, en especial a Mariela Elgegren que fue pieza fundamental en la elaboración de esta tesis.

A la familia Tafur Chung por ser ese gran soporte en mi vida en los momentos más difíciles que pasé.

A Milka Cajahuanca por su ayuda en los análisis de espectroscopía infrarroja y ultravioleta/visible.

A la Dra. Suyeon Kim por tomarme en cuenta para el proyecto “Desarrollo de propiedades antimicrobianas y antioxidantes de nano partículas biodegradables elaboradas con polímeros naturales” (161-2015-FONDECYT) y al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONCYTEC) por colaborar en el financiamiento.

A las Dras. Betty Galarreta y Yulán Hernández por sus consejos brindados para la elaboración de la tesis. A mis profesores de la sección Química por la formación brindada en estos años.

Resumen

Existen diversos tipos de biopolímeros presentes en la naturaleza que por lo general son biocompatibles y biodegradables como es el caso del alginato de sodio. Algunos incluso presentan propiedades antibacterianas como la quitosana que proviene de la quitina, presente en el exoesqueleto de los crustáceos e insectos. Asimismo, existen productos naturales que, por su composición química, presentan propiedades antioxidantes, por ejemplo, el aceite de oliva o el aceite de sacha inchi. Este último proviene de las semillas del fruto del sacha inchi autóctono de la región amazónica en Sudamérica.

Por otro lado, se sabe que la microencapsulación es un proceso mediante el cual un gas, líquido o material sólido se rodea y queda encerrado por una pared polimérica porosa que contiene una sustancia activa y de esta forma se protege y se aísla del entorno para, posteriormente, liberarlo según sea necesario. El presente trabajo estudió la formación de microcápsulas de quitosana y alginato para encapsular compuestos antioxidantes provenientes de distintos tipos de aceites como el de soya, de oliva y de sacha inchi.

Se formaron emulsiones de cada aceite a analizar y se varió la cantidad de surfactante. Se estudió la estabilidad de las emulsiones por un periodo de un mes. Luego, se caracterizaron por medio de la técnica ATR-FTIR. Posteriormente, se analizó la eficiencia de la encapsulación y su liberación con respecto al tiempo. Por último, se analizó la actividad antioxidante que presentaban los aceites, los polímeros y las microcápsulas por medio de una técnica de transferencia de electrones (ABTS).

TEMA DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN QUIMICA

TÍTULO : Formación y caracterización de partículas de quitosana y alginato para encapsulamiento de agentes antioxidantes.

ÁREA : Materiales

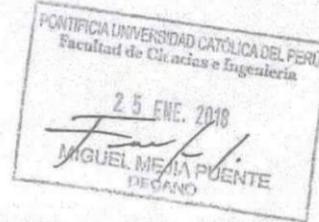
ASESOR : Dra. Javier Nakamatsu

ALUMNO : Diego Andrés Córdova Mariño

CÓDIGO : 20121143.1

FECHA : 15 de diciembre de 2017

NUMERO : # 217



DESCRIPCIÓN Y OBJETIVOS:

En este trabajo se estudiará la formación de nano y micro cápsulas de polímeros naturales (alginato de sodio y quitosana) que sean estables en el tiempo y puedan encapsular agentes antioxidantes para poder liberarlos controladamente en el tiempo.

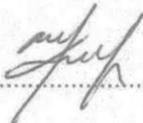
La quitosana se obtiene de la desacetilación de la quitina que es el principal componente de los exoesqueletos de crustáceos e insectos. Es un copolímero lineal soluble solo en medio ácido en donde forma un polielectrolito catiónico y, en consecuencia, precipita en soluciones alcalinas. Es uno de los pocos polímeros catiónicos naturales y por ello ha captado gran interés para su utilización en diversas aplicaciones como material, en farmacia, cosmética, medio ambiente y medicina.

Al igual que la quitosana, el alginato de sodio también es un copolímero lineal y está presente en las algas pardas. En contraposición a la quitosana, posee grupos ácidos en sus unidades repetitivas, los cuales lo convierten en un polielectrolito de carga negativa. Una de sus características más resaltantes es la capacidad de gelar fácilmente, sobretudo con cationes divalente como el Ca^{2+} .

Por otro lado, el sacha inchi es una planta oleosa, que crece en la selva de los Andes sudamericanos. De acuerdo con ciertos estudios, el aceite de sacha inchi contiene el 93% de sus ácidos grasos insaturados, además de presentar otros componentes bioactivos como la albúmina, tocoferoles, carotenos, componentes polifenólicos, fitosteroles, etc. Los tocoferoles son de interés especial por sus propiedades similares a la de la vitamina E, pues poseen una fuerte actividad antioxidante y confieren protección contra la peroxidación de lípidos en tejidos y alimentos biológicos.

El objetivo de este trabajo es emplear los productos de origen natural arriba mencionados para preparar micro y nano partículas estabilizadas con un recubrimientos de alginato de sodio y/o quitosana para encapsular aceite de sacha inchi con ayuda de la técnica de ultrasonido. Luego, las partículas serán caracterizadas y se evaluará su estabilidad a lo largo del tiempo. Por último, se determinará la actividad antioxidante de las micro y nano partículas producidas.

Máximo : 100 páginas

FIRMA DEL ASESOR: 

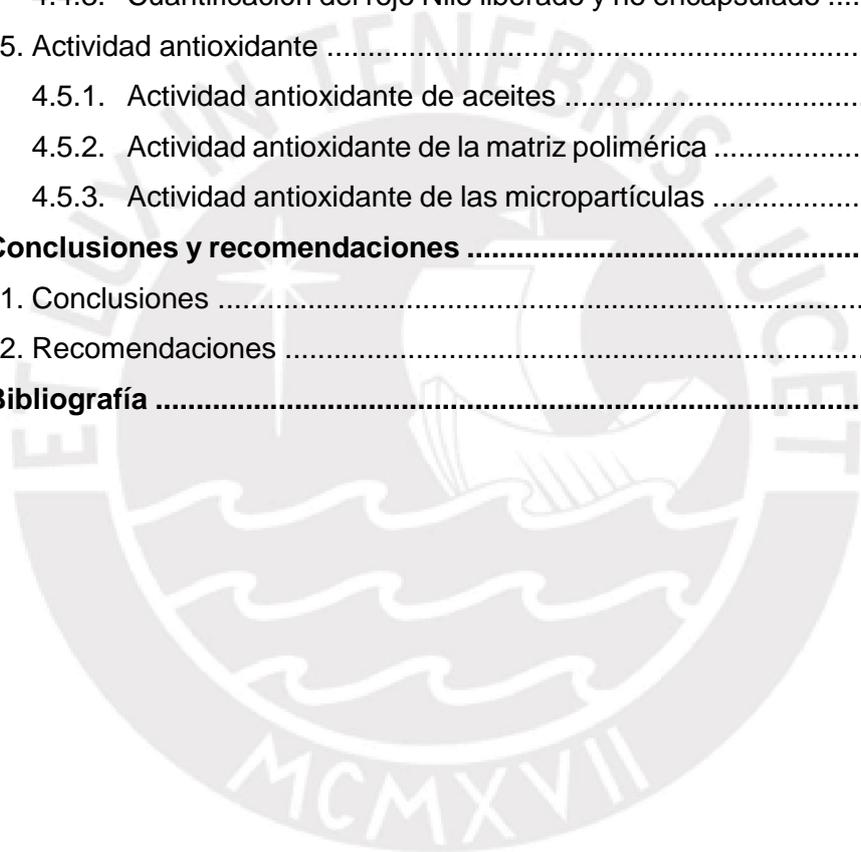
FIRMA DEL COORDINADOR: 



Índice general

Índice de figuras	iv
Índice de tablas	vii
Abreviaturas	vii
1. Marco teórico	1
1.1. Introducción.....	1
1.2. Quitosana	1
1.3. Alginato	3
1.4. Sacha inchi	6
1.5. Aceite de oliva	9
1.6. Microencapsulación	10
1.7. Métodos de microencapsulación	13
1.8. Especies reactivas de oxígeno	16
1.9. Sonoquímica	18
2. Objetivos	20
2.1. Objetivo principal	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. Parte experimental	21
3.1. Reactivos, equipos y materiales	21
3.1.1. Reactivos y materiales	21
3.1.2. Equipos	21
3.2. Metodología	22
3.2.1. Síntesis de micropartículas de alginato con quitosana	22
3.2.2. Estabilidad de las micropartículas	23
3.2.2.1. Separación de fases	23
3.2.2.2. Tamaño de partículas	24
3.2.3. Análisis por medio de la técnica ATR-FTIR	24
3.2.4. Eficiencia de encapsulamiento y liberación del rojo Nilo	24
3.2.4.1. Preparación de las micropartículas con rojo Nilo	24
3.2.4.2. Curva de calibración de rojo Nilo	25
3.2.4.3. Cuantificación del rojo Nilo liberado y no encapsulado	25
3.2.5. Evaluación de la actividad antioxidante	26
3.2.5.1. Actividad antioxidante de aceites	26
3.2.5.2. Actividad antioxidante de la matriz polimérica	26

3.2.5.3. Actividad antioxidante de micropartículas	26
4. Resultados y discusión	28
4.1. Síntesis de micropartículas de alginato con quitosana	28
4.2. Estabilidad de las micropartículas	29
4.2.1. Separación de fases	29
4.2.2. Tamaño de partículas	30
4.3. Análisis por medio de la técnica ATR-FTIR	34
4.4. Eficiencia de encapsulamiento y liberación de rojo Nilo	37
4.4.1. Preparación de las micropartículas con rojo Nilo	37
4.4.2. Curva de calibración de rojo Nilo	39
4.4.3. Cuantificación del rojo Nilo liberado y no encapsulado	39
4.5. Actividad antioxidante	47
4.5.1. Actividad antioxidante de aceites	47
4.5.2. Actividad antioxidante de la matriz polimérica	48
4.5.3. Actividad antioxidante de las micropartículas	49
5. Conclusiones y recomendaciones	55
5.1. Conclusiones	55
5.2. Recomendaciones	55
6. Bibliografía	56

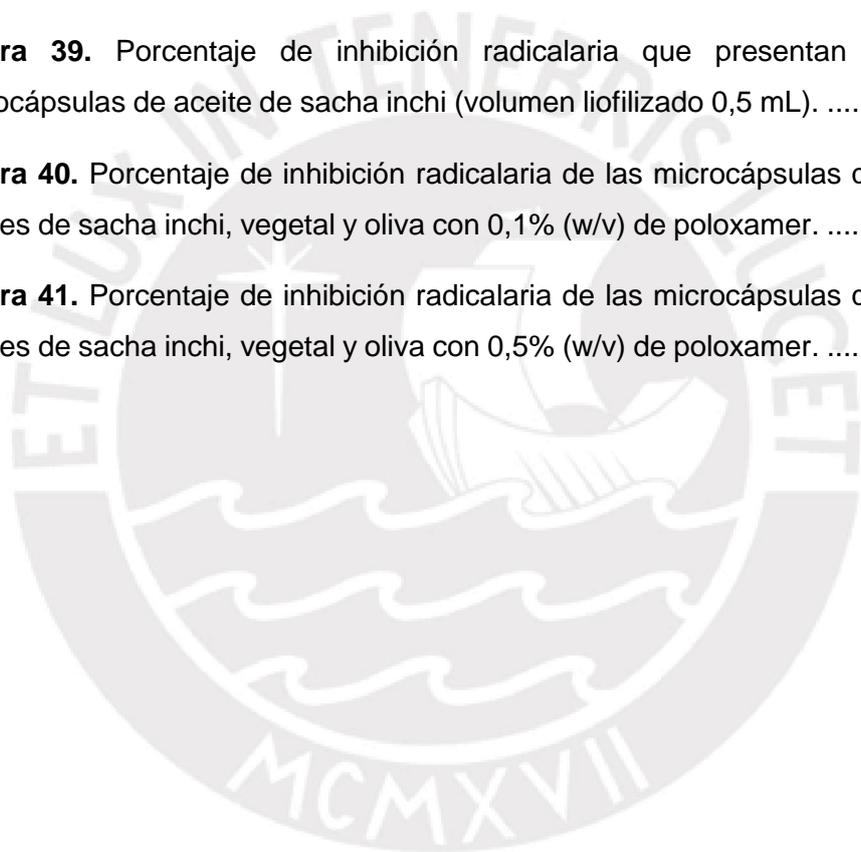


Índice de figuras

Figura 1. Estructura química de la quitosana.	2
Figura 2. Estructura química del: (a) ácido β -D-manurónico (M), (b) ácido α -L-gulurónico (G) y (c) alginato (con secuencia GGMM).	4
Figura 3. Estructura de la “caja de huevos” del gel de alginato en presencia de iones Ca^{2+}	5
Figura 4. El compuesto (a) es el α -linolénico y el compuesto (b) es el α -linoleico. ..	7
Figura 5. Posible mecanismo por el que γ -tocoferol tiene mayor efecto antioxidante y es más activo que α -tocoferol en los sistemas alimentarios.	9
Figura 6. Clasificación de formas de microencapsulación.	12
Figura 7. Esquema del procedimiento de aceite en agua (o/w).	14
Figura 8. Esquema del procedimiento de la emulsión doble (w/o/w).	15
Figura 9. Estructura química del ABTS y el ABTS^{++}	17
Figura 10. Esquema de la preparación de microcápsulas de alginato y quitosana con aceites vegetales.	23
Figura 11. Esquema del lavado de las microcápsulas con rojo Nilo.	25
Figura 12. Estructura del poloxamer.	29
Figura 13. Fotografía de las soluciones que contienen a las microcápsulas de distintas condiciones en la semana 0 y la semana 4 de ser sintetizadas.	30
Figura 14. Formación de las microcápsulas a distinta concentración de surfactante.	31
Figura 15. Imágenes de microscopía óptica de muestras de micropartículas con un aumento de 100x a la semana 0 y semana 4 de ser elaboradas.	33
Figura 16. Espectro FTIR-ATR del alginato de sodio liofilizado.	34
Figura 17. Espectro FTIR-ATR de la quitosana liofilizada.	35
Figura 18. (a) Espectros FTIR-ATR de los aceites de sachá inchi, soya y oliva. (b) Ampliación de los espectros FTIR-ATR de los tres aceites sobrepuestos ($3100\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$).	36

Figura 19. Espectros FTIR-ATR del aceite de sachá inchi, alginato de sodio, quitosana y las microcápsulas de alginato-quitosana con aceite de sachá inchi. ..	37
Figura 20. Estructura del rojo Nilo.....	38
Figura 21. Fluorescencia de las microcápsulas a través con un microscopio óptico con un aumento de 100x con filtro rojo.	38
Figura 22. Curva de calibración del rojo Nilo en etanol a una longitud de onda de 553 nm.	39
Figura 23. Porcentaje liberado por día de rojo Nilo de las microcápsulas de aceite de oliva con 0,1% y 0,5% (w/v) de poloxamer.	40
Figura 24. Porcentaje acumulado por día de rojo Nilo de las microcápsulas de aceite de oliva con 0,1% y 0,5% (w/v) de poloxamer.	40
Figura 25. Emulsión de las microcápsulas de alginato y quitosana con aceite de sachá inchi y rojo Nilo.	41
Figura 26. Porcentaje liberado por día de rojo Nilo de las microcápsulas de aceite de soya con 0,1 y 0,5% (w/v) de poloxamer.	42
Figura 27. Porcentaje acumulado liberado por día de rojo Nilo de las microcápsulas de aceite de soya con 0,1% y 0,5% (w/v) de poloxamer.	42
Figura 28. Porcentaje liberado por día de rojo Nilo de las microcápsulas de aceite de sachá inchi con 0,1% y 0,5% (w/v) de poloxamer.	43
Figura 29. Porcentaje acumulado liberado por día de rojo Nilo de las microcápsulas de aceite de sachá inchi con 0,1% y 0,5% (w/v) de poloxamer.	43
Figura 30. Porcentaje liberado de rojo Nilo por día de las microcápsulas de 0,1% (w/v) de poloxamer de aceite de oliva, de soya y de sachá inchi.	44
Figura 31. Porcentaje liberado acumulado de rojo Nilo por día de las microcápsulas de 0,1% (w/v) de poloxamer de aceite de oliva, de soya y de sachá inchi.	45
Figura 32. Porcentaje liberado de rojo Nilo por día de las microcápsulas de 0,5% (w/v) de poloxamer de aceite de oliva, de soya y de sachá inchi.	46
Figura 33. Porcentaje liberado de rojo Nilo por día de las microcápsulas de 0,5% (w/v) de poloxamer de aceite de oliva, de soya y de sachá inchi.	46
Figura 34. Porcentaje de inhibición radicalaria que presentan los aceites de sachá	

inchi, de soya y de oliva.	48
Figura 35. Porcentaje de inhibición radicalaria que presentan los polisacáridos de alginato y quitosana.	49
Figura 36. Porcentaje de inhibición radicalaria que presentan las distintas microcápsulas de aceite de oliva.	50
Figura 37. Porcentaje de inhibición radicalaria que presentan las distintas microcápsulas de aceite de soya.	50
Figura 38. Porcentaje de inhibición radicalaria que presentan las distintas microcápsulas de aceite de sacha inchi (volumen liofilizado 1 mL).	51
Figura 39. Porcentaje de inhibición radicalaria que presentan las distintas microcápsulas de aceite de sacha inchi (volumen liofilizado 0,5 mL).	52
Figura 40. Porcentaje de inhibición radicalaria de las microcápsulas que contienen aceites de sacha inchi, vegetal y oliva con 0,1% (w/v) de poloxamer.	53
Figura 41. Porcentaje de inhibición radicalaria de las microcápsulas que contienen aceites de sacha inchi, vegetal y oliva con 0,5% (w/v) de poloxamer.	54



Índice de tablas

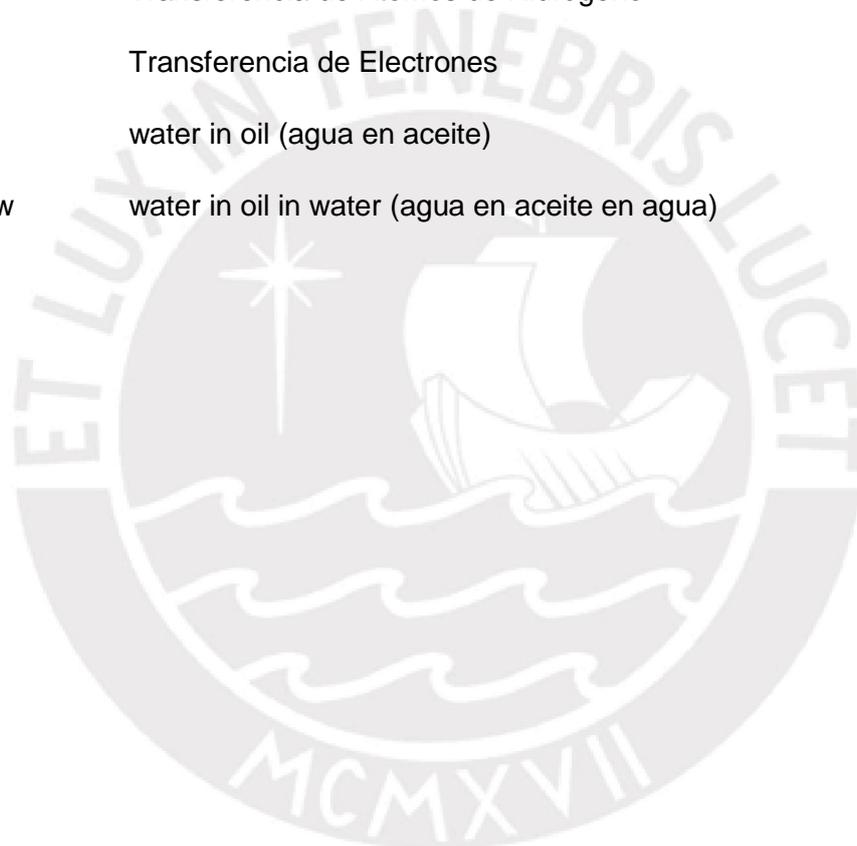
Tabla 1. Contenido de los distintos tipos de tocoferoles presentes en el aceite de sachá inchi.	8
Tabla 2. Contenido de los distintos tipos de antioxidantes presentes en el aceite de oliva medido en 263 muestras obtenidas en plantas industriales.	10
Tabla 3. Muestras de las micropartículas de los polímeros analizados.	23



Abreviaturas

A_{muestra}	Absorbancia de la muestra a analizar
A_{control}	Absorbancia de la muestra control
ABTS	ácido [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)]
DHA	ácido docosahexaenoico
EPA	ácido eicosapentaenoico
cm	centímetros
M	D-manurónico
ERO	especie reactiva de oxígeno
FT-IR	espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
UV-Vis	espectroscopía ultravioleta/visible
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	Generally Recognized As Safe
°C	Grados centígrados
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
IPD	índice de polidispersión
kg	kilogramo
kHz	kilohertz
G	L-gulurónico
MHz	megahertz
m.s.n.m.	metros sobre el nivel del mar
μm	micrómetros
mg	miligramo
mL	mililitros
mV	milivoltios

min	minutos
nm	nanómetros
o/w	oil in water (aceite en agua)
v/v	relación volumen
w/v	relación peso / volumen
ATR	Attenuated Total Reflectance
rpm	revoluciones por minuto
TAH	Transferencia de Átomos de Hidrógeno
TE	Transferencia de Electrones
w/o	water in oil (agua en aceite)
w/o/w	water in oil in water (agua en aceite en agua)



1. Marco Teórico

1.1. Introducción

La microencapsulación es una técnica que ha sido desarrollada en los últimos 60 años y consiste en empaquetar microscópicamente material sólido, líquido o gaseoso. Las microcápsulas se definen como un sistema microvesicular, que posee un núcleo donde se encuentra el fármaco, material o agente activo, como por ejemplo aceites vegetales con alto contenido de agentes antioxidantes, y que está rodeado generalmente por una o varias paredes poliméricas como el alginato y la quitosana¹. Las microcápsulas son buenos vehículos del agente activo, permiten una liberación controlada, son biocompatibles y protegen al fármaco ante factores de degradación como el pH, la luz o agentes oxidantes².

1.2. Quitosana

La quitina es el segundo polisacárido más abundante del planeta, después de la celulosa, y es el principal componente de los exoesqueletos de crustáceos e insectos^{3,4,5}. Cuando la quitina posee un grado de desacetilación mayor al 50% se le conoce como quitosana⁶. Las aplicaciones de la quitina, a diferencia de la quitosana, son muy limitadas debido a que su estructura se parece mucho a la de la celulosa pero es químicamente inerte⁷, es decir, no reacciona con facilidad. En la preparación de la quitosana, se desnaturalizan las proteínas de las cáscaras molidas de los crustáceos y se desmineralizan mediante tratamiento secuencial con álcali y ácido⁶; después la quitina extraída se desacetila a quitosana mediante hidrólisis alcalina a alta temperatura^{4,6,8}. El proceso de desacetilación involucra quitar el grupo acetilo de la cadena de la quitina y así formar un grupo amino⁵. La producción de quitosana a partir de estas fuentes es económica y fácil⁶.

La quitosana es un copolímero lineal natural constituido por la repetición de dos monómeros: la D-glucosamina y la N-acetil-D-glucosamina^{3,4,5} (figura 1). Posee una estructura similar a la celulosa ya que ambos están compuestos de monosacáridos lineales unidos mediante enlaces β (1 \rightarrow 4). Sin embargo, la diferencia principal de la quitosana con respecto a la celulosa es que está compuesto de 2-amino-2-desoxi- β -D-glucano con enlaces glucosídicos^{6,7}.

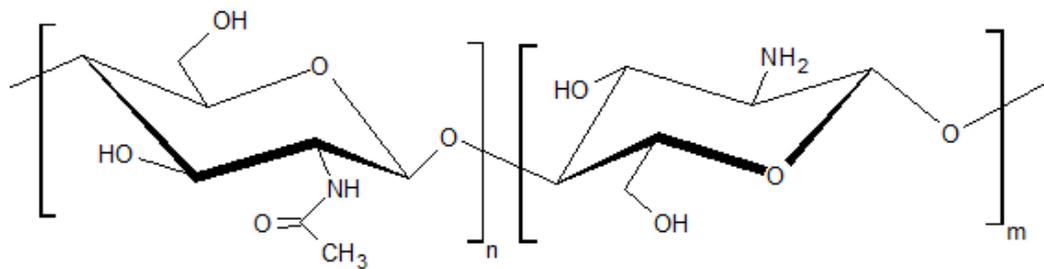


Figura 1. Estructura química de la quitosana.

Existen tres factores que caracterizan a la quitosana comercial: su calidad, sus propiedades intrínsecas (peso molecular, viscosidad, grado de desacetilación) y su forma física⁵. En el mercado se vende dependiendo de su grado de desacetilación, peso molecular, o grado de pureza. No obstante, el grado de desacetilación es uno de los factores más importantes debido a que este determina la concentración de grupos amino libres. Por lo tanto, las condiciones de reacción que se utilicen para su obtención son de suma importancia⁵. La quitosana no es soluble en solventes orgánicos ni en agua pero, si el grado de desacetilación es mayor o igual que el 50%, se vuelve soluble en medio ácido⁴. Su solubilidad se debe a la protonación del grupo amino del C-2 de la D-glucosamina^{4,8}, por lo que el polímero se convierte en un polielectrolito en medio ácido⁸. Asimismo, la carga positiva que posee permite que se una a moléculas con carga negativa³, por lo que, precipita en soluciones alcalinas con polianiones y forma geles de bajo pH⁴. La quitosana es el único polímero catiónico natural y se han encontrado diversas aplicaciones por sus características únicas como, por ejemplo, floculante para la recuperación de proteínas.

El grado de desacetilación tiene un gran impacto en sus propiedades físico-químicas y su actividad inmunológica, entre otras^{3,4,5}, debido a la cantidad de aminas primarias que posee⁷. Por la biodegradabilidad, la baja toxicidad y la buena biocompatibilidad de este polímero, este es ampliamente utilizado en la industria alimentaria como aditivo⁶. Por la misma razón, este polímero es ideal para la formulación biomédica y farmacéutica^{3,4,5}. Por otro lado, mejora la cicatrización de heridas, posee propiedades antimicrobianas y puede reducir los niveles de colesterol³ ya que atrapa a los lípidos en el intestino debido a su naturaleza catiónica⁶, se disuelve en el estómago y luego forma un compuesto quitosano-grasa. Posteriormente, gelifica en el intestino delgado y de esta forma, la grasa se excreta por medio de las heces⁹. Por otro lado, al ser soluble en medios acuosos es empleado para la fabricación de geles, films, fibras, etc⁸. Por ejemplo, dado que la quitosana forma películas, se ha sugerido como un

biopolímero para el desarrollo de lentes de contacto (lentes de contacto blandos y duros). De la misma manera, se ha empleado para la fabricación de lentes de vendaje ocular como dispositivos de protección para los ojos dañados. A su vez, las membranas de quitosana se han encontrado útiles como membranas artificiales de riñón, debido a su permeabilidad y alta resistencia a la tracción⁴.

Como ya se mencionó, la quitosana presenta muchas aplicaciones que están relacionadas al peso molecular y grado de desacetilación. Una ventaja de las micropartículas de quitosana es su capacidad para atrapar y controlar la liberación de agentes activos^{4,7}. Asimismo, evita el uso de disolventes orgánicos peligrosos mientras se fabrican partículas, ya que, como se mencionó antes, es soluble en solución acuosa ácida. Su naturaleza catiónica permite la reticulación iónica con aniones multivalentes y tiene carácter mucoadhesivo, lo cual aumenta el tiempo residual en el sitio de absorción⁷.

1.3. Alginato de sodio

Al igual que la quitina, existen otros polisacáridos que provienen de distintas fuentes naturales como, por ejemplo, las algas. El alginato comercial es extraído principalmente de tres especies de algas pardas: *Laminaria hyperborean*, *Ascophyllum nodosum* y *Macrocystis pyrifera*, que contienen 40% de alginato en peso. También puede ser encontrado en *Azotobacter vinelandii* y en algunas especies de *Pseudomonas*. Por su naturaleza, diversos cationes como el Ba²⁺, Sr²⁺, Mg²⁺ y Na⁺ se encuentran unidos con el alginato^{6,10}.

Con respecto a su composición química, es un copolímero lineal que tiene unidades ácidas, las cuales son el D-manurónico (M) y L-gulurónico (G), unidas por enlaces glucosídicos 1→4, y están dispuestos de manera homo y hetero polimérica (figura 2). El alginato no tiene una estructura con secuencias regulares por lo que para conocer sus enlaces químicos no basta con conocer los monómeros que lo conforman, se necesita conocer también su secuencia^{6,11}. Debido a las formas particulares de los monómeros y sus modos de unión en el polímero, las geometrías de las regiones del bloque G, las regiones del bloque M y las regiones alternadas son sustancialmente diferentes. Existen diversas formas del enlace glicosídico según cómo sea la secuencia de unión entre monómeros y esto genera 3 formas estructurales: el bloque GG, con una estructura abultada o capsular, el bloque MM, con una estructura tipo

cinta plana, y el bloque MG, con una estructura tipo escalera. El enlace glicosídico en los bloques MM y MG se forman entre los carbonos ecuatoriales **C-1** y **C-4**, mientras que en los bloques GG y GM se forman entre los carbonos axiales **C-1** y **C-4**¹².

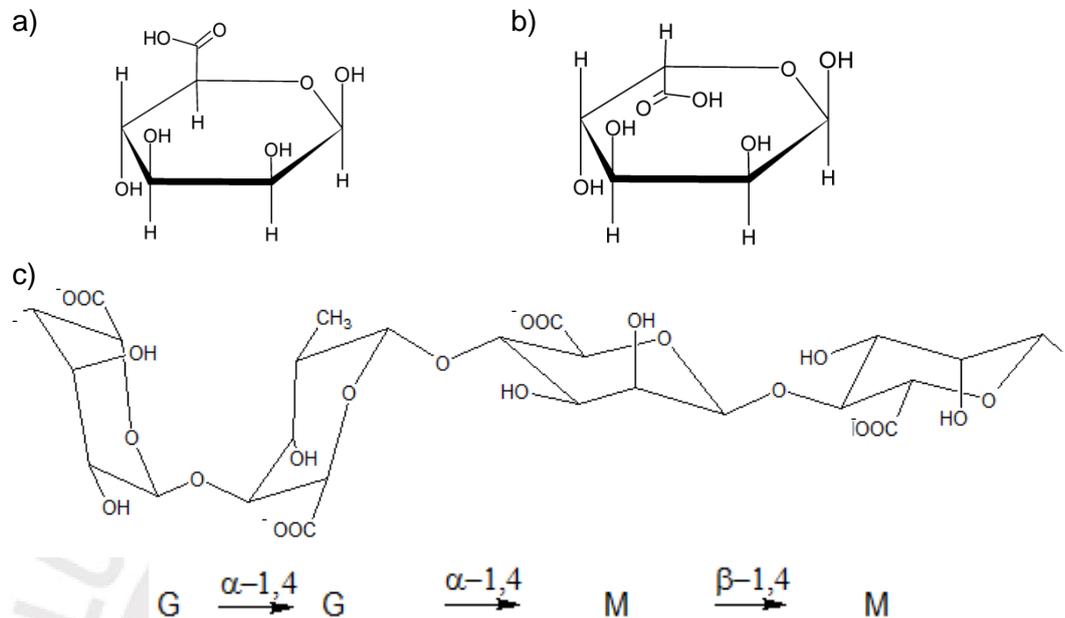


Figura 2. Estructura química del: (a) ácido β -D-manurónico (M), (b) ácido α -L-gulurónico (G) y (c) alginato (con secuencia GGMM).

Los alginatos tienen una gran afinidad por cationes multivalentes, principalmente debido al efecto quelato de los bloques poligulurónicos, conduce a la formación de los geles por entrecruzamiento iónico. Es así como el ion Ca^{2+} ayuda a la gelificación, al igual que los iones Sr^{2+} y Ba^{2+} , mientras que, los cationes monovalentes y el Mg^{2+} no funcionan como agentes gelificadores^{6,10,13}. Existen otros cationes divalentes, como el Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} y Mn^{2+} , que también pueden ayudar al entrecruzamiento de las cadenas del alginato; sin embargo, sus usos son limitados por el aumento de la toxicidad¹⁰. La gelificación del alginato se consigue principalmente mediante el intercambio de iones sodio del alginato de sodio por los cationes divalentes: al aumentar los grupos gulurónicos se obtiene una conformación ideal que puede llegar a la estructura característica de la “caja de huevos” y posteriormente gelificar^{6,10} (Figura 3). Cada cadena de alginato puede dimerizar para formar uniones con múltiples otras cadenas formándose como resultado redes de gel en lugar de precipitados insolubles¹⁰. Esto se debe a que los cationes divalentes se unen a los bloques de α -L-gulurónico¹¹. Se puede decir que la reactividad del calcio

frente al alginato es el resultado de la asociación dimérica inducida por este ion en las regiones del bloque G. Estos geles son sólidos en cuanto retienen su forma y resistencia al esfuerzo mecánico, a pesar de tener una composición del 99% en peso de agua. Dependiendo de la cantidad de calcio presente en el sistema, estas asociaciones entre cadenas pueden ser temporales o permanentes. Con niveles bajos de calcio (0,003 M de Ca^{2+}), se obtienen asociaciones temporales, lo cual da lugar a soluciones tixotrópicas altamente viscosas. A mayores niveles de calcio, la precipitación o gelificación de las cadenas es permanente (Figura 3).

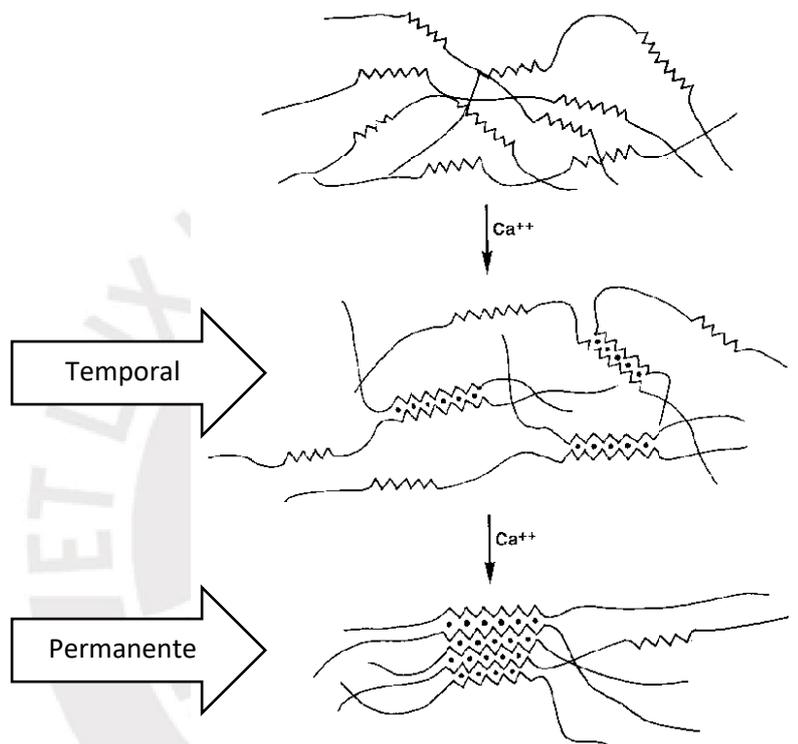


Figura 3. Estructura de la “caja de huevos” del gel de alginato en presencia de iones Ca^{2+} ¹².

Numerosos estudios han demostrado que la estructura química, el tamaño molecular, la cinética de formación de gel y el catión empleado, tienen un impacto significativo en varias de sus propiedades funcionales. Así, estos factores tienen un gran impacto en la porosidad, el grado de hinchamiento, la estabilidad, la biodegradabilidad y la biocompatibilidad. Es por ello que el alginato está siendo utilizado como fármaco por sus propiedades de biocompatibilidad y la baja respuesta inmune que induce⁶. Además, el alginato se usa en la industria alimentaria como espesante, emulsionante o estabilizador. Los alginatos están clasificados en el grupo que son generalmente

seguros (GRAS) por la FDA (*Food and Drug Administration*). La administración oral del alginato no induce mucha respuesta inmunitaria a diferencia del administrado por vía intravenosa, y se ha reportado que el alginato es biodegradable y no es tóxico cuando se administra oralmente. Aunque la biocompatibilidad del alginato ha sido ampliamente investigada, existe un desacuerdo en la literatura. En el caso de la administración intravenosa, existe reportes que indican que la mayoría de los alginatos comerciales inducen la reacción de cuerpo extraño y fibrosis¹⁴, mientras que otros informes muestran poca o ninguna respuesta inmune alrededor de los implantes de alginato¹⁵. No obstante, es posible que la respuesta inmunogénica a las inyecciones intravenosas se habría debido a contaminantes tóxicos en alginatos comerciales¹⁰.

1.4. Sacha inchi

La región amazónica es una de las áreas más importantes del mundo en términos de biodiversidad debido a que alberga una gran variedad de especies nativas de plantas con un prometedor valor económico¹⁶; sin embargo, la mayoría son poco conocidas y no se han estudiado mucho^{16,17}. El sacha inchi, también llamado el maní de los Incas, ha sido conocido por los nativos desde hace miles de años. Su presencia en restos de vasos funerarios indica que probablemente el sacha inchi ya era cultivado por las culturas preincaicas y luego por los mismos Incas^{17,18}. Es una planta oleosa, que pertenece a la familia de las *Euphorbiaceae* y crece en la selva de los Andes, en Sudamérica¹⁸. Lamentablemente, durante un tiempo estuvo en peligro de extinción, pero gracias a diversas universidades e institutos se pudo recuperar este cultivo¹⁷.

Esta planta crece en climas cálidos y a alturas no superiores a 1500 m.s.n.m¹⁶. La planta sacha inchi produce frutos verdes en forma de estrella que contienen semillas comestibles de color marrón oscuro, ligeramente más grandes en el centro y aplastadas hacia los bordes, con un diámetro inferior a 2 cm^{18,19}. Los nativos amazónicos obtienen harina y aceite del sacha inchi, los cuales sirven para la elaboración de diferentes comidas y bebidas típicas^{16,17}. También es utilizado por los pobladores para combatir problemas reumáticos y dolores musculares¹⁷. Según la bibliografía, las semillas son ricas en ácidos grasos (entre 35% y 60%) y proteínas (27%). De acuerdo a ciertos estudios, el 93% de los ácidos grasos que componen el aceite de sacha inchi son insaturados^{16,17,18,19}. En su composición predominan dos tipos de ácidos grasos esenciales: C18:3 ω 3 (α -Ln; cis, cis, cis-9,12,15-ácido

octadecatrienoico; α -linolénico) y C18:2 ω 6 (L; cis,cis-9,12-ácido octadecadienoico; α -linoleico) que están presentes en un 47% y 37%, respectivamente (Figura 4)^{16,18,19}.

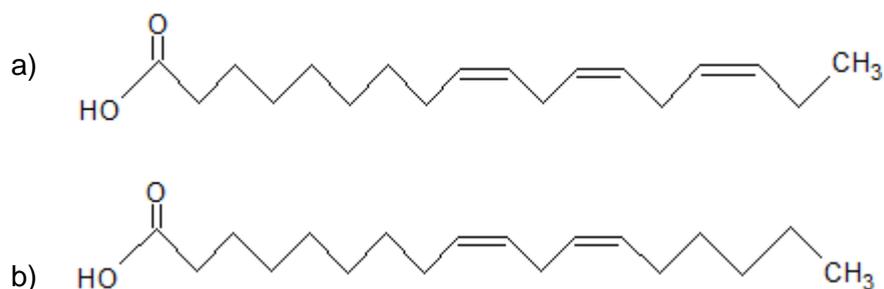


Figura 4. El compuesto (a) es el α -linolénico y el compuesto (b) es el α -linoleico.

Últimamente se ha visto que los ácidos grasos poliinsaturados ω 3, los cuales están presentes en los lípidos de los peces y en algunos aceites vegetales, juegan un rol importante para la salud y la nutrición¹⁷. Estos ácidos grasos esenciales son intermediarios en la biosíntesis de varios compuestos del cuerpo humano, tales como la prostaglandina E1 y sus derivados. Diversos estudios llegan a la conclusión de que el ω 6 y, especialmente, el ω 3 presentan beneficios para la salud humana y previenen diversas enfermedades crónicas como cáncer, hipertensión, problemas coronarios^{16,18}, razón por la cual se utilizan mucho en suplementos alimentarios. Por esta razón, la fabricación de alimentos suplementados con ω 3, tales como fórmulas infantiles y productos de nutrición clínica y aceites ricos de este ha aumentado considerablemente. Asimismo, el ácido linoleico, ω 6, es un precursor del ácido araquidónico, que conduce a la producción de compuestos esenciales tales como prostaglandinas, esenciales para la función inmune y la agregación plaquetaria. Sin embargo, un exceso de formación de ácido araquidónico podría conducir a un aumento anormal de mediadores proinflamatorios, traduciéndose en el desarrollo de un proceso inflamatorio. Por otro lado, los leucotrienos, que se originan de los ácidos grasos ω 3, muestran un efecto proinflamatorio mucho menor¹⁷. Asimismo, si el consumo de ω 6 en la dieta es excesivo, puede producirse una inhibición significativa de la síntesis de EPA y DHA. Es por ello que para una dieta balanceada debe de existir una proporción concreta entre los ácidos grasos ω 3 y ω 6¹⁸.

Otro aspecto a destacar son los aminoácidos presentes en la composición del sachá inchi que muestra niveles relativamente altos de cisteína, tirosina, treonina y triptófano^{16,18}. El aceite también presenta otros componentes bioactivos como la

albúmina, que representa el 31% del total de proteínas de la semilla¹⁸. Entre otros componentes del aceite se encuentran los fitoesteroles (conocidos porque reducen el colesterol en la sangre), los carotenos, los compuestos polifenólicos (responsables de funciones biológicas críticas¹⁶) y los tocoferoles^{16,14}.

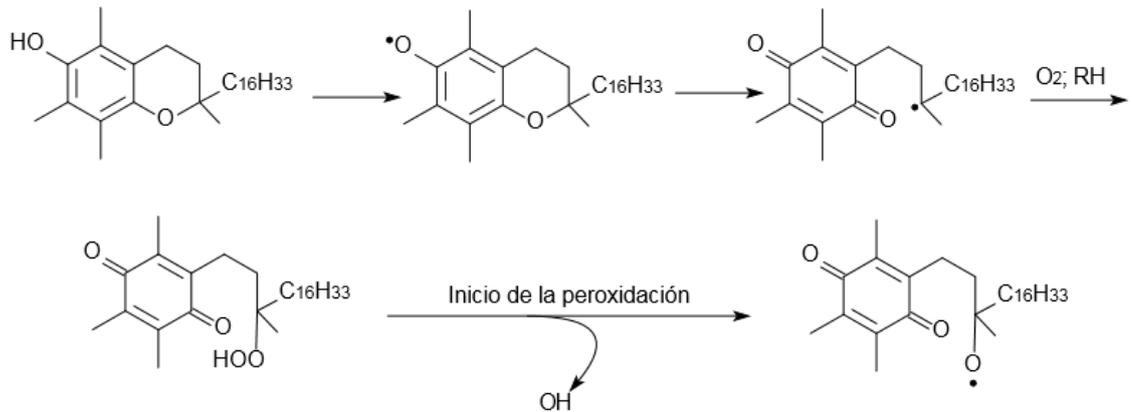
Con respecto a los compuestos fenólicos, Liu y colaboradores²⁰ emplearon la técnica de Folin-Ciocalteu y determinaron que la concentración de fenoles en sachá inchi fue de 65,8 mg/kg mientras que Fanali y colaboradores¹⁸ por medio de la misma técnica reportaron valores de 62 mg/kg.

Los tocoferoles tienen las propiedades de la vitamina E, poseen una alta actividad antioxidante y confieren protección contra la peroxidación de lípidos en tejidos biológicos y alimentos. Los aceites que poseen un alto índice de tocoferoles presentan una alta estabilidad oxidativa. Los tocoferoles se dividen en varios tipos (α -tocoferol, γ -tocoferol, δ -tocoferol, β -tocoferol). El que se encuentra en mayor proporción en el aceite de sachá inchi es el γ -tocoferol mientras que el α -tocoferol predomina en aceites como el de girasol y el de oliva. Se sabe que el γ -tocoferol es más eficiente que el α -tocoferol para inhibir la formación de derivados de hidroxilo y cetodieno, debido a que el α -tocoferol posee un grupo metilo más que el γ -tocoferol (Figura 5)^{16,18,20,21}. Liu y colaboradores²⁰, por medio de la técnica HPLC/UV-Vis, obtuvieron la cantidad total de tocoferoles en aceite de sachá inchi que fue de 1618,7 mg/kg mientras que Fanali¹⁸ y colaboradores reportaron por medio de la técnica HPLC valores de 2130 mg/kg (Tabla 1). Por otra parte Chirinos¹⁶ y colaboradores con la técnica de HPLC reportaron valores entre 780 y 1370 mg/kg. El contenido total de los tocoferoles depende del lugar del cultivo, del clima y la variedad, entre otros. Sin embargo, en todos los estudios el contenido de α -tocoferol es mínimo y en algunos casos indetectable mientras que se obtiene altos niveles de γ -tocoferol.

Tabla 1. Contenido de los distintos tipos de tocoferoles presentes en el aceite de sachá inchi¹⁸.

Tocoferoles en el aceite de sachá inchi	Cantidad (mg / kg)
α -tocoferol	4
γ -tocoferol	1257
δ -tocoferol	869

α -tocoferol



γ -tocoferol

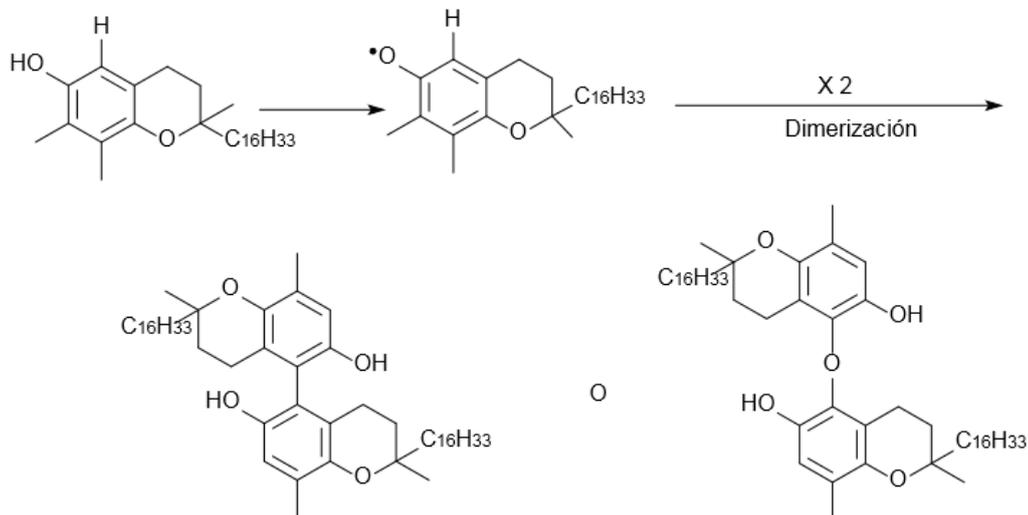


Figura 5. Posible mecanismo por el que γ -tocoferol tiene mayor efecto antioxidante y es más activo que α -tocoferol en los sistemas alimentarios²².

1.5. Aceite de oliva

El aceite de oliva se obtiene mediante una extracción física del fruto de la planta *Olea europae* y es uno de los pocos aceites que se consumen sin ningún tratamiento químico^{23,24}. Está compuesto principalmente por ácidos grasos monoinsaturados ácido oleico (70-80%) y también posee ciertos compuestos insaponificables. Diversos estudios han concluido que una dieta rica en aceite de oliva ayuda a disminuir el riesgo de contraer arterosclerosis, distintos tipos de cánceres y enfermedades coronarias. Los beneficios no solo se atribuyen a la alta relación que

existe entre los ácidos grasos insaturados con respecto a los saturados presentes en el aceite de oliva, sino por las propiedades antioxidantes propias de los carotenos y compuestos fenólicos que contiene. Poseen compuestos fenólicos simples como ácido cafeico y compuestos fenólicos más complejos como lignanos (1-acetoxi pinosresinol y pinosresinol)²⁴.

Los datos acerca de los antioxidantes que se obtienen de los aceites de oliva de alta calidad, no siempre están de acuerdo debido a que no hay un protocolo estandarizado de cuantificación. No obstante, existen distintos métodos que ayudan a identificar los compuestos antioxidantes como el HPLC y técnicas colorimétricas como la de Folin-Ciocalteu, entre otros. El contenido en carotenos y tocoferoles depende del lugar del cultivo, del clima, de la variedad de olivos y los niveles de maduración del fruto^{24,25}. Servili y colaboradores utilizaron el método HPLC para obtener los siguientes resultados de los compuestos antioxidantes presentes en el aceite de oliva (Tabla 2)²⁵.

Tabla 2. Contenido de los distintos tipos de antioxidantes presentes en el aceite de oliva medido en 263 muestras obtenidas en plantas industriales²⁵.

Compuestos del aceite de oliva	Promedio (mg / kg)	Quintil inferior (mg / kg)	Quintil superior (mg / kg)
<i>α-tocoferol</i>	150,7	102,0	241,5
<i>(+)-1- Acetil Pinosresinol</i>	24,6	12,9	30,8
<i>(+)-Pinosresinol</i>	14,4	8,8	47,7
<i>3,4-DHPEA</i>	3,2	1,4	6,9
<i>p-HPEA</i>	6,9	4,2	11,9
<i>3,4-DHPEA-EDA</i>	308,1	218,2	430,6
<i>p-HPEA-EDA</i>	85,4	40,4	144,2
<i>3,4-DHPEA-EA</i>	136,6	79,4	229,1

1.6. Microencapsulación

La microencapsulación es un proceso mediante el cual un gas, líquido o material sólido es rodeado y encerrado por una pared polimérica porosa donde se protege y se aísla del entorno para, posteriormente, liberarlo según sea necesario^{1,2,26-27}. El tamaño de estas micropartículas va desde unos cuantos micrómetros hasta los 200 µm aproximadamente, aunque ciertos autores sostienen que su tamaño puede

ir hasta los 5000 μm ²⁸.

Por lo tanto, el principal objetivo de la microencapsulación es “modificar” ciertas propiedades físicas de los líquidos o sólidos para protegerlos o hacerlos más manejables. Por ejemplo, se pueden convertir sustancias líquidas (aceites) en productos sólidos (cápsulas de aceites) y se protegen las sustancias que se degradan fácilmente con una superficie protectora. También, permite mezclar y almacenar sustancias que reaccionan o son incompatibles entre sí, incrementar la viabilidad de diversos compuestos bioactivos²⁷, enmascarar el mal sabor y olor, y, por último, reducir la volatilidad en algunas sustancias^{1,2,28}.

Las microcápsulas poseen dos componentes, el núcleo y el material de recubrimiento^{1,2}. El primero está constituido por partículas sólidas o pequeñas gotas líquidas²⁹. Es importante el tamaño y la forma de estas partículas y, en general, se busca que sean regulares (esférica, ovalar, tubular, etc.)^{28,29}. Si el núcleo va a ser líquido es necesario llevar a cabo operaciones de dispersión o emulsificación. Asimismo, el material de recubrimiento es de suma importancia debido a que proporciona las características del producto final, como la flexibilidad, la resistencia y la permeabilidad. Por lo general, se busca que la cubierta sea muy delgada, no obstante, esto depende de las aplicaciones en las cuales se emplearán las microcápsulas^{27,28}.

Por lo general se han utilizado polímeros naturales, semisintéticos o sintéticos como material de recubrimiento en la preparación de las microcápsulas. Los polímeros naturales presentan una baja toxicidad, son biodegradables y en su mayoría biocompatibles^{27,30}. Actualmente, dos de los polímeros naturales más empleados son el alginato y la quitosana ya que poseen un bajo costo, buena biocompatibilidad y buena capacidad de membrana, es decir, de formar el material de recubrimiento. La principal desventaja de los polímeros naturales es su compleja estructura y las variaciones entre lotes, lo cual dificulta la reproducibilidad de las micropartículas preparadas. Por otro lado, los polímeros sintéticos pueden tener distinta composición, lo que genera diferentes propiedades. Esta ventaja permite que al sintetizar las microcápsulas se optimicen ciertas propiedades específicas, tales como la resistencia mecánica o la difusión del componente activo a través de las capas de su recubrimiento. El principal problema de emplear polímeros sintéticos es que en su mayoría no son biocompatibles, salvo algunas excepciones como el óxido de polietileno y el ácido láctico-co-glicólico³¹. Adicionalmente, muchos polímeros semisintéticos son utilizados en la microencapsulación y son principalmente

derivados de la celulosa, por ejemplo, la carboximetil celulosa, la carboximetil celulosa sódica, el sulfato de celulosa y la etilcelulosa.

La forma esférica de microcápsulas es la más común en los sistemas de liberación controlada de fármacos debido a su preparación. Se clasifican de cuatro formas: matriz, pared simple, pared múltiple y núcleo múltiple³² (figura 6).

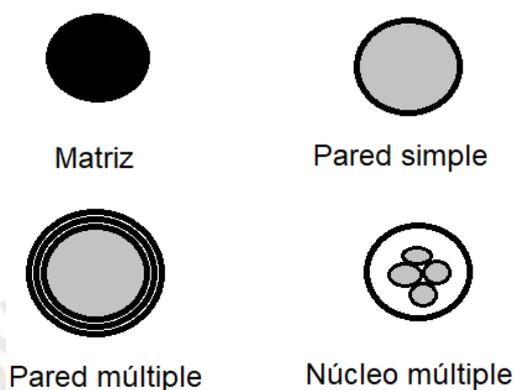


Figura 6. Clasificación de las formas de microencapsulación³².

La administración de los fármacos microencapsulados puede ser por medio de vía oral, parenteral (intramuscular, intravenosa, etc.), nasal (intranasal) y oftálmica, y dependen, justamente, de las propiedades de los fármacos y del propósito medicinal o el requerimiento que se desee. Por ejemplo, la calcitonina de salmón, la cual tiene un rol fisiológico en la homeostasis de los niveles de calcio y es un potente inhibidor de la resección ósea osteoclástica, se puede microencapsular y administrar por vía nasal o intramuscular y así mejorar su efectividad. Otro ejemplo son las micropartículas cargadas con fármacos anticancerígenos (por ejemplo, 5-fluorouracilo) que pueden inyectarse en la pared de la cavidad tras la resección del tumor³³.

Las aplicaciones de las microcápsulas son muy variadas en diversos ámbitos^{28,29}. Se están empleando, para la agricultura, en la fabricación de insecticidas, fungicidas e incluso en fertilizantes. A su vez, la industria alimentaria utiliza esta técnica para mantener la calidad en sus productos ya que protegen ciertos ácidos grasos, aromatizantes o saborizantes para que no se degraden tan fácilmente²⁸. En la industria de perfumería y cosmética^{28,29}, su uso es cada vez más frecuente, ya que encapsulan sustancias odoríferas para luego liberar el perfume cuando, por ejemplo, se produzca una fuerza de rozamiento suave²⁸. En la biotecnología y en la industria farmacéutica la microencapsulación protege los fármacos de los ácidos gástricos

presentes, da una mayor estabilidad, reduce los efectos secundarios y la cantidad de dosificación y optimiza la liberación sostenida y la actividad farmacológica³⁰.

1.7. Métodos de microencapsulación

Los métodos más comunes para la microencapsulación son por extrusión^{27,29}, secado por atomización^{1,2,27,29}, microprecipitación^{29,30} emulsión-solvente², y coacervación^{2,29}. El método por extrusión es una técnica de múltiples etapas. Su primera etapa es la de granulación, en donde se mezclan un agente bioactivo, estabilizadores y otros ingredientes con un aglutinante líquido (por lo general agua), para formar una masa húmeda o pasta. Luego se lleva a cabo la extrusión, con tornillo o arietes, de la masa húmeda a través de un troquel que permite formar hebras cilíndricas de longitud y diámetro uniformes. Los filamentos formados se vuelven esferas al cortarlos en longitudes iguales. Para concluir el procedimiento, se procede a recoger las esferas húmedas para secarlas. Esta técnica se basa en la capacidad del material encapsulante de solidificar al contacto con los líquidos para formar así una matriz que atrapa fácilmente al contenido del núcleo. No obstante, su mayor dificultad es utilizarlo en una producción a gran escala²⁹.

El secado por atomización es una técnica muy utilizada en la industria alimentaria^{27,29}. Se tiene una suspensión líquida o pasta de baja viscosidad que contiene los componentes de la matriz de las micropartículas y diversos compuestos activos. Este procedimiento implica la dispersión del material del núcleo en una solución que contiene al polímero que servirá como encapsulante. Luego, la mezcla es atomizada en la cámara de secado, donde se evaporará el solvente y, así, se formarán las microcápsulas sólidas. Las ventajas de esta técnica son que las propiedades físicas del producto, tales como el tamaño, forma de partículas y contenido de humedad, se pueden controlar a través de la configuración del equipo empleado y la manipulación de las variables del proceso (flujo de entrada y temperatura del secado)²⁷. Es así como se pueden obtener micropartículas pequeñas aunque su distribución es muy amplia, (alto IPD)^{2,29}.

El método de microprecipitación, también conocido como deposición interfacial, requiere de dos fases: la orgánica y la acuosa. En la primera se disuelve el polímero de recubrimiento, la sustancia activa, el aceite y el tensioactivo lipofílico. La otra fase no debe disolver al compuesto polimérico de encapsulamiento y puede contener

algún surfactante natural u orgánico. En este método, las microcápsulas se obtienen como una suspensión coloidal formada cuando la fase orgánica se agrega lentamente a la fase acuosa en agitación constante².

El método de emulsión-solvente es muy utilizado para la preparación de fármacos. Existen distintos tipos de emulsión como o/w y w/o/w ("w" es la fase acuosa y "o" es la fase orgánica), entre otros. Si el fármaco posee una solubilidad muy baja o es insoluble en agua, el método aceite en agua es el más recomendado (o/w) (figura 7). Es el más simple y el resto son derivados de este método. La formación de la emulsión o/w consiste en cuatro etapas principales. En primer lugar, se disuelve el fármaco hidrofóbico en un disolvente orgánico que contiene al polímero; sin embargo, el polímero también se podría disolver en la fase acuosa, dependiendo de su polaridad. Después, se crea una emulsión mediante el empleo de un sonicador o de agitación. Para este tipo específico de emulsión a la fase orgánica se la conoce como la fase dispersa y la acuosa como la fase continua. A continuación, se evapora el disolvente orgánico, lo que transforma las gotas de la fase dispersa en partículas sólidas. Estas se recolectan por medio de una filtración o centrifugación, se lavan para eliminar el surfactante residual, y por último, se recuperan las microesferas y se secan^{29,30}.

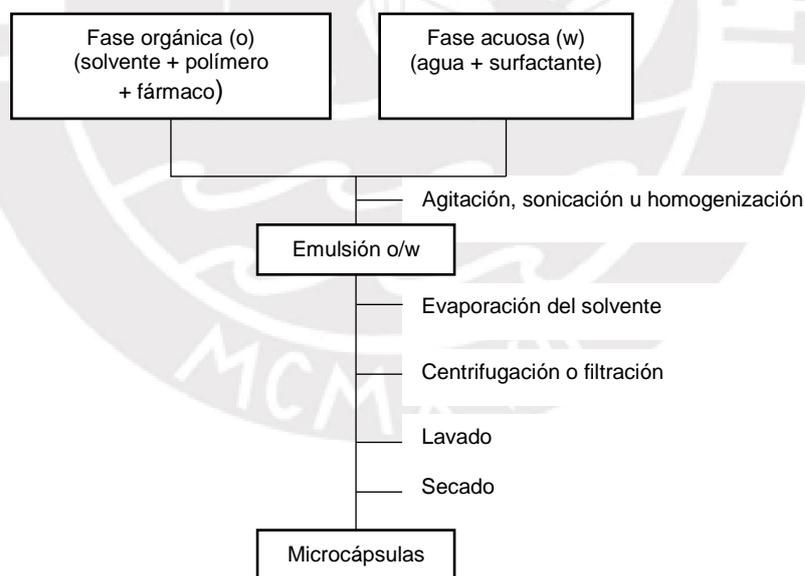


Figura 7. Esquema del procedimiento de aceite en agua (o/w)²⁹.

No obstante, si el fármaco es altamente hidrofílico se debe de cambiar de método por dos razones. La primera es que la droga a utilizar no se disuelva en el solvente orgánico, y la segunda es que el fármaco pueda difundir en la fase continua durante

la emulsión, lo que podría generar una gran pérdida del mismo. Por ello se podrían aplicar otros métodos como los siguientes^{29, 30}:

El procedimiento de emulsión doble w/o/w (Figura 8) consiste en que la solución acuosa de fármaco hidrófilo se emulsiona con fase orgánica (emulsión w/o). Esta emulsión se dispersa luego en una segunda solución acuosa, y forman, una segunda emulsión (w/o/w Emulsión doble)^{29, 30}.

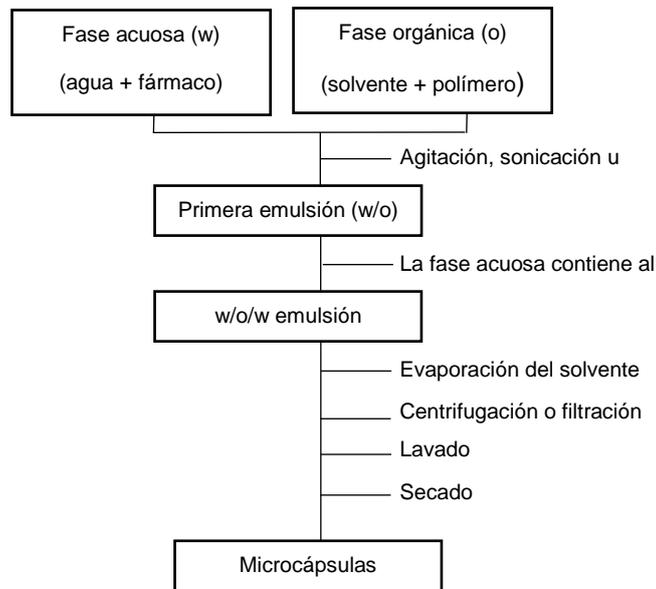


Figura 8. Esquema del procedimiento de la emulsión doble (w/o/w)²⁹.

Por último, el proceso de coacervación es un método basado en la separación de fases líquidas la cual consiste en formar un sistema de fases inmiscibles (una fase líquida o fase continua, un material a recubrir y un material de cobertura o de pared) donde por lo general emplea polímeros naturales. Lo primero que se necesita es formar una emulsión o/w donde la fase orgánica (el aceite con el agente activo) con la fase acuosa (agua, polímero y el agente estabilizante) se mezclan por medio de ultrasonido o de una agitación mecánica. Luego, se lleva a cabo un proceso de coacervación simple usando electrolitos como se hace con un sistema de alginato de sodio-cloruro de calcio. No obstante, estas microcápsulas deben modificarse adicionalmente para mejorar su estabilidad, resistencia o liberación sostenida. Por lo general, los polianiones pueden interactuar con policationes para formar complejos polielectrolitos, lo cual es llamado coacervación compleja. Por ejemplo, las microcápsulas de alginato-quitosa, carragenina-quitosa y gelatina-condroitina-6-sulfato se preparan por este método².

1.8. Especies reactivas de oxígeno

Un organismo aeróbico utiliza el oxígeno como fuerza motriz para mantener el metabolismo y la viabilidad celular. No obstante, dicho elemento puede desencadenar un grave peligro por las características paramagnéticas que posee, ya que se pueden producir intermediarios parcialmente reducidos con una alta reactividad llamados “Especies Reactivas de Oxígeno” (ERO). Los radicales libres, especies moleculares con uno o más electrones desapareados, y moléculas derivadas de oxígeno que poseen alta reactividad pertenecen al grupo ERO³⁴. Estos son producto de diversos procesos tanto metabólicos como fisiológicos. Pueden funcionar como mensajeros secundarios de ligandos específicos debido a que regulan varias respuestas biológicas que incluyen la expresión de genes, la proliferación celular, la angiogénesis, la inmunidad innata, la muerte celular programada (apoptosis) y la senescencia^{34,35}. Asimismo, son eliminados por reacciones oxidativas ya sea por vía enzimática o no enzimática³⁵. Bajo ciertas condiciones, se puede llegar a un incremento de agentes oxidantes y una disminución de antioxidantes lo que desplaza el equilibrio y se llega a un estado oxidativo. Este estrés oxidativo desencadena un daño a las proteínas, las membranas y los ácidos nucleicos, entre otros, y perturba al balance redox celular. Es por ello que está implicado en más de cien trastornos^{34,35}.

Las moléculas antioxidantes previenen o inhiben estas reacciones perjudiciales. Debido a que la medición de diferentes moléculas antioxidantes por separado no es práctica y sus efectos antioxidantes son aditivos, se mide la capacidad antioxidante total de una muestra³⁵. Existe un gran número de métodos para determinar la actividad total de antioxidantes presentes no solo en fluidos corporales sino en extractos naturales y compuestos puros, entre otros^{35,36}. Sin embargo, no existe un método oficialmente estandarizado, por lo que se recomienda realizar distintos métodos, compararlos y así validar los resultados obtenidos³⁷. Los métodos se pueden clasificar por la forma de reacción para inhibir los radicales libres^{36,37}. El primero de ellos mide la actividad antioxidante mediante reacciones por transferencia de átomos de hidrógeno (TAH) y el segundo por reacciones por transferencia de electrones (TE)^{36,37}. La mayoría de los ensayos basados en TAH aplican un esquema competitivo, en el que antioxidante y sustrato compiten por radicales peróxido generados térmicamente a través de la descomposición de compuestos azo. Los ensayos basados en TE miden la capacidad de un antioxidante en la reducción de

un oxidante que cambia de color cuando se reduce. El grado de cambio de color se correlaciona con las concentraciones de antioxidantes de la muestra³⁷.

Un método utilizado para medir la actividad antioxidante por medio de métodos espectroscópicos para soluciones puras o mezclas acuosas basado en TE, es emplear la generación de cationes radicales de ABTS (ácido [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)]). Cuando el ABTS reacciona con algún agente oxidante se genera el cromóforo ABTS^{•+} que presenta un color verde-azul^{35,36,37}. Dicho compuesto presenta absorciones máximas en las longitudes de onda de 415 (la mayor) 645, 734 y 815 nm. La adición de antioxidantes reduce el ABTS^{•+} a ABTS incoloro^{36,37}. La actividad antioxidante total del producto estudiado se determinará a partir del tiempo que demore el ABTS^{•+} en reducirse (se decolora), siendo este menor cuanto mayor sea dicha actividad (Figura 9). El método es aplicable al estudio tanto de antioxidantes solubles en agua como liposolubles, compuestos puros y extractos de alimentos ya que dicho compuesto es soluble tanto en solventes acuosos como orgánicos^{35,36,37}.

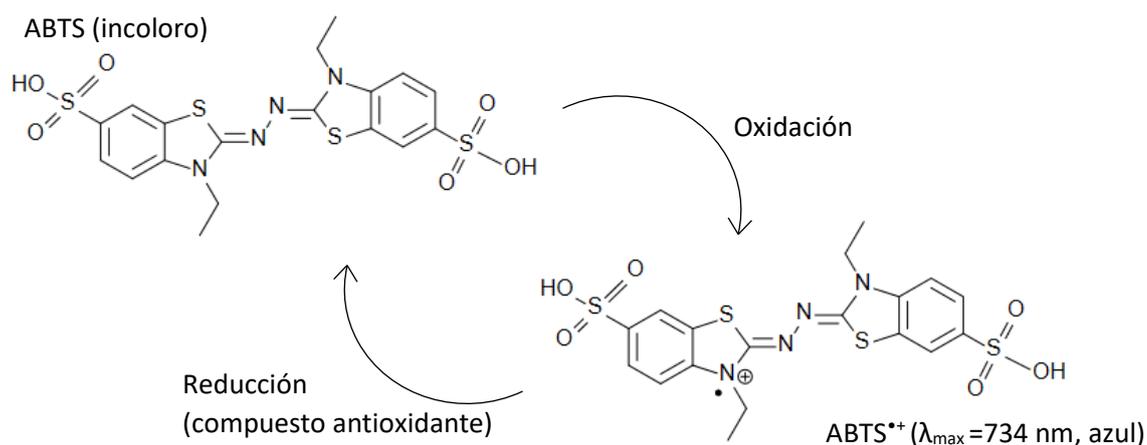


Figura 9. Estructura química del ABTS y el ABTS^{•+}.

De acuerdo con la literatura, existen diversos agentes que pueden oxidar el ABTS. Por lo general se utiliza persulfato de potasio, óxido de manganeso (IV) o 2,2-azobis(2-aminopropano). En otros estudios se emplean peróxido de hidrógeno y enzimas peroxidasa o agentes de peroxidasa no enzimáticas como la metamioglobina para oxidar al ABTS³⁵.

1.9. Sonoquímica

La química estudia cómo las moléculas interactúan entre sí utilizando una fuente de energía. Esta puede ser en forma de calor, luz, potencial eléctrico, etc., y brinda ciertas propiedades a la reacción. Se están estudiando novedosas formas para aplicar nuevas fuentes de energía y así optimizar ya sea el tiempo o los costos de diversas reacciones químicas^{38,39}. Una de estas fuentes de energía novedosas es la radiación ultrasónica. Al principio su uso era estrictamente medicinal, para diagnósticos, y posteriormente para el tratamiento de cáncer; sin embargo, actualmente se utiliza como fuente de energía para reacciones químicas por lo que tiene una gran utilidad³⁹. A esta nueva área de la química se la conoce como sonoquímica.

La sonoquímica estudia el comportamiento de las moléculas al aplicar una fuente de radiación ultrasónica (20 kHz-10 MHz)^{38,39,40}. La velocidad sonora en líquidos es aproximadamente $1500 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ y las longitudes de onda que se aplican oscilan entre los 10 a 10^{-4} cm, muy por encima de las dimensiones moleculares y atómicas, por lo que no existe una interacción molecular entre el ultrasonido y la especie química⁴⁰. Lo que sí ocurre es una cavitación acústica, es decir, se crean burbujas compuestas por gases disueltos en fluidos, producto de la alta intensidad del ultrasonido y esto es lo que explica los efectos químicos del ultrasonido^{38,39,40}.

Según la bibliografía existen tres partes fundamentales en la sonoquímica que son la creación, el crecimiento y el colapso de una burbuja que se forma en el líquido (efecto de la cavitación)⁴⁰. Cuando se sonicen líquidos a altas intensidades, las ondas sonoras que se propagan al medio líquido producen ciclos alternos de alta presión (compresión) y de baja presión (rarefacción), con velocidades que dependen de la frecuencia. El líquido se expande por el campo sonoro ("presión negativa", baja presión). Esto da como resultado un rápido crecimiento de los sitios débiles del líquido que contiene predominantemente gases disueltos ("núcleos de cavitación") y produce así cavidades o microburbujas llenas de gas. A continuación, el líquido se comprime durante la fase de compresión del campo sonoro ("presión positiva", alta presión)^{38,39}. La evidencia experimental de los gases disueltos en la sonoquímica es que cuando la solución experimenta ultrafiltración, antes de la aplicación ultrasónica, no hay reacción química y los enlaces químicos no se rompen⁴⁰. Las burbujas continúan creciendo durante los ciclos negativo-positivo del ultrasonido hasta alcanzar un diámetro crítico que depende de la frecuencia del ultrasonido y la

naturaleza del líquido. Esta burbuja "crítica" está en su mayoría llena de gases y vapor y, por lo tanto, no puede proporcionar rigidez. La compresión de burbujas durante la cavitación conduce a la enorme concentración de energía dentro del pequeño volumen de la burbuja colapsada. Las burbujas oscilantes pueden acumular eficazmente energía ultrasónica mientras crecen hasta cierto tamaño (típicamente decenas de nm). Bajo las condiciones adecuadas, una burbuja puede sobrecargar y posteriormente colapsar para liberar la energía en un tiempo muy corto (con una velocidad de calentamiento y enfriamiento de 10^{11} K.s⁻¹). Esta implosión cavitatoria es muy localizada y transitoria con una temperatura de aproximadamente 5000 K y una presión de aproximadamente 1000 bar³⁸⁻⁴⁰.



2. Objetivos

2.1. Objetivo general

- Elaborar micropartículas de alginato y quitosana para encapsular aceites vegetales y evaluar sus propiedades de encapsulamiento y su actividad antioxidante.

2.2. Objetivos específicos

- Elaborar las micropartículas de alginato y quitosana con aceites vegetales con la técnica de ultrasonido.
- Caracterizar el tamaño de las microcápsulas de alginato y quitosana por medio de microscopía óptica y evaluar su estabilidad durante un mes.
- Evaluar el porcentaje de encapsulamiento de las microcápsulas.
- Evaluar el porcentaje de liberación de los aceites vegetales con rojo Nilo de las microcápsulas.
- Evaluar la capacidad antioxidante de los aceites, de la matriz polimérica y de las micropartículas mediante el ensayo de decoloración de ABTS^{••}.

3. Parte experimental

3.1. Reactivos, equipos y materiales

3.1.1. Reactivos

- **Agroindustrias Amazónicas**
 - Aceite de sacha inchi: Aceite Inca Inchi
- **Alicorp**
 - Aceite de soya: Primor
- **Marcahuasi S.R.L.**
 - Aceite de oliva: El Olivar
- **Sigma-Aldrich**
 - Sal de sodio del ácido algínico, número de lote 05008JA
 - Quitosana, número de lote STBF3507V
 - Poloxamer 407, número de lote BCBQ6661V
 - Persulfato de potasio, número de lote MKBK9618V
 - Sal de diamonio de 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), número de lote SLBD8908V, grado de pureza para HPLC
 - Rojo Nilo, número de lote SLBP9326V, grado de pureza grado técnico.
- **J. T. Baker**
 - Alcohol etílico absoluto, número de lote V17C60, grado de pureza para análisis
- **Merck**
 - Ácido acético glacial, número de lote K34527363, grado de pureza para análisis
 - Cloruro de calcio, grado de pureza para analisis
- **Macron**
 - Hidróxido de sodio, número de lote 0000131067

3.1.2. Equipos

- Espectrómetro infrarrojo Perkin-Elmer modelo FT-IR 100. Consta de una fuente de luz láser de He, Ne, con un detector de LiTaO₃ (tantalato de litio) y una barra de carburo de silicio como fuente de radiación. Se utilizó el

accesorio de muestra ATR universal que consta con un cristal de diamante (KRJ-5), con un salto. Para el procesamiento de los espectros se empleó el programa OriginPro-2016-64bit.

- Espectrómetro UV/Vis de haz simple, Agilent 8453E, que posee lámparas de deuterio y tungsteno como fuente de radiación, monocromador de rejilla holográfica cóncava y detector de arreglo de fotodiodos, cuyo rango de longitud de onda entre 190 y 1100 nm. Se emplean celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.
- Ultrasonido de tipo sonda (20 kHz marca Sonics & Materials de modelo VCX750) equipada con una punta de titanio de 1 cm de diámetro. La entrega de potencia (750 W) se controló con una amplitud porcentual del 40%.
- Microscopio de fluorescencia, Leica, modelo DM1000 LED (11888842), objetivos 4x, 10x, 40x, 100x. El último es de inmersión de aceite de tipo N. El software que se utilizó fue Leica application suite. Tiene una lámpara de vapor de mercurio.
- Liofilizador Labconco modelo LYPH-LOCK 4.5.
- Centrifuga LW Scientific C5 con rotor de 4 espacios

3.2. Metodología

3.2.1. Formación de micropartículas de alginato con quitosana

Para la formación de las micropartículas se partió del estudio realizado por Natrajan, y colaboradores⁴¹ y Lertsutthiwong y colaboradores⁴². Se preparó una solución de alginato de sodio con concentración de 0,03% (w/v), se añadió ácido acético hasta llegar a un pH 5 y se añadió surfactante con 0,1 y 0,5% (w/v) (poloxamer). Por otro lado, se preparó una solución de quitosana de 0,2% (w/v) con ácido acético al 1% y se le reguló el pH a 5,5 con NaOH (2 M).

A cada solución de 20 mL de alginato de sodio se le agregó aceite de oliva, de soja o sachá inchi en una proporción de volumen 9:1 (solución de alginato:aceite) por separado. Luego, cada mezcla se colocó en un baño de hielo por 15 min donde alcanzó una temperatura entre 7°C y 10°C. Luego, se aplicó la energía de ultrasonido a una potencia de 20 kHz con una amplitud de 40% por 3 minutos. Posteriormente, se le agregaron 4 mL de cloruro de calcio (0,67 mg/mL) y se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. Por último, se le añadió 6,67 mL de la solución de quitosana

y, nuevamente, se agitó por 30 min a temperatura ambiente (figura 10). Asimismo, se preparó una muestra adicional donde se reemplazó el aceite por hexano (Tabla 3).

Tabla 3. Muestras de micropartículas de los polímeros analizados

Muestra	Porcentaje de surfactante (w/v)	Tipo de aceite
AO1	0,1	Oliva
ASO1	0,1	Soya
ASI1	0,1	Sacha inchi
AO5	0,5	Oliva
ASO5	0,5	Soya
ASI5	0,5	Sacha inchi
H	0,5	Hexano

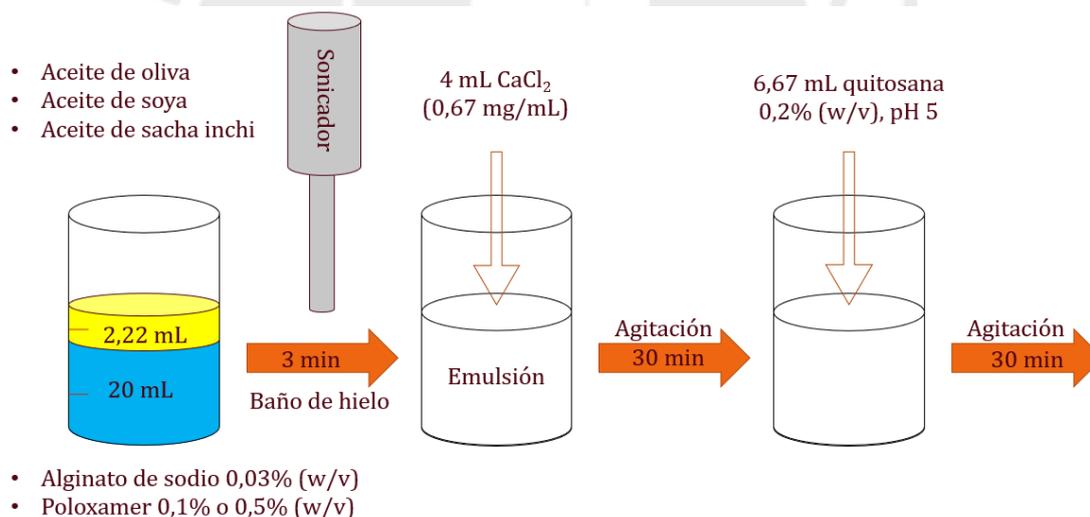


Figura 10. Esquema de la preparación de las microcápsulas de alginato y quitosana con aceites vegetales.

3.2.2. Estabilidad de las micropartículas

3.2.2.1. Separación de fases

Las emulsiones preparadas de las microcápsulas se colocaron en viales de vidrio (75 mm de largo y 23 mm de diámetro) después de su preparación. Fueron sellados

para prevenir la evaporación de la solución. Las emulsiones se guardaron a una temperatura de 4°C. Se procedió a tomarles una fotografía cada semana durante 5 semanas.

3.2.2.2. Tamaño de partícula

Para medir el tamaño y la estabilidad de las micropartículas se diluyó la emulsión con agua en una proporción de 1:10 (emulsión: agua). Luego, se colocó una gota de la muestra en el portaobjetos, se midió con el microscopio óptico y posteriormente se tomaron fotos. Este procedimiento se repitió cada semana durante 5 semanas para cada muestra.

3.2.3. Análisis por espectroscopía ATR-FTIR

Se analizaron los aceites, el alginato de sodio, la quitosana y las micropartículas. Para el alginato de sodio y la quitosana se prepararon soluciones de 0,03% (w/v) en agua y 0,2% (w/v) en ácido acético 1% (v/v), respectivamente. Se les aplicó la energía de ultrasonido a una potencia de 20 kHz con una amplitud de 40% por 3 minutos y se liofilizaron. Los aceites se analizaron directamente sin preparación previa. Por último, se preparó una solución de micropartículas y se liofilizaron todas las muestras. Se analizaron directamente con un espectrómetro FT-IR/NIR Frontier, Perkin Elmer, en modo transmitancia. El espectro ATR-FTIR se colectó por 4 barridos entre los 400 a 4000 cm^{-1} .

3.2.4. Eficiencia de encapsulamiento y liberación de rojo Nilo

3.2.4.1. Preparación de las micropartículas con rojo Nilo

Se agregaron 4 mg de rojo Nilo a 10 mL de aceite de oliva, oliva y de sachá inchi y ese aceite se utilizó para realizar el mismo procedimiento para las micropartículas de alginato con quitosana. Una vez formada la emulsión se diluyó en una proporción de 1:10 (emulsión: agua). Luego, se colocó una gota en el cubreobjetos, se midió en un microscopio óptico, se irradió con luz ultravioleta y se tomaron fotos de la muestra.

3.2.4.2. Curva de calibración de rojo Nilo

Se disolvieron 4×10^{-3} g de rojo Nilo en 25 mL de etanol. Luego se diluyeron alícuotas de entre 5×10^{-3} y 1,2 mL en fiolas de 25 mL y se enrasaron con etanol. Con un espectrómetro UV-Vis, se midió la absorbancia de cada muestra a 553 nm y se elaboró una gráfica de absorbancia vs concentración.

3.2.4.3. Cuantificación del rojo Nilo no encapsulado y liberado

Se añadió una alícuota de 1 mL de cada tipo de aceite con rojo Nilo (del punto 3.2.4.1), se agregó en una fiola de 50 mL, se enrasó con etanol y se midió la absorbancia a 533 nm para cuantificar la concentración exacta de rojo Nilo en los aceites.

Por otro lado, las soluciones de micropartículas con rojo Nilo se liofilizaron. Luego se agregaron 20 mL de etanol a cada muestra liofilizada, se agitó en un vortex a 1200 rpm durante 1 minuto y se centrifugó a 3500 rpm durante 1 min. El sobrenadante se separó y se guardó. Se repitió el procedimiento y se mezclaron los sobrenadantes. Posteriormente, se midió su absorbancia y se comparó con la absorbancia del aceite en etanol para cuantificar la cantidad de rojo Nilo que se encontraba fuera de las microcápsulas. Este procedimiento se repitió cada 24 horas durante un periodo de 96 horas (figura 11).

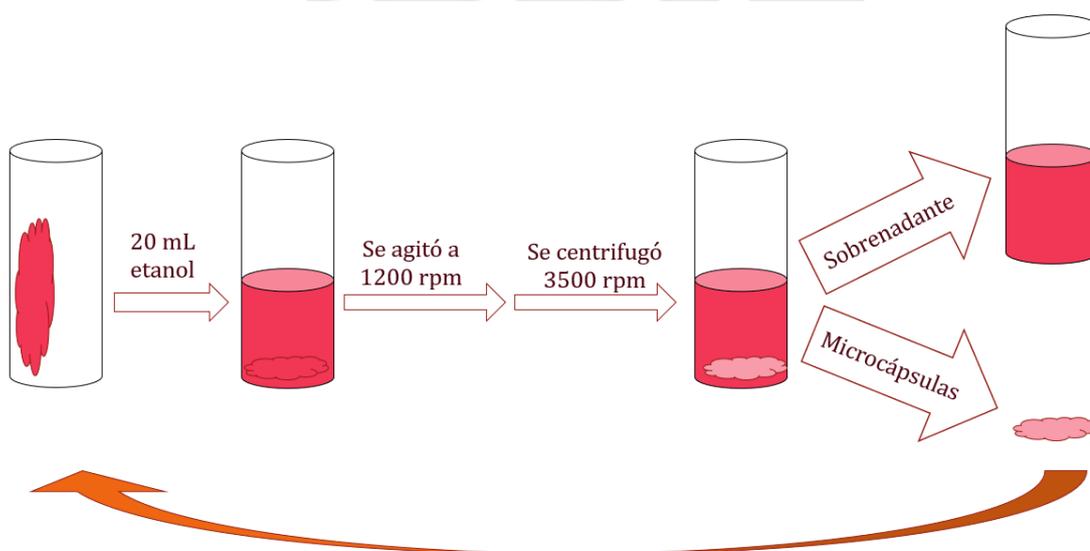


Figura 11. Esquema del lavado de las microcápsulas con rojo Nilo.

3.2.5. Evaluación de la actividad antioxidante

3.2.5.1. Actividad antioxidante de aceites

Para medir la capacidad antioxidante que poseen los aceites de oliva, sachá inchi y de soya se empleó el método de Ilhami Gülçin y colaboradores⁴³, el cual consiste en realizar ensayos de decoloración del catión radicalario ABTS^{•+}. Se disolvieron 0,038 g de ABTS y 0,0066 g de persulfato de potasio en 10 mL de agua destilada. La mezcla se agitó durante 24 horas en ausencia de luz debido a que el producto final, ABTS^{•+}, es fotosensible. Luego, se tomó una alícuota del producto y se diluyó en etanol hasta alcanzar una absorbancia de 0,7 a una longitud de onda de 734 nm. De esa nueva solución se tomaron 3 mL y se le agregaron 30 µL de los aceites a analizar cada uno por separado (oliva, soya y sachá inchi). Se midió la absorbancia a 734 nm de la muestra de ABTS^{•+} con el aceite en el minuto 1, 15, 30, 60 y 120. Después, se utilizó la ecuación (1) para determinar el porcentaje de inhibición de los aceites, donde $A_{control}$ es la absorbancia inicial de ABTS^{•+} y $A_{muestra}$ es la absorbancia de ABTS^{•+} con la muestra a analizar.

$$Inhibición(\%) = \frac{A_{control} - A_{muestra}}{A_{control}} \times 100 \quad (1)$$

3.2.5.2. Actividad antioxidante de la matriz polimérica.

Se mezclaron 20 mL de alginato 0,03% (w/v) con 6,67 mL de quitosana 0,02% (w/v) y 1% (v/v) de ácido acético. De dicha solución se liofilizó 1 mL y se realizaron los ensayos de decoloración del catión ABTS^{•+} descritos en el punto 3.2.5.1.

3.2.5.3. Actividad antioxidante de micropartículas

Para determinar la capacidad antioxidante que poseen las micropartículas de alginato y quitosana se utilizó el método elaborado por Ilhami Gülçin⁴³ y el de Sousa⁴⁴. Se liofilizó 1 mL de cada emulsión preparada y además 0,5 mL de las microcápsulas de sachá inchi. Posteriormente, se realizó el mismo procedimiento de los ensayos de decoloración de cationes radicales de ABTS^{•+} descritos en el punto 3.2.5.1. para las

emulsiones. Se midió la absorbancia de la muestra de ABTS^{•+} con las microcápsulas en el minuto 1, 5, 10, 15, 30, 45 y 60 a 734 nm. Luego, se utilizó la ecuación (1) para calcular el porcentaje de inhibición de las muestras.



4. Resultados y discusión

4.1. Síntesis de micropartículas de alginato con quitosana

Se mezcló la solución de alginato con el aceite vegetal con el ultrasonido y se obtuvo una emulsión blanca. Dentro de esta emulsión se obtenían las micropartículas de alginato con aceite; sin embargo, se ha reportado que poseen una baja estabilidad y se pierde el activo encapsulado con facilidad. Es por ello que se agregaron un compuesto de entrecruzamiento (CaCl_2) y un polímero catiónico (quitosana).

El polímero catiónico tiene un efecto fundamental en el tamaño y en la estabilidad de las microcápsulas. Según Lertsutthiwong y colaboradores⁴² y Sao y colaboradores⁴⁵, la adición de quitosana después del CaCl_2 produce un ligero aumento en cuanto al tamaño de estas. A su vez, como se observa en el anexo, las microcápsulas poseen un potencial zeta positivo lo que indica que la quitosana se encuentra localizada en la superficie del polímero de alginato y lo más probable es que sea por una adición electrostática. Por otro lado, un alto peso molecular del polímero catiónico genera microcápsulas más grandes en comparación a utilizar quitosana de bajo peso molecular. Adicionalmente, si se añade una mayor concentración de quitosana a la emulsión ya formada se producen partículas con un mayor tamaño⁴⁶. Asimismo, la adición de quitosana mejora la estabilidad de las microcápsulas, lo que podría explicar debido a las interacciones electrostáticas entre el alginato y la quitosana. Al formar un complejo polielectrolito mejora su estabilidad y reduce la porosidad de las micropartículas de alginato.

Rajaonarivony⁴⁷ sugirió que el orden de adición del CaCl_2 y la quitosana durante la preparación de las cápsulas de alginato tiene un efecto sobre su tamaño, y que la formación de las micropartículas de alginato está fuertemente influenciada por la naturaleza del primer compuesto añadido en la formulación. Si se compara el tamaño de las microcápsulas cuando se añade primero el CaCl_2 y después la quitosana se observa que el tamaño de estas es menor que si se invierte el orden de adición de estos compuestos. Cuando se agrega el CaCl_2 , como el primer compuesto en la solución de alginato, la interacción entre los iones de calcio y el alginato ocurre en las secuencias gularónicas, y se forman estructuras compactas de “caja de huevos”. Luego, la adición de la quitosana como el segundo compuesto estabiliza este sistema para dar pequeñas microcápsulas. Por otro lado, cuando se agrega quitosana al

alginato como el primer compuesto, los grupos amino protonados de la quitosana interactúan con el alginato en las secuencias manurónicas y aleatoria manurónico-gulurónico, dando como resultado una estructura aleatoriamente empaquetada. Es por ello que se optó por añadir primero el cloruro de calcio y luego la quitosana para obtener microcápsulas de menor tamaño.

4.2. Estabilidad de las micropartículas

4.2.1. Separación de fases

El poloxamer es un copolímero en bloque el cual es un tipo de surfactante. Posee un gran interés en diversos campos, en particular, en las preparaciones oftálmicas, tópicas e inyectables y que promueve la estabilización y la disolución en agua de muchos fármacos hidrofóbicos. Este grupo de copolímeros consiste en bloques de óxido de etileno y óxido de propileno dispuestos en una estructura tribloque (figura 12). Su fórmula química es $\text{HO}-[\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{O}]_a-[\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2\text{O}]_b-[\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{O}]_a\text{H}$, donde "b" es mayor que 14⁴⁸, por ello su estructura molecular es anfifílica. En el caso de las microcápsulas, el poloxamer se encuentra en la interfaz de estas y así estabiliza las gotas presentes en la fase dispersa de una emulsión⁴⁹. El surfactante permite que las microcápsulas puedan estar suspendidas en una fase continua por un mayor intervalo de tiempo⁴⁸.

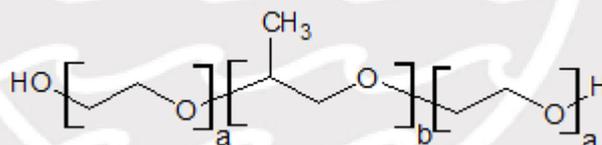


Figura 12. Estructura del poloxamer 407.

La figura 13 muestra las microcápsulas inmediatamente después de ser sintetizadas (semana 0) y cuatro semanas después. En la semana 0 se observa una sola fase en todas las muestras, mientras que la semana 4 se aprecia la separación de dos fases (para ayudar a diferenciarlas se ha colocado una línea roja). En la figura 13, las muestras que contienen menor cantidad de poloxamer (AO1, ASO1 y ASI1) el efecto es más notable. La separación de fases es consecuencia de la aglomeración de las cápsulas con el transcurrir de las semanas⁵⁰. En el anexo se muestra el tamaño de las partículas de la emulsión de ASI5 después de una semana de ser elaboradas y se observó que las micropartículas que se encuentran en la fase superior poseen un mayor tamaño con respecto a las que se encuentran en la fase inferior. Como se

mencionó previamente, la aglomeración de cápsulas es un indicador de inestabilidad⁵¹, por lo tanto las que poseen mayor cantidad de poloxamer son más estables.

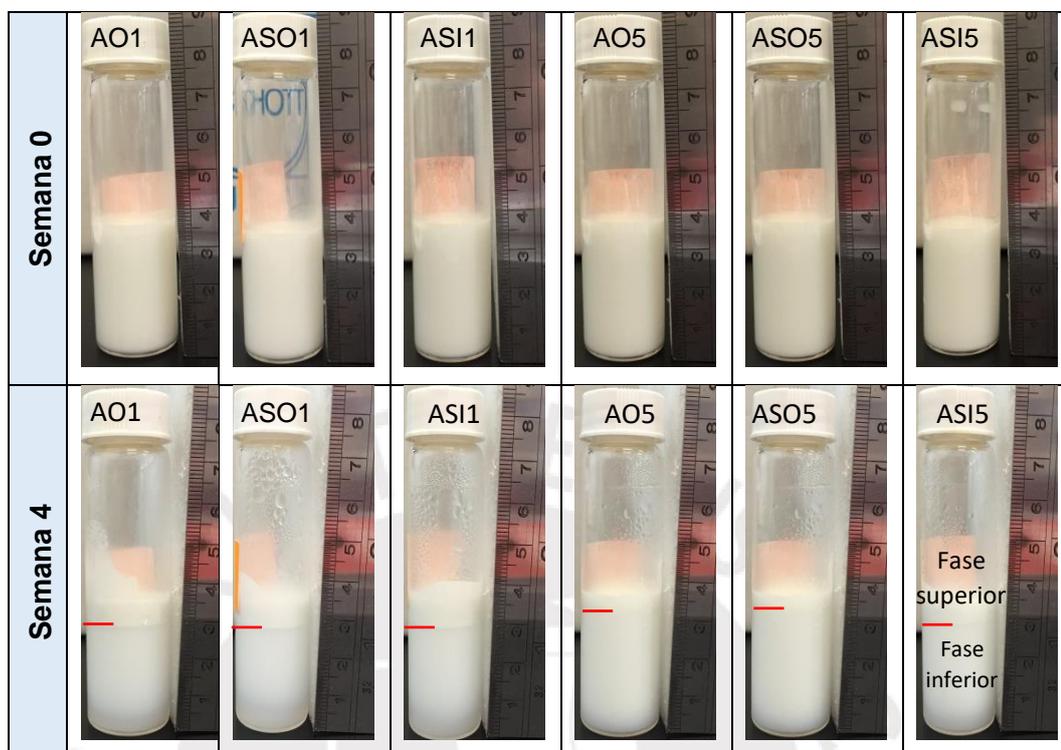


Figura 13. Fotografía de las soluciones que contienen a las microcápsulas de distintas condiciones en la semana 0 y la semana 4 de ser sintetizadas.

4.2.2. Tamaño de partícula

Para formar la emulsión de las microcápsulas, primero se disolvió el estabilizador (poloxamer) y el alginato de sodio en la fase continua y luego, por medio del ultrasonido, se mezclaron con la fase dispersa (aceite). Una vez formada la emulsión, el estabilizador, se encuentra en la interfase, en otras palabras, entre la fase continua (fase acuosa) y la fase dispersa (fase orgánica)⁵². Si hay suficiente cantidad de poloxamer las pequeñas gotas de aceite se podrán rodear por completo dándoles estabilidad^{49,53}.

En la figura 14 se muestra un esquema general de la formación de micelas y cómo el estabilizador permite controlar su tamaño. El primer paso es mezclar la fase continua (solución de alginato), el estabilizador (poloxamer) y la fase dispersa (aceite vegetal) y aplicar energía de ultrasonido con lo que se crearán las micelas. Debido a que el estabilizador posee una estructura anfifílica rodeará a las gotas de aceite dispersas en la solución acuosa quedándose en la interfase. Al seguir aplicando la

energía de ultrasonido, habrá una interrupción de las micelas y se tendrán gotas de aceite de menor tamaño. Si hay una cantidad suficiente de estabilizador se podrá rodear a todas estas nuevas gotas formadas. Si no hay suficiente estabilizador no se podrá rodear a todas las gotas de aceite lo que ocasionará una falta de estabilidad por lo que habrá una coalescencia entre ellas y se formarán gotas de mayor tamaño para disminuir el área superficial que poseen y así el estabilizador podrá rodear por completo a la fase dispersa.

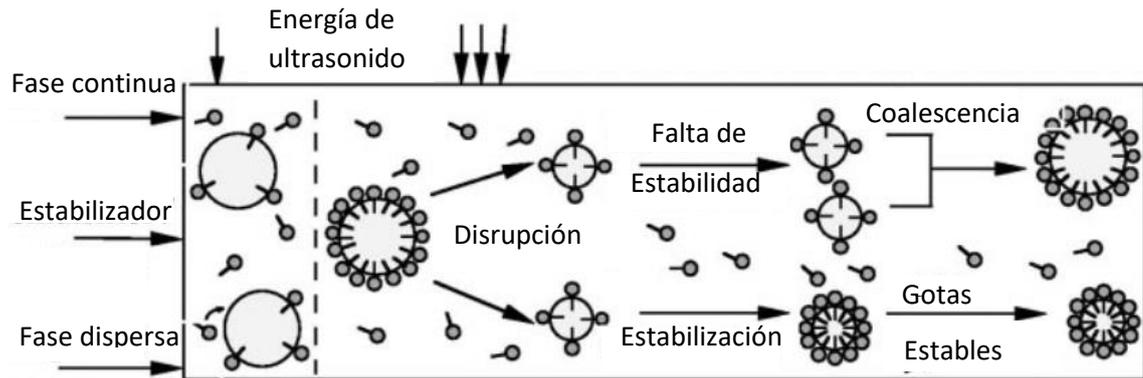
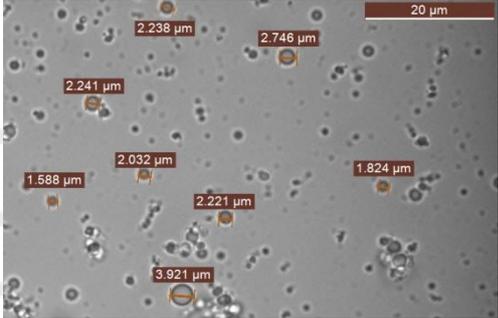
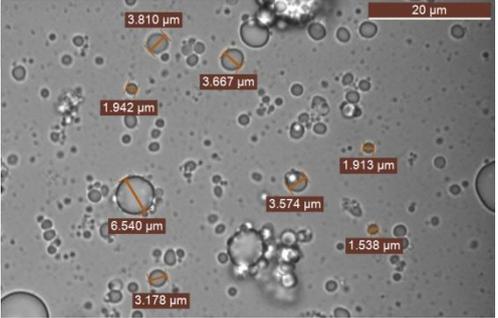
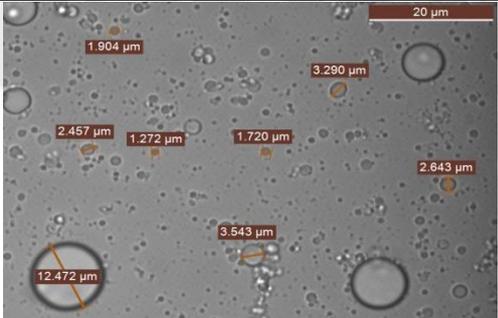
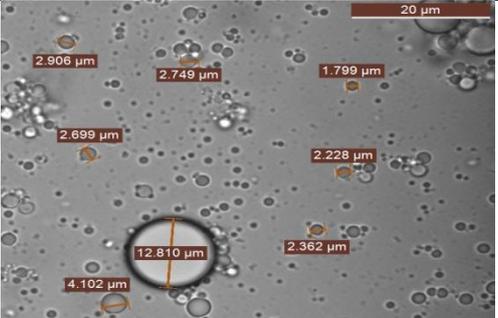
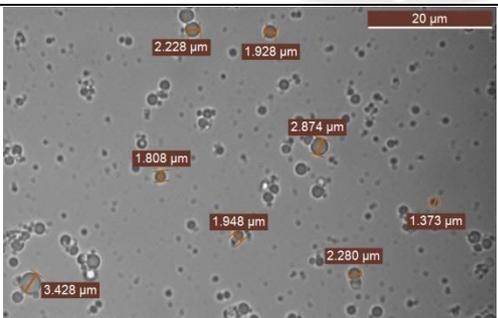
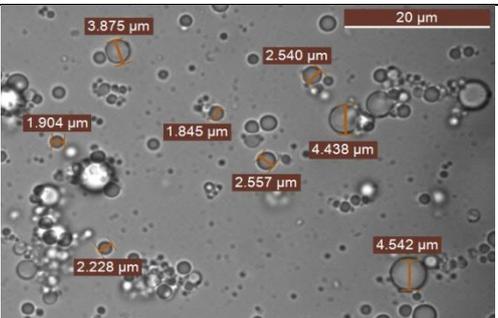


Figura 14. Formación de las microcápsulas a distinta concentración de surfactante⁴⁹.

La figura 15 muestra las fotografías de las micropartículas tomadas con un microscopio óptico (aumento de 100x). En cada imagen se observan pequeños círculos con un borde más oscuro de diferentes tamaños los cuales son la interfase de la emulsión, conformada por la matriz polimérica y el poloxamer. En el interior se encuentra la fase dispersa, en este caso el aceite, y lo rodea la fase continua (la solución acuosa). Esto indica, que las microcápsulas son esféricas independientemente del aceite y de la cantidad del poloxamer. Asimismo, se midió el diámetro de por lo menos 7 microcápsulas de cada emulsión y se obtuvieron los siguientes promedios. Para las muestras AO1, ASO1 y ASI1 el tamaño promedio fue de $2,351 \pm 0,673$, $2,404 \pm 0,769$ y $2,233 \pm 0,606$ μm , respectivamente, y las muestras AO5, ASO5 y ASI5 obtuvieron tamaños de $2,605 \pm 0,79$, $1,914 \pm 0,841$ y $2,109 \pm 1,1$ μm , respectivamente. Se observa que hay un ligero aumento en el tamaño al disminuir la cantidad de poloxamer a excepción de las muestras con aceite de oliva. Sin embargo, en la semana 4 el promedio de la muestra AO1 es $2,803 \pm 0,897$ μm y del AO5 es $2,492 \pm 0,677$ μm donde, efectivamente, se observa dicha tendencia mencionada. Esto se explica por la cantidad de poloxamer que se

empleó. Se descartaron las microcápsulas de gran tamaño debido a que podría ser aceite en suspensión que no se llegó a encapsular. Asimismo, esta técnica no permite medir microcápsulas con un diámetro inferior a 1 μm por ser un microscopio óptico. A su vez, la tendencia de la diferencia de tamaños concuerda con los resultados del anexo analizados por dispersión dinámica de luz.

Por otro lado, por medio del microscopio óptico se observó que hubo una mayor aglomeración por parte de las microcápsulas que contienen 0,1% (w/v) de poloxamer, sobre todo al finalizar la semana 4, con respecto a las microcápsulas con 0,5% (w/v) de poloxamer. Como se dijo anteriormente, la aglomeración es un índice de inestabilidad de las micropartículas, por lo que se llega a la conclusión que las de 0,5% son más estables.

Muestra	Semana 0	Semana 4
AO1		
ASO1		
ASI1		

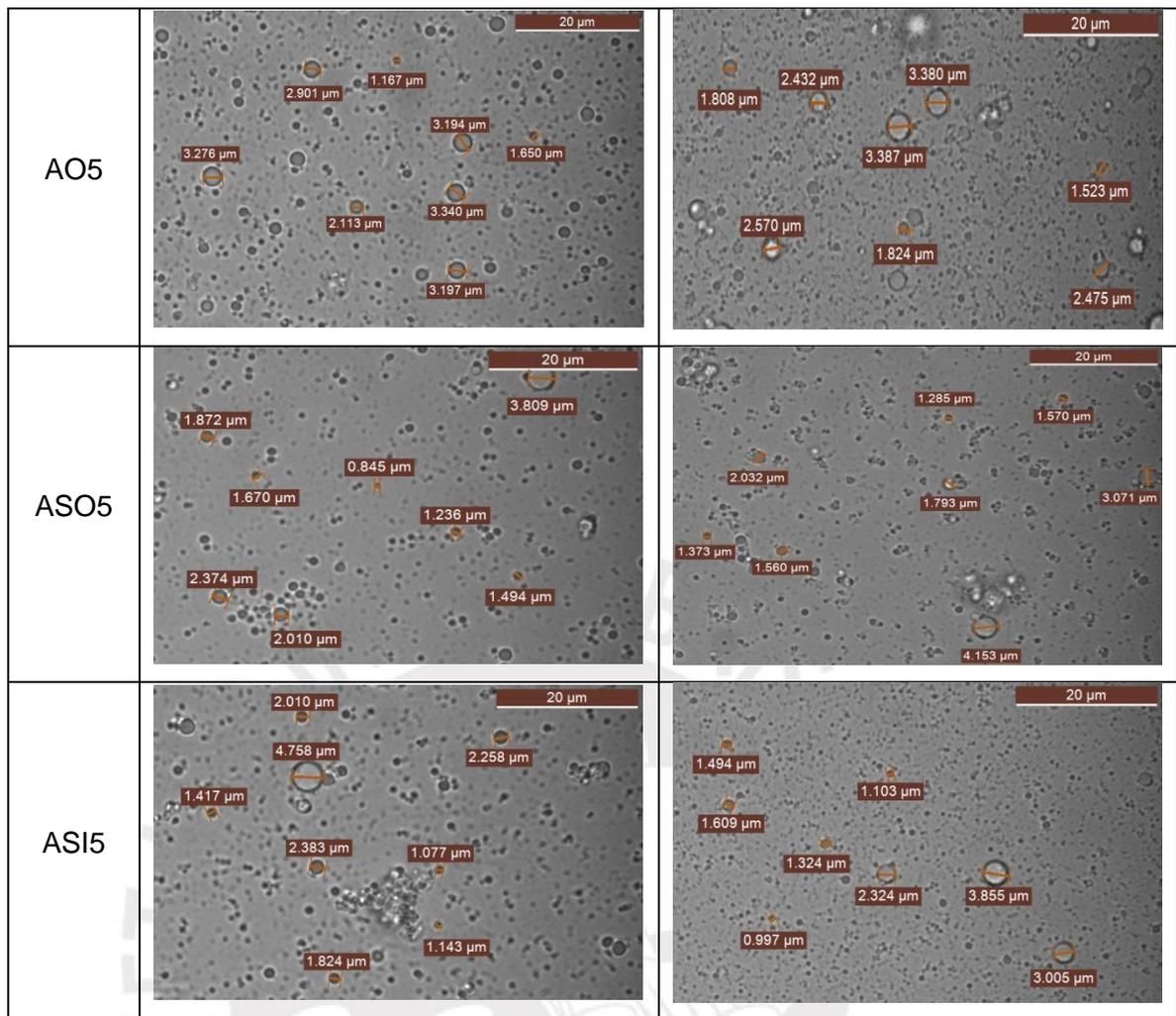


Figura 15. Imágenes de microscopía óptica de muestras de micropartículas con un aumento de 100x a la semana 0 y semana 4 de ser elaboradas.

4.3. Análisis por espectroscopía FTIR

La figura 16 muestra las señales características en la región de 400 a 4000 cm^{-1} del alginato de sodio al que se le aplicó ultrasonido por 3 min. Las bandas a 3280 cm^{-1} son propias del estiramiento del enlace O-H (grupo hidroxilo) mientras que las que se encuentran a 2924 cm^{-1} corresponden a la vibración del estiramiento del enlace C-H. La banda situada a 1598 cm^{-1} es propia del grupo C=O y evidencia que la muestra es alginato de sodio. De acuerdo con la literatura la banda a 1411 cm^{-1} se debe a la vibración de deformación del enlace C-OH con una contribución del O-C-O por la vibración del estiramiento simétrico del grupo carboxilato. Los picos a 1083 y 1030 cm^{-1} podrían ser por el estiramiento de los enlaces C-C y C-O del anillo de piranosa. La región anomérica de la huella digital (950-750 cm^{-1}) mostró tres bandas de absorción características en todos los estándares de polisacáridos y algas pardas de polisacáridos de alginato. La banda a 947 cm^{-1} se asigna a la vibración del estiramiento C-O que corresponde a los residuos del ácido urónico. La banda a 883 cm^{-1} se asigna a la vibración de deformación del enlace C-H del carbono anomérico de los residuos de ácido β -manurónico y, finalmente, la banda a 818 cm^{-1} también es característica de los residuos del ácido manurónico. Estos datos pueden ser comparados por el estudio que realizó Gómez-Ordóñez y colaboradores⁵⁴.

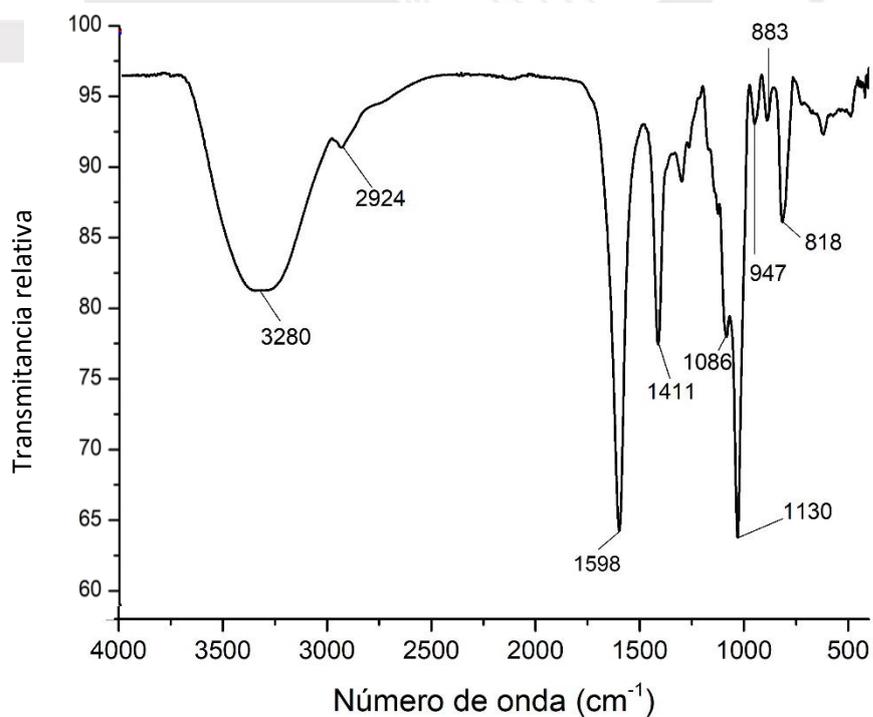


Figura 16. Espectro FTIR-ATR del alginato de sodio liofilizado.

La figura 17 muestra el espectro de FTIR-ATR de la quitosana tras aplicarle ultrasonido por 3 min, en el rango de 400 a 4000 cm^{-1} . La banda que está a 3383 cm^{-1} se debe al estiramiento de los enlaces -OH y -NH, mientras que la banda a 2910 cm^{-1} es producto del estiramiento simétrico del CH en la quitosana. Las bandas a 1640 cm^{-1} y 1578 cm^{-1} representan a los grupos amina y amida de la quitosana, respectivamente. Las bandas a 1063 cm^{-1} son propias de la vibración del C-O. Estos datos pueden ser comparados por los estudios que realizaron Xu⁵⁵, Naghibzadeh⁵⁶ y Niramol⁵⁷.

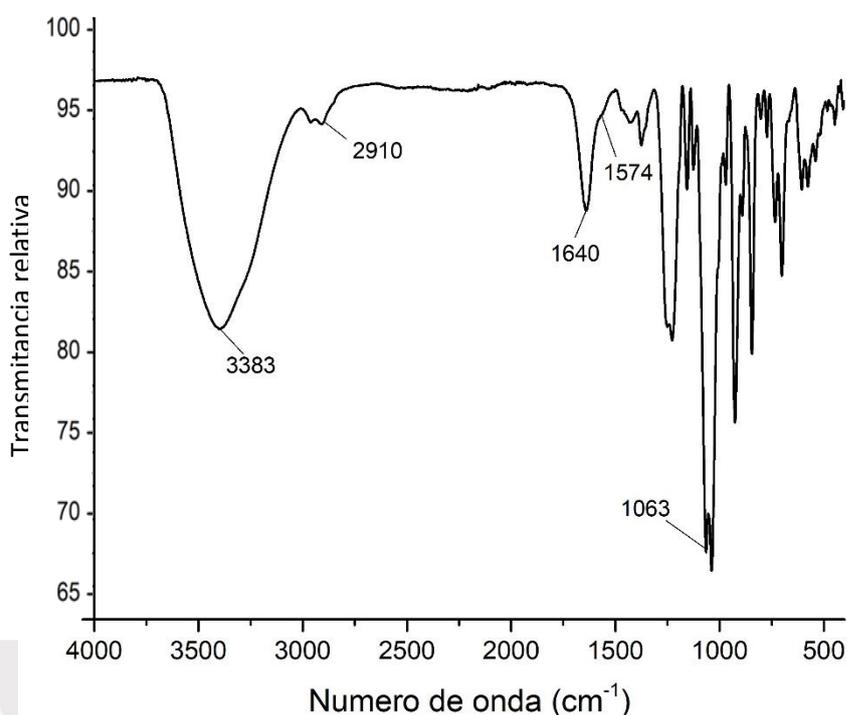
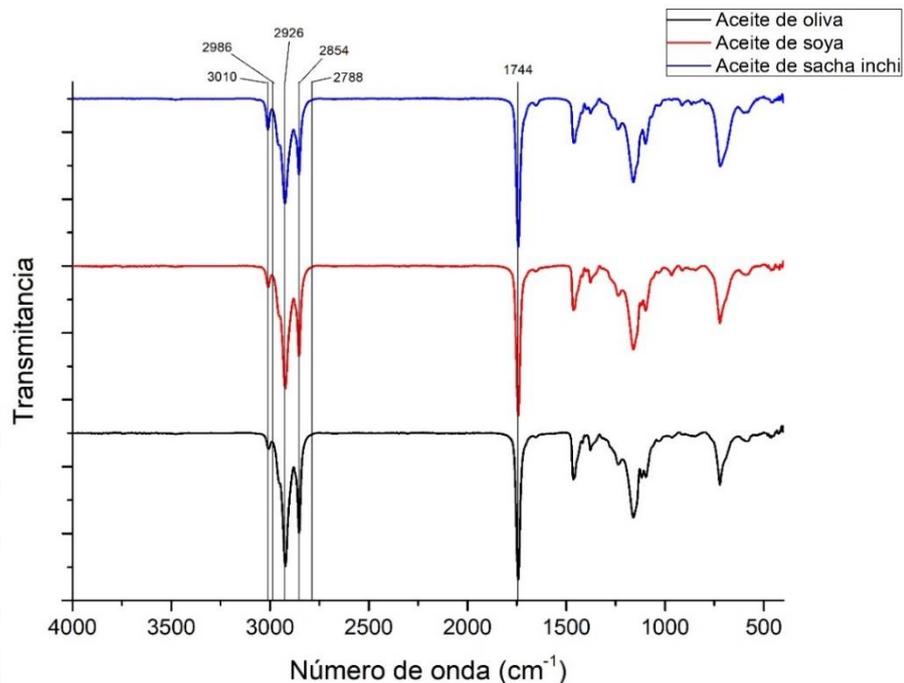


Figura 17. Espectro de FTIR-ATR de la quitosana liofilizada.

En la figura 18a se observan los espectros FTIR-ATR del aceite de soya, el de oliva y el de sachá inchi desde los 400 cm^{-1} hasta los 4000 cm^{-1} . La banda presente a los 3010 cm^{-1} se asocia a la vibración de estiramiento de los enlaces dobles cis C=C-H y las bandas a 2926 y 2854 cm^{-1} se deben al estiramiento asimétrico y simétrico del metileno. Las bandas entre 2788 y 2986 cm^{-1} son por el estiramiento simétrico y asimétrico del grupo -C-H (CH_2 y CH_3) y la banda a 1744 cm^{-1} es propia del grupo C=O. Aunque sus espectros son muy parecidos entre sí, las bandas presentes entre 3050 y 2800 cm^{-1} presentan algunas diferencias entre unos aceites y otros (figura 15b). Por ejemplo, el aceite de sachá inchi mostró un pico más intenso a 3010 cm^{-1} producto de la vibración del grupo =C-H cis debido a su mayor contenido de

ácidos grasos poliinsaturados ya que según la literatura, el aceite de sacha inchi contiene aproximadamente 78% de ácidos grasos poliinsaturados (47% de ácido linolénico y 37% de ácido linoleico) lo que concuerda con lo reportado por el fabricante. Por el contrario, el aceite de oliva presenta bandas menos intensas a 3010 cm^{-1} debido a su predominio del ácido oleico que es monoinsaturado (76%)⁵⁸.

a)



b)

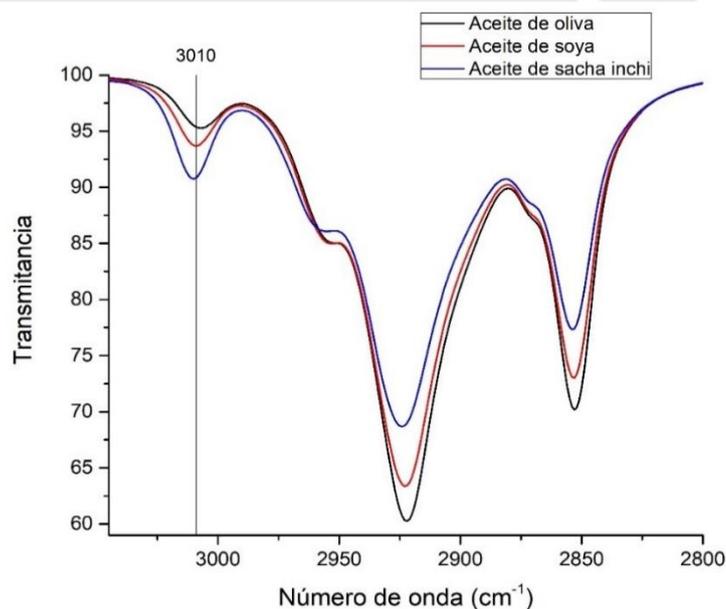


Figura 18. (a) Espectros FTIR-ATR de los aceites de sacha inchi, soya y oliva.

(b) Ampliación de los espectros FTIR-ATR de los tres aceites sobrepuestos (3100-2800 cm^{-1}).

En la figura 19 se observan los espectros de IR del aceite de sacha inchi, de una emulsión liofilizada de alginato de sodio con quitosana, y de micropartículas que poseen alginato, quitosana y aceite de sacha inchi. Las bandas del espectro de las micropartículas muestran tanto las bandas del espectro de los polisacáridos (quitosana-alginato) como las del aceite de sacha inchi. Esto muestra que las micropartículas formadas poseen ambos polisacáridos y a su vez el aceite de sacha inchi. Asimismo, el pico a 1410 cm^{-1} muestra la interacción iónica entre los grupos NH_3^+ de la quitosana y el COO^- del alginato de sodio⁵⁹.

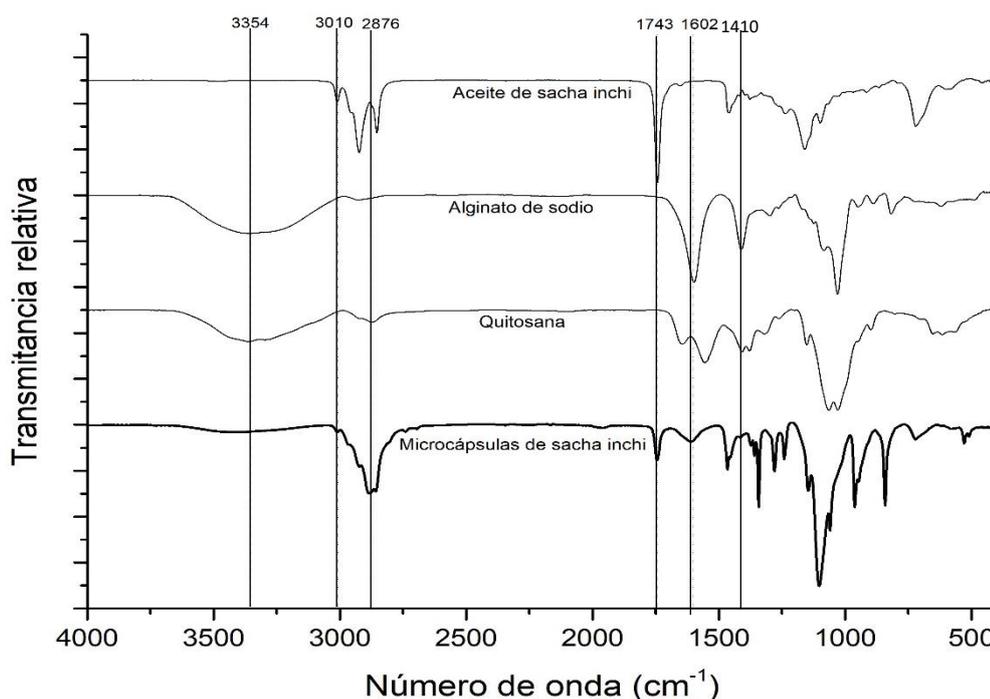


Figura 19. Espectros FTIR-ATR del aceite de sacha inchi, alginato de sodio, quitosana y las microcápsulas de alginato-quitosana con aceite de sacha inchi.

4.4. Eficiencia para encapsular y liberar rojo Nilo

4.4.1. Preparación de las micropartículas con rojo Nilo

El rojo Nilo es un compuesto cromóforo y fluoróforo lipofílico (figura 20). Tiene aplicaciones en biología celular, donde se puede usar como un tinte de membrana que se puede visualizar fácilmente usando un microscopio de fluorescencia. Su absorción cambia con la polaridad del solvente⁶⁰, por ejemplo, en el caso del etanol

absorbe a los 553 nm. Se irradió a las microcápsulas que tenían rojo Nilo con un haz de luz a 553 nm y se utilizó la fluorescencia del rojo Nilo para conocer qué tipo de emulsión se formó y conocer cuál es la fase continua y cuál es la dispersa.

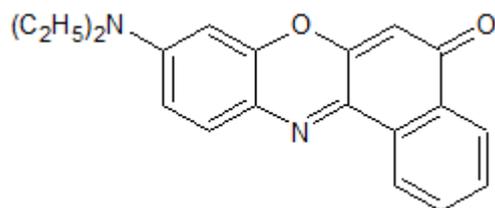


Figura 20. Estructura del rojo Nilo.

Existen dos tipos de emulsión simple, agua en aceite o aceite en agua²⁹. La primera quiere decir que la fase continua es la fase orgánica y la fase acuosa es la dispersa mientras que, en la segunda, la fase orgánica es la fase dispersa y la acuosa es la continua. La figura 21 muestra las micropartículas por medio de un microscopio óptico en un aumento con 100x. Se observaron círculos iluminados con un fondo de color negro. Esto significa que la fase continua es la fase acuosa mientras que la dispersa es el aceite con rojo Nilo, por lo que se concluye que el tipo de emulsión es aceite en agua (o/w).

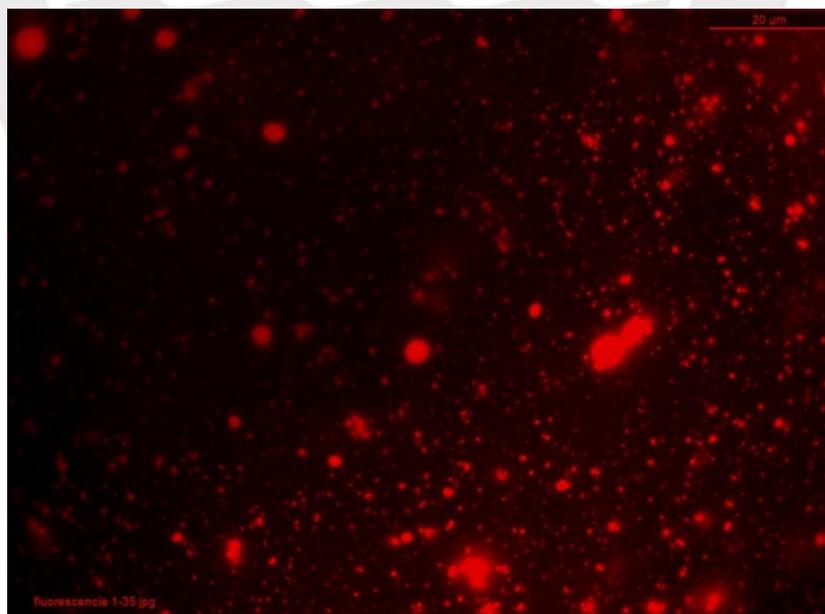


Figura 21. Fluorescencia de las microcápsulas a través de un microscopio óptico con un aumento de 100x con filtro rojo.

4.4.2. Curva de calibración de rojo Nilo

La figura 22 muestra la relación de la absorbancia del rojo Nilo en etanol a 553 nm con respecto a la concentración⁶¹. Se obtuvo una regresión lineal (r^2) de 0,9976 que demuestra la tendencia lineal de la curva donde la concentración es directamente proporcional a la absorbancia.

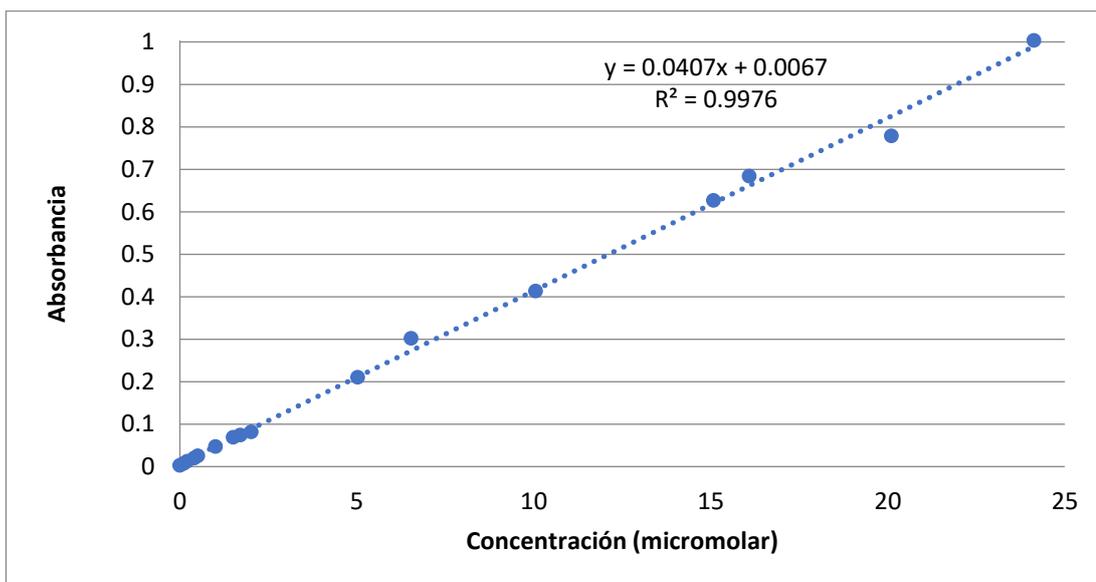


Figura 22. Curva de calibración del rojo Nilo en etanol a una longitud de onda de 553 nm.

4.4.3. Cuantificación del aceite no encapsulado y liberado

Se midió la concentración de rojo Nilo presente en el sobrenadante por medio de la técnica UV-Vis. Las micropartículas que contienen rojo Nilo son de color magenta y pierden cada vez más su color conforme se lavaron con etanol. La figura 23 muestra el porcentaje liberado de rojo Nilo por día y la figura 24 muestra el porcentaje liberado acumulado de rojo Nilo de las microcápsulas de aceite de oliva, elaboradas con diferente concentración de poloxamer después de ser lavadas cada 24 horas.

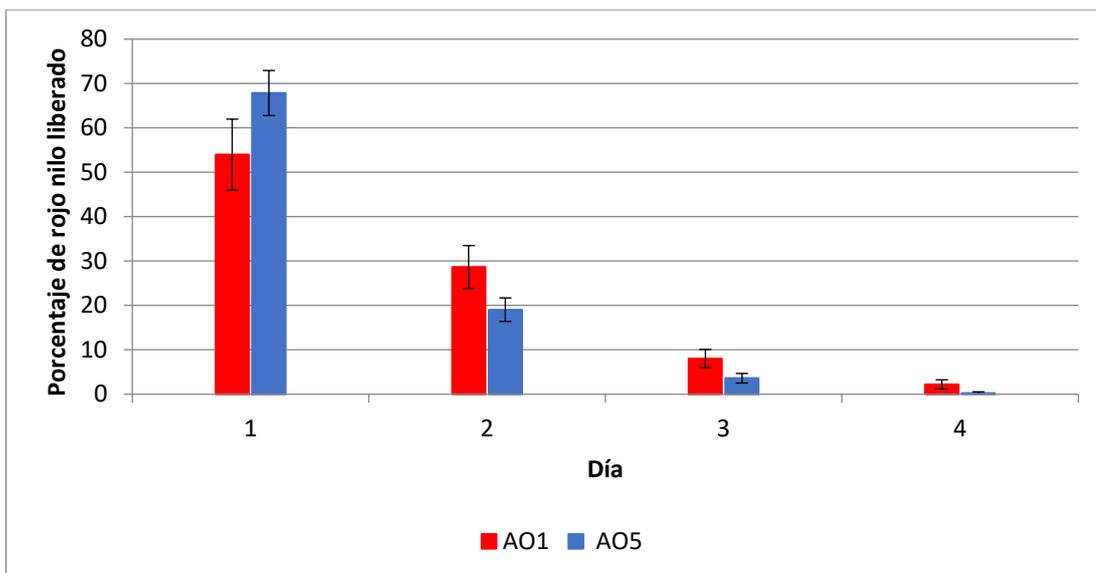


Figura 23. Porcentaje liberado por día de rojo Nilo de las microcápsulas de aceite de oliva con 0,1% y 0,5% (w/v) de poloxamer.

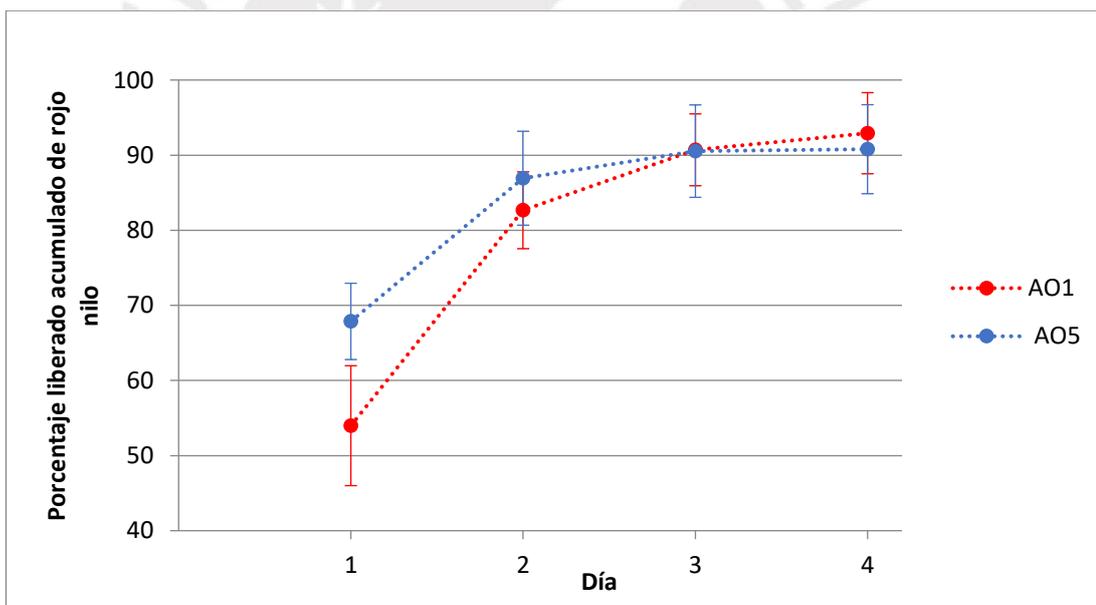


Figura 24. Porcentaje acumulado por día de rojo Nilo de las microcápsulas de aceite de oliva con 0,1% y 0,5% (w/v) de poloxamer.

Se sabe que el proceso de encapsulación influye en la forma de liberación del fármaco contenido en esta. Según la literatura existen tres tipos de mecanismos de liberación. La primera es la desorción del fármaco desde la pared polimérica, lo que ocurre cuando se adsorbe cierta cantidad del fármaco en la superficie de la pared polimérica y posteriormente se libera. El segundo mecanismo es por la difusión del

fármaco desde el núcleo a través de la pared del polímero. Por último, el tercer mecanismo se produce por la erosión del polímero, es decir, se rompe la pared polimérica y permite que se libere el fármaco. En las microcápsulas puede ocurrir una o la combinación de dos o más procesos^{62,63,64}.

Con respecto al porcentaje de rojo Nilo liberado por día (figura 23), se observa que la liberación del rojo Nilo en el primer día fue de 54 y 68% para las muestras AO1 y AO5, respectivamente. Sin embargo, los valores disminuyen rápidamente conforme transcurre el tiempo. A su vez, en ambos casos tras el cuarto día el porcentaje acumulado liberado de rojo Nilo es aproximadamente del 90% (figura 24). El porcentaje de rojo Nilo liberado en el primer día es, en gran medida, al aceite con rojo Nilo no encapsulado. Cuando se preparó la emulsión con ultrasonido para formar las micropartículas, se visualizó en el producto final una pequeña cantidad de aceite con rojo Nilo libre en la parte superior de la solución (figura 25). Por otro lado, las microcápsulas se centrifugaron y posteriormente se agitaron con un vortex a 1200 rpm por un minuto para favorecer la disolución del aceite libre con rojo Nilo en el solvente. Esto pudo provocar que las microcápsulas se dañaran y rompieran por estrés mecánico, lo que permitió una liberación de rojo Nilo.

Con los porcentajes de liberación de rojo Nilo libre al primer día se calculó la eficiencia de encapsulamiento para las muestras AO1 y AO5 restando el 100% de rojo Nilo empleado menos el porcentaje de rojo Nilo libre del primer día y fueron 46% y 32%, respectivamente.



Figura 25. Emulsión de las microcápsulas de alginato y quitosana con aceite de sachá inchi y rojo Nilo.

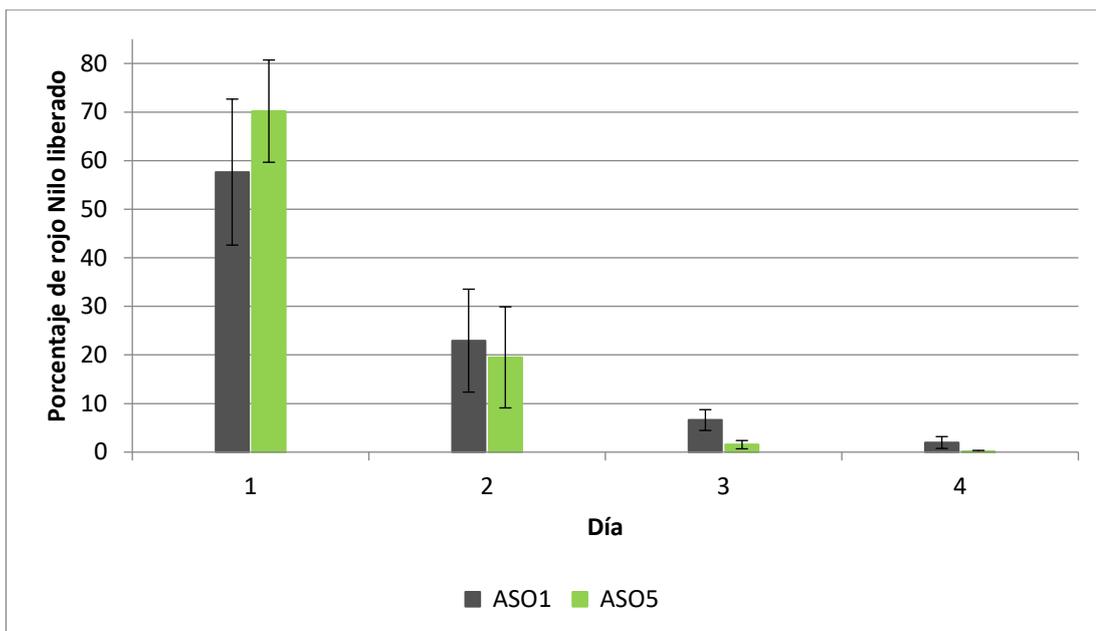


Figura 26. Porcentaje liberado por día de rojo Nilo de las microcápsulas de aceite de soya con 0,1 y 0,5% (w/v) de poloxamer.

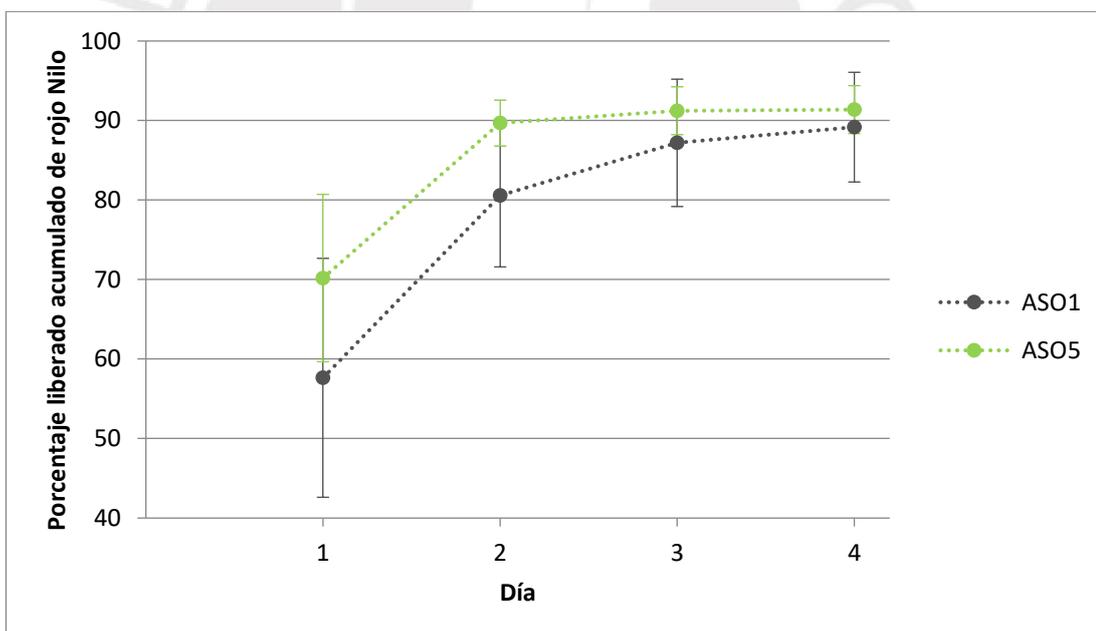


Figura 27. Porcentaje acumulado liberado por día de rojo Nilo de las microcápsulas de aceite de soya con 0,1% y 0,5% (w/v) de poloxamer.

Asimismo, se estudió el porcentaje liberado y acumulado por día de las microcápsulas de aceite de soya con 0,1% y 0,5% (w/v) de poloxamer (figuras 26 y 27 respectivamente). De nuevo, el porcentaje de encapsulamiento se obtuvo al restar

la cantidad de rojo Nilo inicial menos la cantidad liberada en el primer día. Es así como la muestra ASO1 obtuvo un 42% y de la muestra ASO5 obtuvo un 29,8% de aceite encapsulado.

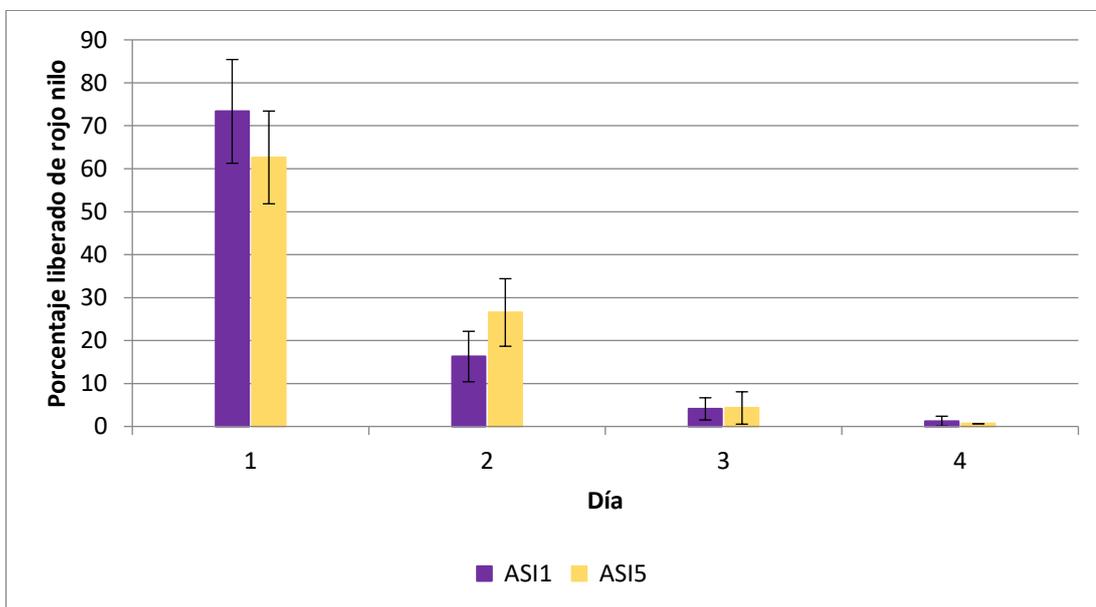


Figura 28. Porcentaje liberado por día de rojo Nilo de las microcápsulas de aceite de sachá inchi con 0,1% y 0,5% (w/v) de poloxamer.

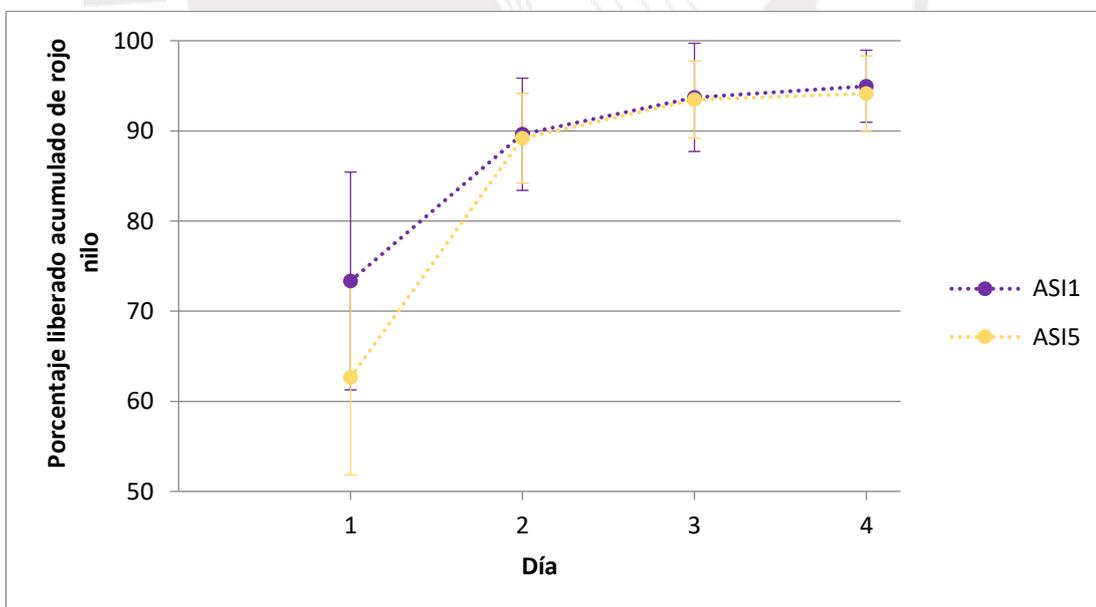


Figura 29. Porcentaje acumulado liberado por día de rojo Nilo de las microcápsulas de aceite de sachá inchi con 0,1% y 0,5% (w/v) de poloxamer.

La muestra figura 28 el porcentaje liberado por día y la figura 29 muestra el porcentaje liberado acumulado por día de rojo Nilo de las microcápsulas de aceite de sachá inchi. Si se analiza el porcentaje libre de rojo Nilo del día 1 se obtienen las eficiencias de encapsulamiento para las muestras ASI1 y ASI5 que son de 26,65% y 37,37% respectivamente. A diferencia de las muestras con aceite de oliva y de soja las microcápsulas con aceite de sachá inchi de 0,1% de poloxamer encapsularon menor cantidad de rojo Nilo que las de 0,5%. Esto podría deberse a las características fisicoquímicas de la fase orgánica (aceite de sachá inchi) que se empleó tales como el cambio de viscosidad o la densidad. Asimismo, la cantidad de poloxamer podría influir no solo en el tamaño de las cápsulas sino en la cantidad de aceite que se puede encapsular. Al cuarto día los porcentajes de aceite liberado acumulado fueron muy parecidos para ambas muestras independientemente de la cantidad de poloxamer que se utilizó.

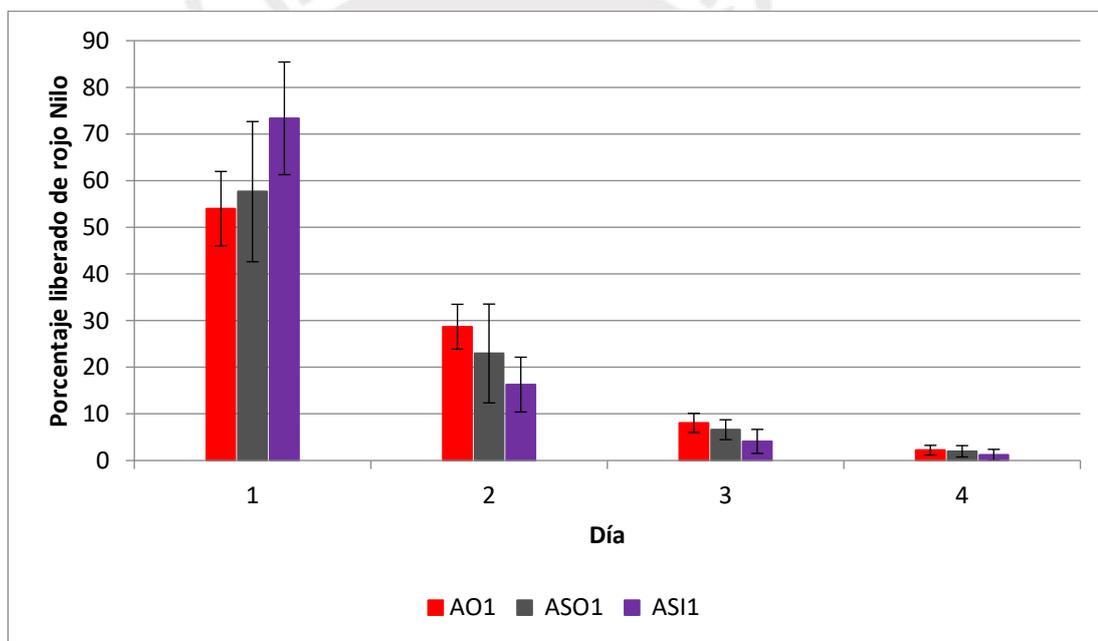


Figura 30. Porcentaje liberado de rojo Nilo por día de las microcápsulas de 0,1% (w/v) de poloxamer de aceite de oliva, soja y de sachá inchi.

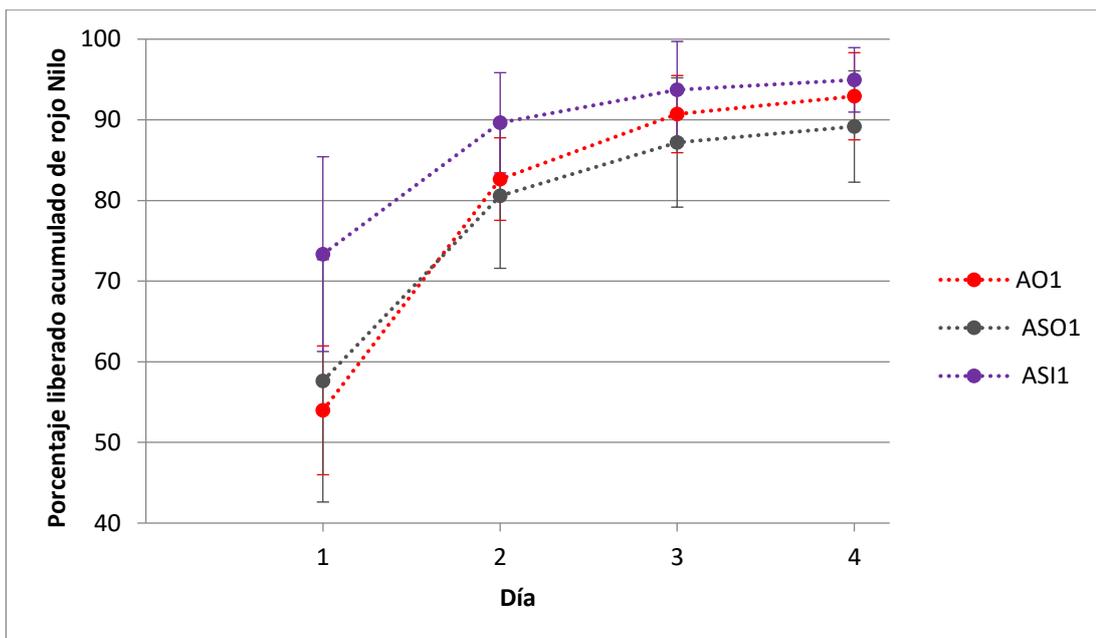


Figura 31. Porcentaje liberado acumulado de rojo Nilo por día de las microcápsulas de 0,1% (w/v) de poloxamer de aceite de oliva, de soja y de sachá inchi.

Las figuras 30 y 31 muestran la comparación entre la cantidad de rojo Nilo liberado de las distintas microcápsulas de aceite de oliva, vegetal y sachá inchi a una misma concentración de poloxamer. Se observa que las microcápsulas de sachá inchi poseen un menor porcentaje de encapsulamiento de rojo Nilo con respecto a las de aceite de soja y de oliva. No obstante, el porcentaje de rojo Nilo liberado acumulado se va homogenizando independientemente del aceite conforme transcurren los días.

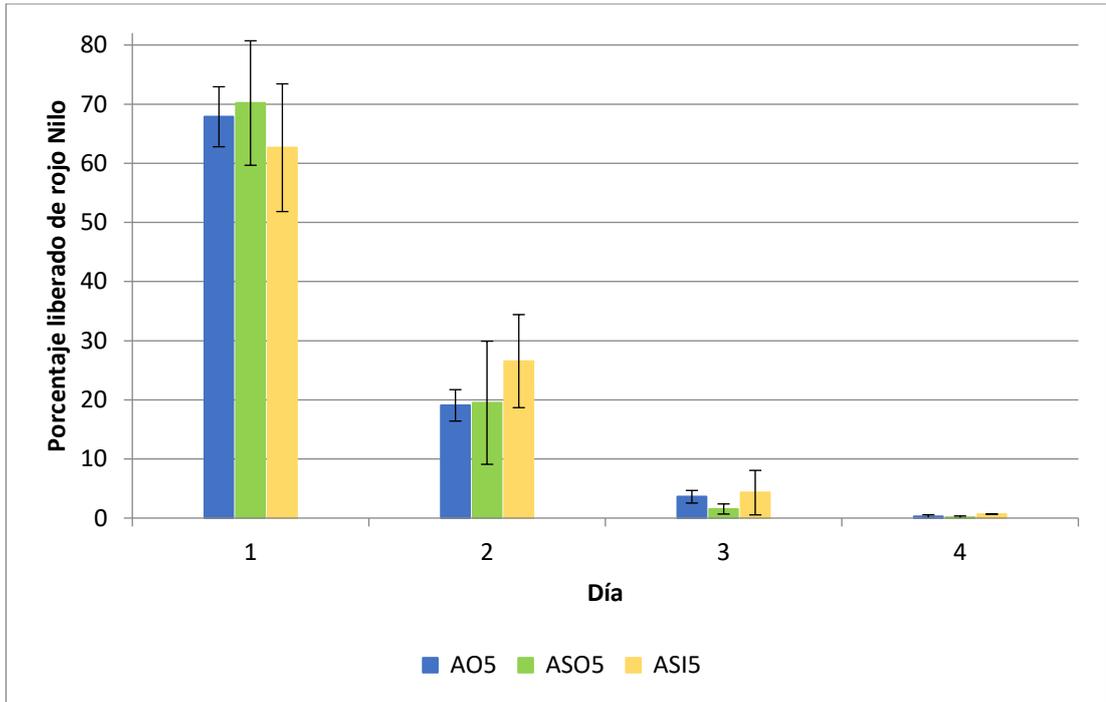


Figura 32. Porcentaje liberado de rojo Nilo por día de las microcápsulas de 0,5% de poloxamer de aceite de oliva, de soja y de sachá inchi.

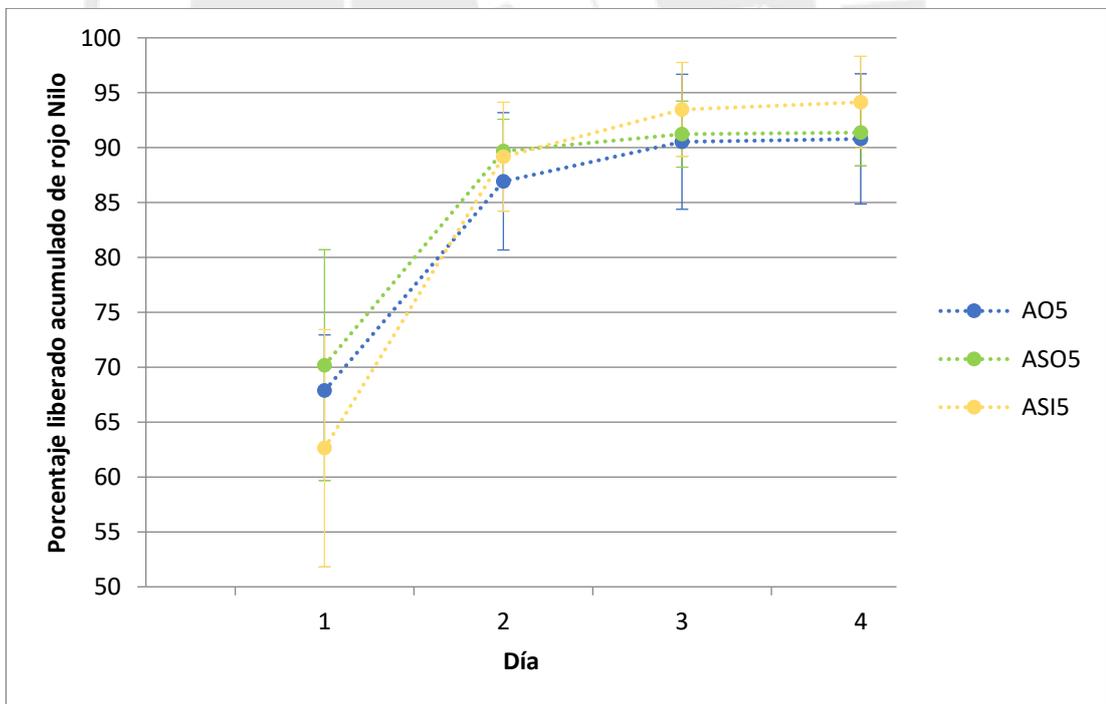


Figura 33. Porcentaje acumulado de rojo Nilo por día de las microcápsulas de 0,5% de poloxamer de aceite de oliva, de soja y de sachá inchi.

La figura 32 compara la cantidad de aceite liberado de las distintas microcápsulas de aceite de oliva, de soja y sachá inchi a una misma concentración de poloxamer y se observa que los tres tipos de microcápsulas poseen valores muy similares. Es por ello que a pesar de variar el tipo de aceite se puede concluir que para una concentración de poloxamer del 0,5% los resultados son más homogéneos. Asimismo, una característica de las microcápsulas con 0,1% y 0,5% de poloxamer es que muestran perfiles de liberación biexponenciales que consisten en una fase de rápida liberación, esto se debe por el aceite no encapsulado y por el aceite que se libera de la microcápsula, y luego una fase sostenida característico de los fármacos lipofílicos encapsulados en microcápsulas⁶⁴.

4.5. Actividad antioxidante

El método de decoloración de cationes radicalarios de ABTS^{•+}, que se basa en una transferencia de electrones, permitió medir la actividad antioxidante de los diversos compuestos presentes en las microcápsulas.

4.5.1. Actividad antioxidante de aceites

La figura 34 muestra la relación que hay entre el porcentaje de inhibición de radicales libres con respecto al tiempo. Se observa que a medida que aumenta la cantidad de minutos, el ABTS^{•+} reacciona con mayor cantidad de componentes antioxidantes presentes en el aceite y aumenta el porcentaje de inhibición y se mantienen los márgenes de error. Al minuto 1 se observa que el porcentaje de inhibición del aceite de sachá inchi alcanza valores más altos (75%) que el aceite de oliva y el de soja lo que se debe a la elevada cantidad de omega 3 y 6, tocoferoles, carotenos, componentes polifenólicos y fitosteroles¹⁸ en su composición. Cabe resaltar que tanto el aceite de oliva como el de sachá inchi presentan un alto contenido de tocoferoles. Sin embargo el γ -tocoferol, presente en el aceite de sachá inchi, posee una mayor capacidad antioxidante que los α -tocoferoles, presentes en el aceite de oliva^{21,65}. Por último, el aceite de soja es el que posee un porcentaje de inhibición más bajo, aun así por encima del 20%, debido a la cantidad de omega 6 presentes en su composición⁶⁶.

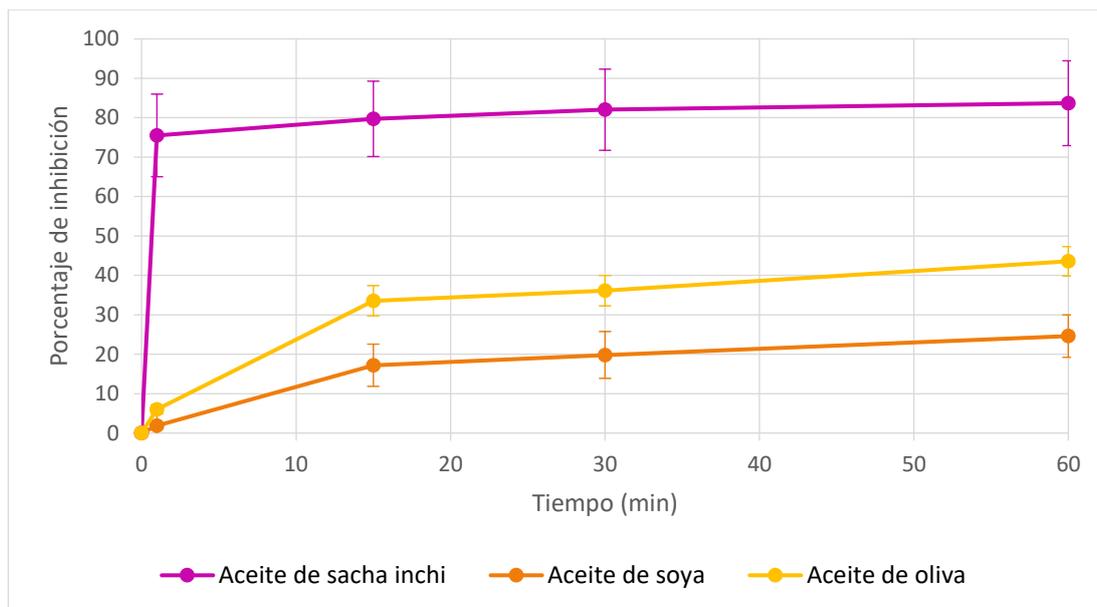


Figura 34. Porcentaje de inhibición radicalaria que presentan los aceites de sachu inchi, de soja y de oliva.

4.5.2. Actividad antioxidante de la matriz polimérica

El grupo de Anraku⁶⁷ y el de Kelishomi⁶⁸ demostraron que la quitosana y alginato si presentan propiedades antioxidantes. Se intentó cuantificar la actividad antioxidante de la matriz polimérica presente en las micropartículas por lo que se formaron micropartículas de hexano (muestra H, tabla 3). El hexano fue seleccionado porque al ser apolar permite, al igual que el aceite, sintetizar las microcápsulas, pero, no posee una actividad antioxidante por lo que solo se analizaría la actividad antioxidante de los polímeros. No obstante, no se pudo medir esta actividad debido a que al agregarlas a la solución de ABTS^{•+} dispersaron. Se determinó la actividad antioxidante de estos polisacáridos sin formar las microcápsulas. Se realizó el mismo procedimiento de la formación de las microcápsulas, pero no se le añadió aceite. Se liofilizó 1 mL de esta solución y se midió su actividad antioxidante. La figura 35 muestra el porcentaje de inhibición de la matriz polimérica (alginato + quitosana), de aproximadamente del 30%. Por otro lado, a pesar de no cuantificar el porcentaje de inhibición radicalaria de las microcápsulas si se observó una decoloración de la muestra H lo que demuestra que sí hay una actividad antioxidante de los polímeros cuando forman las micropartículas.

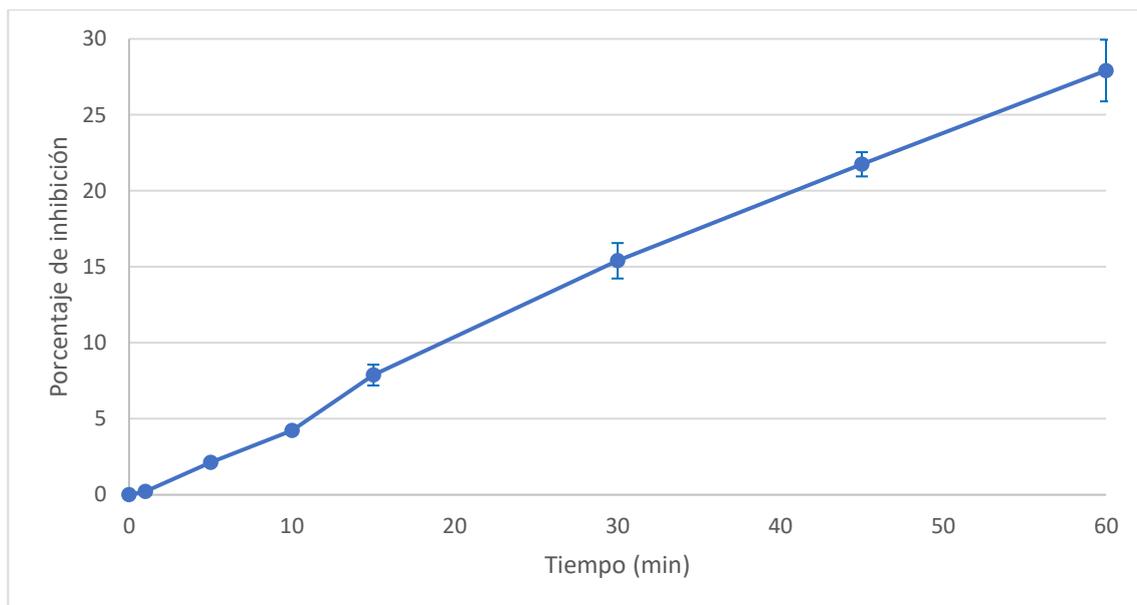


Figura 35. Porcentaje de inhibición radicalaria que presentan los polisacáridos de alginato y quitosana.

4.5.3. Actividad antioxidante de las micropartículas

Se compararon los porcentajes de inhibición radicalaria que poseen las microcápsulas de aceite de oliva elaboradas con diferentes concentraciones de poloxamer. Como se observa en la figura 36, conforme transcurre el tiempo, el porcentaje de inhibición aumenta porque las microcápsulas presentes liberan constantemente aceite y permiten que el ABTS^{•+} siga reaccionando. Asimismo, como se demostró no todo el rojo Nilo se encapsuló por lo que también está reaccionando el aceite no encapsulado. En el punto 4.4.3., las micropartículas con mayor cantidad de poloxamer poseen un menor porcentaje de encapsulamiento, por ende, más aceite libre, y este podría ser otro factor de porqué la muestra AO5 presenta un mayor porcentaje de inhibición con respecto a la muestra AO1, independientemente del tiempo.

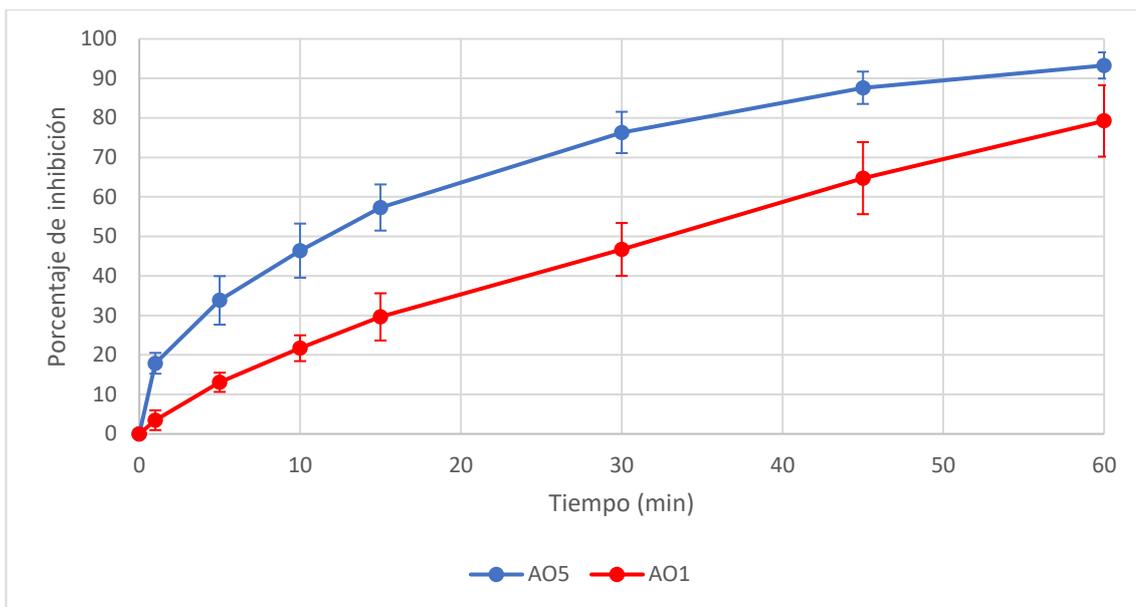


Figura 36. Porcentaje de inhibición radicalaria que presenta las distintas microcápsulas de aceite de oliva.

Así como se analizó la actividad antioxidante de las muestras con aceite de oliva, se analizaron las de aceite de soya. Como muestra la figura 37 la muestra ASO5 (mayor porcentaje de poloxamer) presentó un mayor porcentaje de inhibición radicalaria que la muestra ASO1 (menor porcentaje de poloxamer) de manera análoga a lo descrito para las muestras AO1 y AO5.

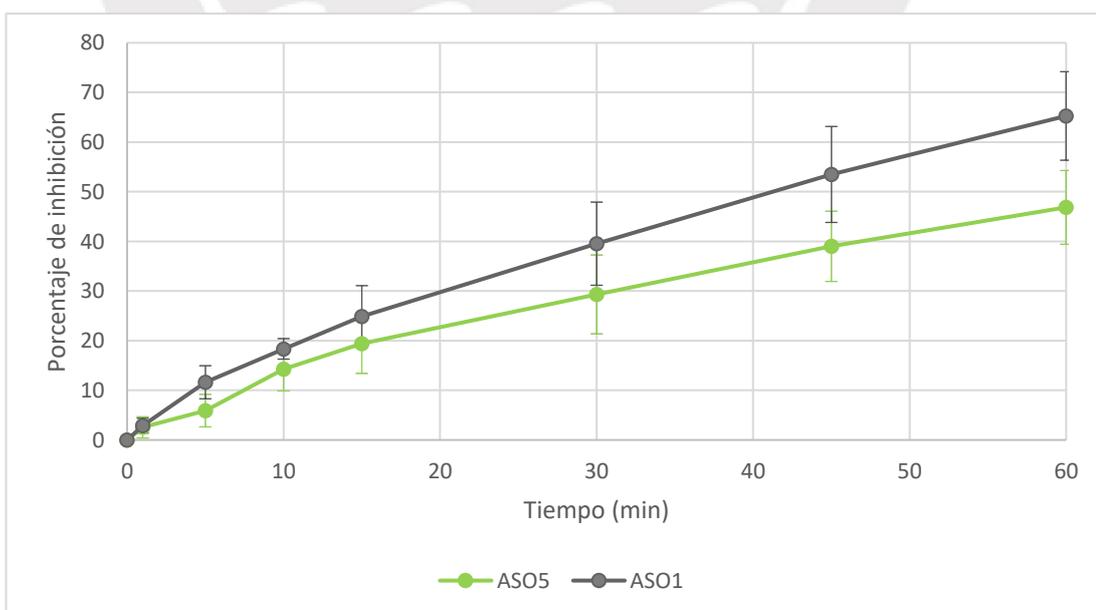


Figura 37. Porcentaje de inhibición radicalaria que presenta las distintas microcápsulas de aceite de soya.

Por último, al igual que las muestras anteriores se estudió el porcentaje de inhibición de las micropartículas de aceite de sachá inchi (figura 38). Después del primer minuto ambos porcentajes de inhibición alcanzaron valores superiores al 90%, esto se podría deber a los componentes antioxidantes presentes en el aceite de sachá inchi. Asimismo, a pesar de que la composición de poloxamer es distinta, para ambas muestras, sus porcentajes de inhibición fueron parecidos. Sin embargo, no queda claro si el alto porcentaje de inhibición radicalaria es producto del aceite de sachá inchi no encapsulado (libre) o si se liberó el aceite dentro de las microcápsulas y contribuyó a obtener este elevado valor a comparación del aceite de oliva y de soya.

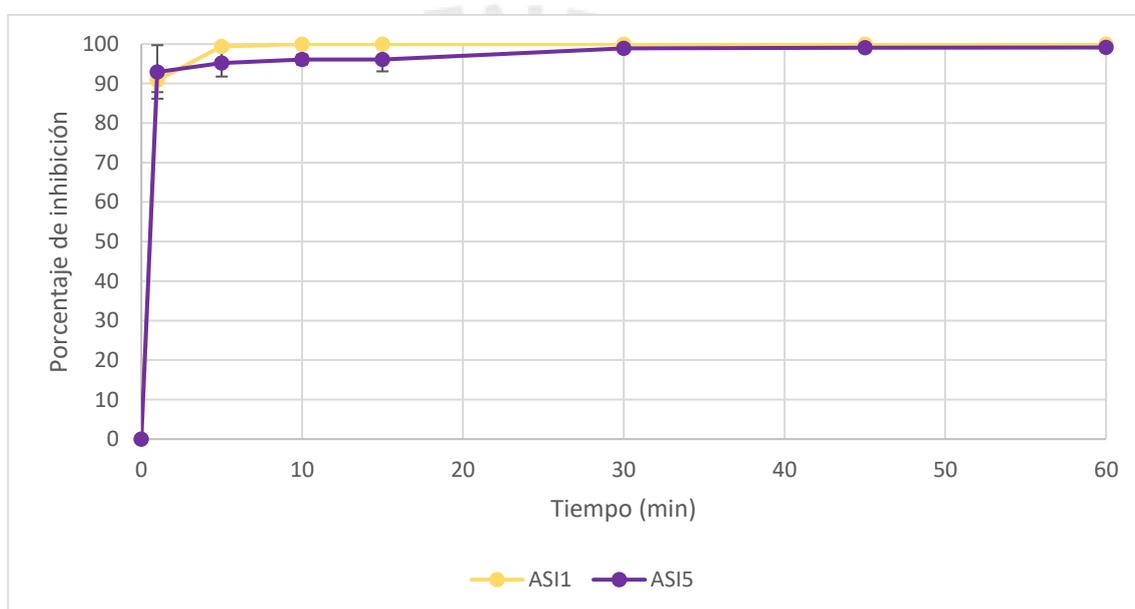


Figura 38. Porcentaje de inhibición radicalaria que presenta las distintas microcápsulas de aceite de sachá inchi (volumen liofilizado 1 mL).

Nuevamente se analizaron las microcápsulas de sachá inchi con 0,1 y 0,5% (w/v) de poloxamer, pero solamente se liofilizó 0,5 mL de la emulsión de las microcápsulas para analizarlas (figura 39). Los porcentajes de inhibición radicalaria entre los dos tipos de microcápsulas fueron muy parecidos entre sí. Esto prueba que la diferencia de poloxamer no afecta en el porcentaje de inhibición con respecto al tiempo. A su vez, se observó que a pesar de tener aceite no encapsulado el porcentaje de inhibición no aumentó abruptamente como en la figura 38, sino que hubo un aumento constante hasta los 15 minutos y recién al minuto 30 el porcentaje de inhibición se estabilizó. Esto podría demostrar una liberación de los agentes antioxidantes,

presentes en el aceite de sacha inchi, a través de las microcápsulas.

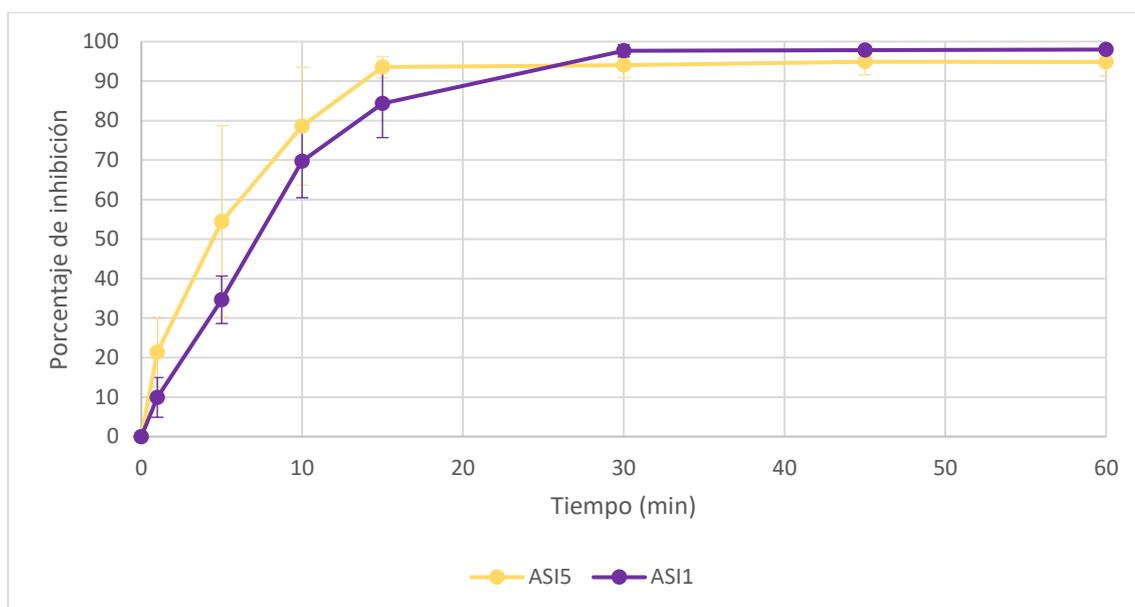


Figura 39. Porcentaje de inhibición radicalaria que presenta las distintas microcápsulas de aceite de sacha inchi (volumen liofilizado 0,5 mL).

Se comparó la actividad antioxidante de 1 mL de la emulsión liofilizada de microcápsulas de aceite de soja y de oliva y de 0,5 mL de la emulsión liofilizada de las microcápsulas con las de aceite de sacha inchi, todas con una misma concentración de poloxamer (0,1% (w/v)). Como muestra la figura 40, la muestra ASI1 posee un mayor porcentaje de inhibición a pesar de utilizar un menor de volumen liofilizado en comparación a los otros tipos de microcápsulas, luego le sigue la muestra AO1 y por último la muestra AV1. La marcada diferencia del porcentaje de inhibición que presentan las microcápsulas de aceite de sacha inchi en comparación a las de aceite de oliva y de soja podría ser por la composición de agentes antioxidantes que presentan. Como se mencionó antes, el aceite de sacha inchi posee varios agentes antioxidantes como los γ -tocoferoles, los cuales, son mejores que cualquier otro tipo de tocoferol. A su vez se observa que, a medida que pasa el tiempo, el porcentaje de inhibición de las muestras aumenta. Esto podría significar que continúa la liberación de aceite de las microcápsulas o que el $ABTS^{*+}$ siga reaccionando con los agentes antioxidantes presentes en la muestra.

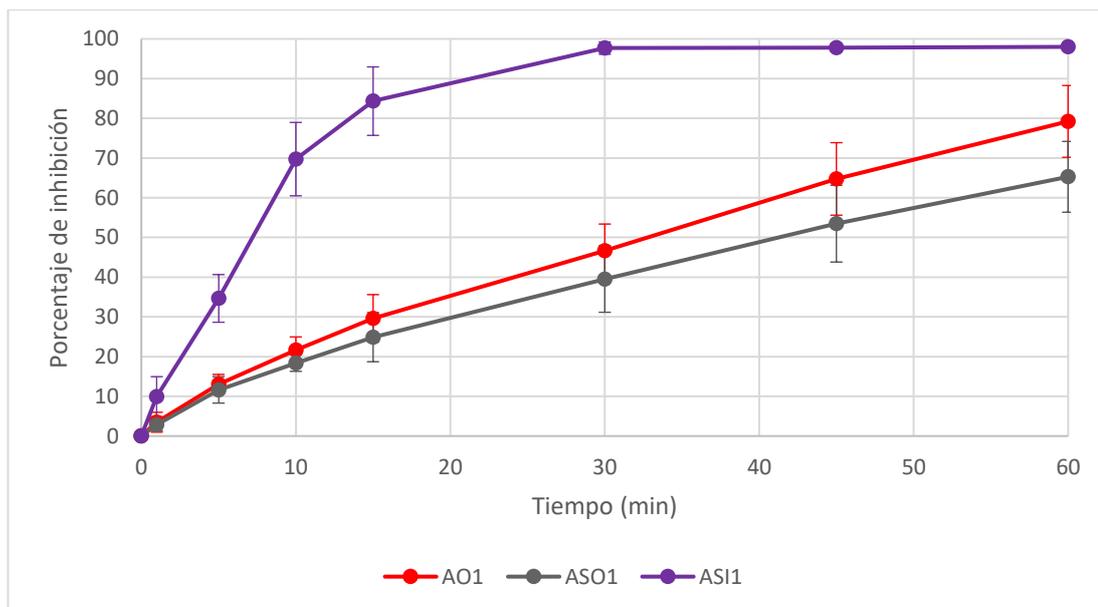


Figura 40. Porcentaje de inhibición radicalaria de las microcápsulas que contienen aceites de sacha inchi, de soja y oliva con 0,1% (w/v) de poloxamer.

Por último, se comparó la actividad antioxidante de las microcápsulas con una concentración de poloxamer de 0,5% (w/v) y se varió el aceite a encapsular (figura 41). Los porcentajes de inhibición son mayores que los de la figura 40 y esto se debe a la mayor cantidad de aceite libre no encapsulado con respecto a las de poloxamer de 0,1% (w/v) y esto podría explicar un mayor porcentaje de inhibición. Al igual que la figura 40 las microcápsulas de aceite de sacha inchi poseen un porcentaje de inhibición mayor que la de los otros aceites y se debe principalmente a los componentes que presenta en su composición.

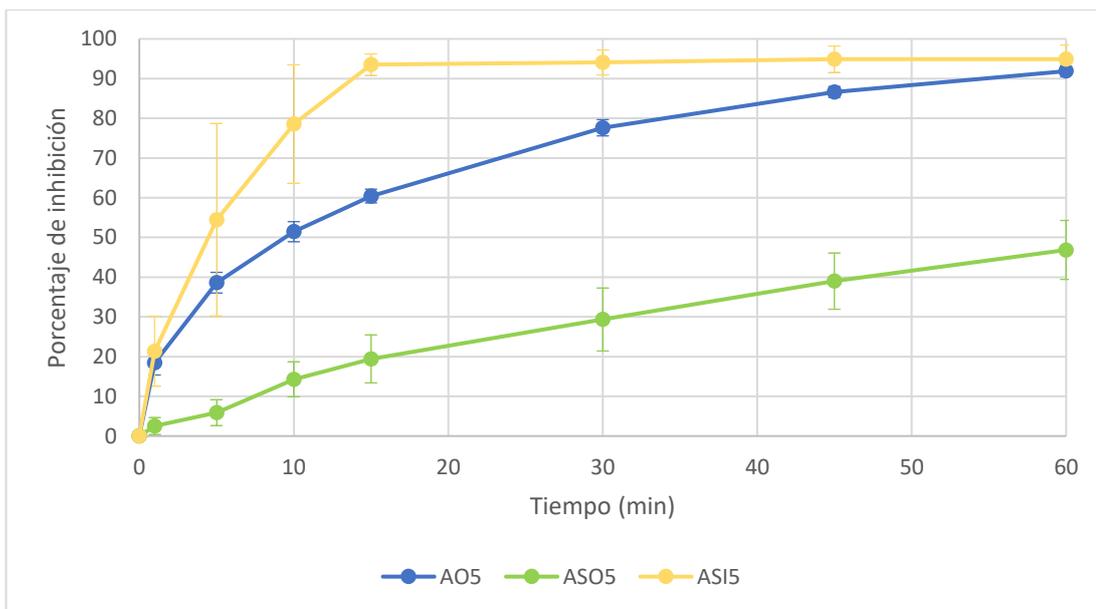
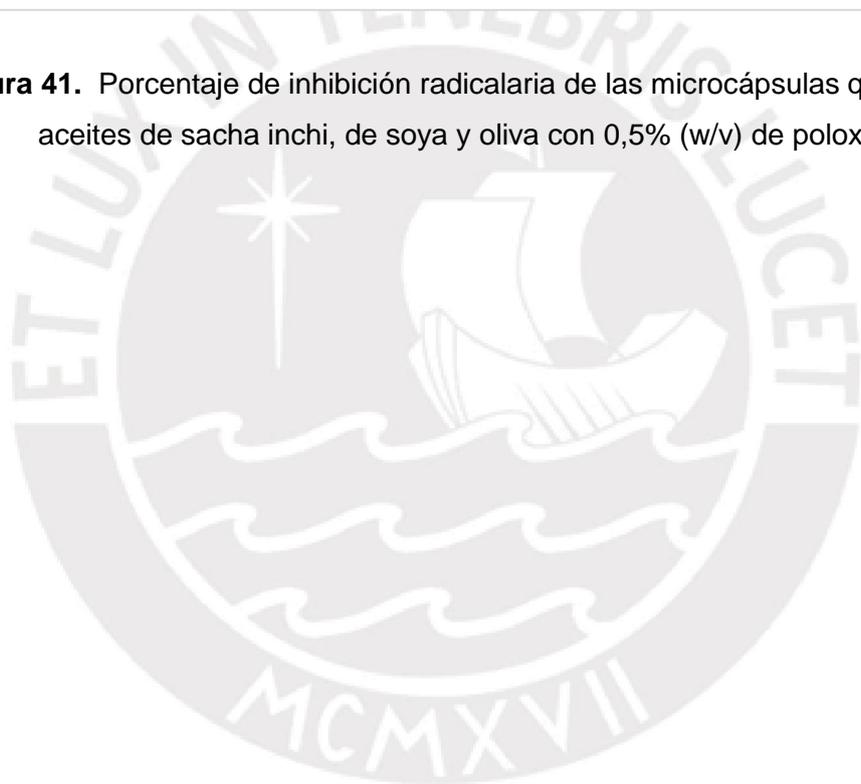


Figura 41. Porcentaje de inhibición radicalaria de las microcápsulas que contienen aceites de sachu inchi, de soya y oliva con 0,5% (w/v) de poloxamer.



5. Conclusiones y recomendaciones

5.1. Conclusiones

- Las micropartículas de alginato con quitosana con una mayor cantidad de poloxamer poseen un menor tamaño.
- La estabilidad de las micropartículas con respecto al tiempo muestra que las de 0,1% de poloxamer son menos estables que las de 0,5% y esto se demuestra por la separación de fases que presenta la emulsión después de la cuarta semana tras ser elaboradas.
- El aceite de sacha inchi posee un mayor porcentaje de inhibición oxidativa con respecto al aceite vegetal y el aceite de oliva debido a los agentes antioxidantes presentes en su composición.
- Las microcápsulas de aceite de sacha inchi presentan un mayor porcentaje de inhibición oxidativa a diferencia de las micropartículas de aceite de oliva y de soya.

5.2. Recomendaciones

- Se recomienda analizar el tamaño de las micropartículas, el IPD y el potencial zeta las dos fases que forma la emulsión de microcápsulas por un periodo de tiempo más largo para observar mejor su estabilidad.
- Mejorar el procedimiento de liberación de aceite. Después de lavar las microcápsulas ponerlas en un medio con un pH controlado y por medio de diálisis observar cómo liberan el componente activo que poseen.
- Se podría medir la liberación del aceite midiendo la liberación de carotenos, tocoferoles o algún componente activo en ultravioleta-visible utilizando un estándar por medio de la técnica de UV-Vis.

6. Bibliografía

- (1) Fang, Z. Encapsulation of Polyphenols - a Review. *Trends Food Sci. Technol.* **2010**, 21 (10), 510–523.
- (2) Mora-huertas, C. E.; Fessi, H.; Elaissari, A. Polymer-Based Nanocapsules for Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* **2010**, 385, 113–142.
- (3) Dozie-Nwachukwu, S. O.; Danyuo, Y.; Obayemi, J. D.; Odusanya, O. S.; Malatesta, K.; Soboyejo, W. O. Extraction and Encapsulation of Prodigiosin in Chitosan Microspheres for Targeted Drug Delivery. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, 71, 268–278.
- (4) Sinha, V. R.; Singla, A. K.; Wadhawan, S.; Kaushik, R.; Kumria, R.; Bansal, K.; Dhawan, S. Chitosan Microspheres as a Potential Carrier for Drugs. *Int. J. Pharm.* **2004**, 274 (1–2), 1–33.
- (5) Khan, T. A.; Peh, K. K.; Chang, H. S. Reporting Degree of Deacetylation Values of Chitosan: The Influence of Analytical Methods. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2002**, 5 (3), 205–212.
- (6) George, M.; Abraham, T. E. Polyionic Hydrocolloids for the Intestinal Delivery of Protein Drugs: Alginate and Chitosan - a Review. *J. Control. Release* **2006**, 114 (1), 1–14.
- (7) Agnihotri, S. A.; Mallikarjuna, N. N.; Aminabhavi, T. M. Recent Advances on Chitosan-Based Micro- and Nanoparticles in Drug Delivery. *J. Control. Release* **2004**, 100 (1), 5–28.
- (8) Rinaudo, M. Chitin and Chitosan: Properties and Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, 31 (7), 603–632.
- (9) Kanauchi, O.; Deuchi, K.; Imasato, Y.; Shizukuishi, M.; Kobayashi, E. Mechanism for the Inhibition of Fat Digestion by Chitosan and for the Synergistic Effect of Ascorbate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1995**, 59 (5), 786–790.
- (10) Gombotz, W. R.; Wee, S. Protein Release from Alginate Matrixes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, 31 (3), 267–285.
- (11) Linker, A.; Russell, J. A New Polysaccharide Resembling Alginic Acid Isolated from Pseudomonads. *J. Biol. Chem.* **1966**, 241, 3845–3851.

- (12) McHugh, D. Production, Properties and Uses of Alginates. En Production and utilization of products from commercial seaweeds <http://www.fao.org/docrep/x5822e/x5822e00.htm#Contents> (accedido el 10 de abril del 2017).
- (13) Tønnesen, H. H.; Karlsen, J. Alginate in Drug Delivery Systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2002**, *28* (6), 621–630.
- (14) De Vos, P.; De Haan, B.; Pater, J.; Van Schilfgaarde, R. Association between Capsule Diameter, Adequacy of Encapsulation, and Survival of Microencapsulated Rat Islet Allografts. *Transplantation* **1996**, *62* (7), 893–899.
- (15) Zimmermann, U.; Klöck, G.; Federlin, K.; Hannig, K.; Kowalski, M.; Bretzel, R. G.; Horcher, A.; Entenmann, H.; Sieber, U.; Zekorn, T. Production of Mitogen-contamination Free Alginates with Variable Ratios of Mannuronic Acid to Guluronic Acid by Free Flow Electrophoresis. *Electrophoresis* **1992**, *13* (1), 269–274.
- (16) Chirinos, R.; Zuloeta, G.; Pedreschi, R.; Mignolet, E.; Larondelle, Y.; Campos, D. Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*): A Seed Source of Polyunsaturated Fatty Acids, Tocopherols, Phytosterols, Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity. *Food Chem.* **2013**, *141* (3), 1732–1739.
- (17) Guillen, M. D.; Ruiz, A.; Cabo, N.; Chirinos, R.; Pascual, G. Characterization of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) Oil by FTIR Spectroscopy and ¹H NMR. Comparison with Linseed Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2003**, *80* (8), 755–762.
- (18) Fanali, C.; Dugo, L.; Cacciola, F.; Beccaria, M.; Grasso, S.; Dachà, M.; Dugo, P.; Mondello, L. Chemical Characterization of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) Oil. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59* (24), 13043–13049.
- (19) Sathe, S. K.; Kshirsagar, H. H.; Sharma, G. M. Solubilization, Fractionation, and Electrophoretic Characterization of Inca Peanut (*Plukenetia volubilis* L.) Proteins. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2012**, *67* (3), 247–255.
- (20) Liu, Q.; Xu, Y. K.; Zhang, P.; Na, Z.; Tang, T.; Shi, Y. X. Chemical Composition and Oxidative Evolution of Sacha Inchi (*Plukentia volubilis* L.) Oil from Xishuangbanna (China). *Grasas Aceites* **2014**, *65*, 1–10.
- (21) Saldeen, T.; Li, D.; Mehta, J. L. Differential Effects of α - and γ -Tocopherol on Low-Density Lipoprotein Oxidation, Superoxide Activity, Platelet Aggregation and Arterial Thrombogenesis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **1999**, *34* (4), 1208–1215.

- (22) Wagner, K. H.; Kamal-Eldin, A.; Elmadfa, I. Gamma-Tocopherol - An Underestimated Vitamin? *Ann. Nutr. Metab.* **2004**, *48* (3), 169–188.
- (23) Carrasco-Pancorbo, A.; Cerretani, L.; Bendini, A.; Segura-Carretero, A.; Del Carlo, M.; Gallina-Toschi, T.; Lercker, G.; Compagnone, D.; Fernández-Gutiérrez, A. Evaluation of the Antioxidant Capacity of Individual Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (23), 8918–8925.
- (24) Tripoli, E.; Giammanco, M.; Tabacchi, G.; Di Majo, D.; Giammanco, S.; La Guardia, M. The Phenolic Compounds of Olive Oil: Structure, Biological Activity and Beneficial Effects on Human Health. *Nutr. Res. Rev.* **2005**, *18* (01), 98.
- (25) Servili, M.; Esposto, S.; Fabiani, R.; Urbani, S.; Taticchi, A.; Mariucci, F.; Selvaggini, R.; Montedoro, G. F. Phenolic Compounds in Olive Oil: Antioxidant, Health and Organoleptic Activities According to Their Chemical Structure. *Inflammopharmacology* **2009**, *17* (2), 76–84.
- (26) Agnihotri, N.; Mishra, R.; Goda, C.; Arora, M. Microencapsulation – A Novel Approach in Drug Delivery : A Review. *J. Pharm. Sci.* **2012**, *2* (1), 1–20.
- (27) Flores-Belmont, I. .; Jiménez-Munguía, M. . Microencapsulación de Compuestos Activos Con Quitosano. *Temas Sel. Ing. Aliment.* **2013**, *7* (1), 48–56.
- (28) Quiróz Oropeza, J. G.; Espinosa Reynoso, J.; Castolo Cortés, D. MICROCÁPSULAS. http://www.geocities.ws/tecno_farma/microcapsulas.htm (accedido el 9 de mayo del 2017).
- (29) Huang, H.-J.; Yuan, W.-K.; Chen, X. D. Microencapsulation Based on Emulsification for Producing Pharmaceutical Products: A Literature Review. *Dev. Chem. Eng. Miner. Process.* **2006**, *14* (3–4), 515–544.
- (30) Li, M.; Rouaud, O.; Poncelet, D. Microencapsulation by Solvent Evaporation: State of the Art for Process Engineering Approaches. *Int. J. Pharm.* **2008**, *363* (1–2), 26–39.
- (31) Angelova, N.; Hunkeler, D. Rationalizing the Design of Polymeric Biomaterials. *Trends Biotechnol.* **1999**, *17* (10), 409–421.
- (32) Tyagi, V. V.; Kaushik, S. C.; Tyagi, S. K.; Akiyama, T. Development of Phase Change Materials Based Microencapsulated Technology for Buildings: A Review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2011**, *15* (2), 1373–1391.

- (33) Morimoto, K.; Katsumata, H.; Yabuta, T.; Iwanaga, K.; Kakemi, M.; Tabata, Y.; Ikada, Y. Evaluation of Gelatin Microspheres for Nasal and Intramuscular Administrations of Salmon Calcitonin. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *13* (2), 179–185.
- (34) Del Río, J.; Marino, O. Determinación de La Actividad Antioxidante de 30 Plantas Recolectadas En La Ecoregión Cafetera. Universidad Tecnológica de Pereira. Tesis de licenciatura, 2013.
- (35) Erel, O. A Novel Automated Direct Measurement Method for Total Antioxidant Capacity Using a New Generation, More Stable ABTS Radical Cation. *Clin. Biochem.* **2004**, *37* (4), 277–285.
- (36) Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant Activity Applying an Improved Abts Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26* (9), 1231–1237.
- (37) Zulueta, A.; Esteve, M. J.; Frígola, A. ORAC and TEAC Assays Comparison to Measure the Antioxidant Capacity of Food Products. *Food Chem.* **2009**, *114* (1), 310–316.
- (38) Silva, R. de J. M. da. Sonoproduction of Particles for Delivery Purposes. Tesis doctoral, Universidad de Minho, 2011.
- (39) Silva, R.; Ferreira, H.; Cavaco-Paulo, A. Sonoproduction of Liposomes and Protein Particles as Templates for Delivery Purposes. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (10), 3353–3368.
- (40) Mastai, Y.; Gedanken, A. *Sonochemistry and Other Novel Methods Developed for the Synthesis of Nanoparticles*; 2004; Vol. 1, pp 113-163.
- (41) Natrajan, D.; Srinivasan, S.; Sundar, K.; Ravindran, A. Formulation of Essential Oil-Loaded Chitosan-Alginate Nanocapsules. *J. Food Drug Anal.* **2015**, *23* (3), 560–568.
- (42) Lertsutthiwong, P.; Rojsitthisak, P.; Nimmannit, U. Preparation of Turmeric Oil-Loaded Chitosan-Alginate Biopolymeric Nanocapsules. *Mater. Sci. Eng. C* **2009**, *29* (3), 856–860.
- (43) Gülçin, I.; Elmastaş, M.; Aboul-Enein, H. Y. Antioxidant Activity of Clove Oil - A Powerful Antioxidant Source. *Arab. J. Chem.* **2012**, *5* (4), 489–499.
- (44) Sousa, F.; Guebitz, G. M.; Kokol, V. Antimicrobial and Antioxidant Properties

- of Chitosan Enzymatically Functionalized with Flavonoids. *Process Biochem.* **2009**, *44* (7), 749–756.
- (45) Pedro, A. S.; Cabral-Albuquerque, E.; Ferreira, D.; Sarmiento, B. Chitosan: An Option for Development of Essential Oil Delivery Systems for Oral Cavity Care? *Carbohydr. Polym.* **2009**, *76* (4), 501–508.
- (46) Lertsutthiwong, P.; Rojsitthisak, P. Chitosan-Alginate Nanocapsules for Encapsulation of Turmeric Oil. *Pharmazie* **2011**, *66* (12), 911–915.
- (47) Rajaonarivony, M.; Vauthier, C.; Couarraze, G.; Puisieux, F.; Couvreur, P. Development of a New Drug Carrier Made from Alginate. *J. Pharm. Sci.* **1993**, *82* (9), 912–917.
- (48) Dumortier, G.; Grossiord, J. L.; Agnely, F.; Chaumeil, J. C. A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. *Pharm. Res.* **2006**, *23* (12), 2709–2728.
- (49) Behrend, O.; Ax, K.; Schubert, H. Influence of Continuous Phase Viscosity on Emulsification by Ultrasound. *Ultrason. Sonochem.* **2000**, *7* (2), 77–85.
- (50) Tzoumaki, M. V.; Moschakis, T.; Kiosseoglou, V.; Biliaderis, C. G. Oil-in-Water Emulsions Stabilized by Chitin Nanocrystal Particles. *Food Hydrocoll.* **2011**, *25* (6), 1521–1529.
- (51) Mathapa, B. G.; Paunov, V. N. Cyclodextrin Stabilised Emulsions and Cyclodextrinosomes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (41), 17903.
- (52) Saravanan, M.; Rao, K. P. Pectin-Gelatin and Alginate-Gelatin Complex Coacervation for Controlled Drug Delivery: Influence of Anionic Polysaccharides and Drugs Being Encapsulated on Physicochemical Properties of Microcapsules. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *80* (3), 808–816.
- (53) Anton, N.; Benoit, J. P.; Saulnier, P. Design and Production of Nanoparticles Formulated from Nano-Emulsion Templates-A Review. *J. Control. Release* **2008**, *128* (3), 185–199.
- (54) Gómez-Ordóñez, E.; Rupérez, P. FTIR-ATR Spectroscopy as a Tool for Polysaccharide Identification in Edible Brown and Red Seaweeds. *Food Hydrocoll.* **2011**, *25* (6), 1514–1520.
- (55) Xu, Y. X.; Kim, K. M.; Hanna, M. A.; Nag, D. Chitosan–starch Composite Film: Preparation and Characterization. *Ind. Crops Prod.* **2005**, *21*, 185–192.

- (56) Faramarzi, M. A.; Naghibzadeh, M.; Amani, A.; Amini, M.; Esmailzadeh, E.; Mottaghi-Dastjerdi, N. An Insight into the Interactions Between-Tocopherol and Chitosan in Ultrasound-Prepared Nanoparticles. *J. Nanomater.* **2010**, 2010.
- (57) Sakkayawong, N.; Thiravetyan, P.; Nakbanpote, W. Adsorption Mechanism of Synthetic Reactive Dye Wastewater by Chitosan. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, 286 (1), 36–42.
- (58) Maurer, N. E.; Hatta-Sakoda, B.; Pascual-Chagman, G.; Rodriguez-Saona, L. E. Characterization and Authentication of a Novel Vegetable Source of Omega-3 Fatty Acids, Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) Oil. *Food Chem.* **2012**, 134 (2), 1173–1180.
- (59) Douglas, K. L.; Tabrizian, M. Effect of Experimental Parameters on the Formation of Alginate-Chitosan Nanoparticles and Evaluation of Their Potential Application as DNA Carrier. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2005**, 16 (1), 43–56.
- (60) Plenderleith, R.; Swift, T.; Rimmer, S. Highly-Branched Poly(N-Isopropyl Acrylamide)s with Core-shell Morphology below the Lower Critical Solution Temperature. *RSC Adv.* **2014**, 4 (92), 50932–50937.
- (61) Kucherak, O. A.; Oncul, S.; Darwich, Z.; Yushchenko, D. A.; Arntz, Y.; Didier, P.; Mély, Y.; Klymchenko, A. S. Switchable Nile Red-Based Probe for Cholesterol and Lipid Order at the Outer Leaflet of Biomembranes. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132 (13), 4907–4916.
- (62) Fontana, M. C.; Coradini, K.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; Beck, R. C. R. Nanocapsules Prepared from Amorphous Polyesters: Effect on the Physicochemical Characteristics, Drug Release, and Photostability. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2010**, 10 (5), 3091–3099.
- (63) Pohlmann, A. R.; Fonseca, F. N.; Paese, K.; Detoni, C. B.; Coradini, K.; Beck, R. C.; Guterres, S. S. Poly(ϵ -Caprolactone) Microcapsules and Nanocapsules in Drug Delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2013**, 10 (5), 623–638.
- (64) Oliveira, C. P.; Venturini, C. G.; Donida, B.; Poletto, F. S.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. An Algorithm to Determine the Mechanism of Drug Distribution in Lipid-Core Nanocapsule Formulations. *Soft Matter* **2013**, 9 (4), 1141–1150.
- (65) MacWilliam, L. What Makes Gamma Tocopherol Superior to Alpha Tocopherol http://www.lifeextension.com/Magazine/2006/4/report_gamma/Page-01 (accedido el 2 de marzo del 2018).

- (66) Orsavova, J.; Misurcova, L.; Vavra Ambrozova, J.; Vicha, R.; Mlcek, J. Fatty Acids Composition of Vegetable Oils and Its Contribution to Dietary Energy Intake and Dependence of Cardiovascular Mortality on Dietary Intake of Fatty Acids. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16* (6), 12871–12890.
- (67) Anraku, M.; Fujii, T.; Furutani, N.; Kadowaki, D.; Maruyama, T.; Otagiri, M.; Gebicki, J. M.; Tomida, H. Antioxidant Effects of a Dietary Supplement: Reduction of Indices of Oxidative Stress in Normal Subjects by Water-Soluble Chitosan. *Food Chem. Toxicol.* **2009**, *47* (1), 104–109.
- (68) Kelishomi, Z. H.; Goliaei, B.; Mahdavi, H.; Nikoofar, A.; Rahimi, M.; Moosavi-Movahedi, A. A.; Mamashli, F.; Bigdeli, B. Antioxidant Activity of Low Molecular Weight Alginate Produced by Thermal Treatment. *Food Chem.* **2016**, *196*, 897–902.

