

Microencapsulación de aceite de pomelo por gelificación iónica externa y extrusión de alginato

Liliana M. CÁCERES^(1,2), Rocío VARGAS^(1,2), Gustavo VELASCO^(1,2), Ester CHAMORRO^(1,2)

⁽¹⁾ Centro de Investigación de Química Orgánica Biológica (QUIMOBIO), UTN-FRRe, French 414, Resistencia, Chaco, Argentina.

⁽²⁾ Instituto de Modelado e Innovación Tecnológica (IMIT-CONICET), Libertad 5460, Corrientes, Argentina.

E-mail de contacto: lmarielc@yahoo.com.ar

Resumen

Se estudió la encapsulación del aceite de pomelo con alto contenido de limoneno por gelificación iónica externa acoplada a una extrusión, utilizando alta carga de aceite. Se encontró que la concentración de la solución reticulante de cloruro de calcio y tiempo de curado tienen cada uno una influencia significativa en la eficiencia y el rendimiento de encapsulación. Se obtuvieron capsulas esféricas con una eficiencia máxima de 53,01% y un rendimiento del 89,15% con concentración de cloruro del calcio del 20%p/p y 3 minutos de curado. Se modelizó el proceso encontrando las ecuaciones de optimización de las variables respuesta.

Palabras Claves: aceite esencial; alginato; encapsulación; gelificación

Abstract

High limonene content grapefruit oil encapsulation was studied by external ionic gelation coupled to an extrusion, using high oil load. It was found that the concentration of the calcium chloride crosslinking solution and cure time each have a significant influence on the efficiency and encapsulation performance. Spherical capsules were obtained with a maximum efficiency of 53.01% and a yield of 89.15% with a concentration of calcium chloride of 20% w / w and 3 minutes of curing. The process was modeled finding the optimization equations of the response variables.

Keywords: encapsulation; gelation; alginate; essential oil

1. Introducción y Objetivos

1.1. Consideraciones Generales

Los aceites esenciales son utilizados como sabores y aromas en los alimentos. Sin embargo estos compuestos presentan alta volatilidad y alta inestabilidad química en presencia de aire, luz, humedad y altas temperaturas. Por lo tanto, es beneficioso encapsular estos ingredientes antes de su uso en alimentos o bebidas para limitar la degradación o pérdida de aroma durante el procesamiento y almacenamiento, Jun-Xia y col (2012). Las microcápsulas se describen como un tipo de envase en miniatura o envoltura en el que los compuestos bioactivos están encapsulados por un biopolímero. Se pueden usar para solidificar materiales líquidos, y así facilitar su transporte, además de mantener la estabilidad de los compuestos bioactivos protegiéndolos contra los peligros externos, Liu y col (2012). El concepto de encapsulación se ha fundamentado en la incorporación de una matriz polimérica, la cual forma un ambiente capaz de controlar su interacción con el exterior. Estas matrices suelen estar conformadas por hidrocoloides debido a su capacidad para absorber agua, fácil manipulación e inocuidad, Lupo Pasin, y col (2012). El alginato es uno de los hidrocoloides más interesante como polímero de pared o componente de revestimiento debido a sus propiedades coloidales únicas, que incluyen espesamiento, estabilización, suspensión, formación de película, producción de gel y estabilización de emulsión, Rhim (2004). Asimismo es de importancia para las industrias alimenticias la capacidad de las soluciones de alginato para experimentar una transición de sol-gel independiente de la temperatura en presencia de cationes multivalentes como el Ca^{+2} , Smidsrod y Draget (1996). Esta característica del alginato se la aprovecha en el proceso de gelificación iónica, donde se reticula el hidrogel con una solución del cloruro de calcio, Mahdi y col (2016). Se puede adosar a este proceso de gelificación externa una extrusión para encapsular una alta carga de aceite, Chan (2011), utilizando una bomba jeringa, Pasukamonset y col (2016).

El objetivo de este estudio fue encapsular aceite esencial de pomelo con alto contenido de limoneno en microcápsulas de alginato de calcio por gelificación iónica externa y extrusión. El aceite así encapsulado puede ser utilizado en la industria alimentaria dispersando las microcápsulas en mezclas, masas, emulsiones, o líquidos, aprovechando las propiedades del limoneno contenido en él. Se estudió también la influencia de parámetros del proceso de reticulación, tales como la concentración de cloruro de calcio y el tiempo de curado sobre la eficiencia y el rendimiento de encapsulación con alta carga de aceite.

2. Metodología

2.1. Materiales

Se utilizó alginato de sodio (Aldrich), cloruro de calcio anhidro (Cicarelli, p.a.), alcohol ter-butílico (Anedra, p.a.), patrón cromatográfico de R-(+)-Limoneno (Aldrich, 97%), agua desionizada. El aceite de pomelo fue proporcionado por la empresa Magger Cítricos del Valle de la provincia de Corrientes.

2.2. Obtención de Microcápsulas

Se prepararon las siguientes soluciones: solución reticulante de cloruro de calcio al 10, 20 y 30% p/v, y solución de alginato de sodio al 1% p/v. Se utilizó un agitador compacto digital vertical de paletas (Cole-Parmer modelo 50006-00, Canadá) sobre un baño María a 40°C. Se formó la emulsión adicionando aceite de pomelo 10%p/p a la solución de alginato, con agitación vigorosa de 1500 rpm durante 20 minutos. Se formaron las microcápsulas a través de una extrusión con una bomba jeringa APEMA PC 11 UBT, goteando la emulsión sobre la solución de cloruro de calcio a 5cm de altura, con caudal de 90ml/h. El diámetro de salida de la gota fue de 0,1 mm, el tiempo de reticulación varió de 1 a 5 minutos. Luego se filtraron las microcápsulas para eliminar el agua residual y se pesaron. Por último se analizó la morfología de las microcápsulas observándolas con microscopio óptico.

2.2. Determinación de la Eficiencia de Microencapsulación

La eficiencia porcentual de limoneno microencapsulado se determinó por cromatografía gaseosa, Solomon y col (2012). Una masa conocida de microcápsulas se dispersan en otra masa conocida de ter-butanol. Se filtró y luego se tomó una muestra de 30µl de esta solución y se agregó el estándar interno (metilisobutilcetona) para luego ser analizada con un SHIMADZU GC 14B, con columna polar Megabore DB-WAX P/N 125-7032 de 30m de longitud x 0,53mm de diámetro interno x 1 µ de espesor, conectada a un detector FID. La temperatura del detector fue de 220°C y la temperatura de inyector de 180°C. La temperatura de la columna se mantuvo isotérmica en 40°C durante 2 minutos, luego inició una rampa de 5°Cmin⁻¹ hasta llegar a 70°C, por último se mantuvo isotérmica a 70°C durante 2 minutos. Se compararon las relaciones de áreas de los cromatogramas en una curva de calibración para conocer la masa de aceite encapsulado. El valor de la eficiencia se determinó con la fórmula (1), Maji (2007).

$$E\% = \frac{w_1}{w_2} 100 \quad (1)$$

Donde w_1 es la masa de aceite en una masa conocida de microcápsulas y w_2 es la masa inicial teórica de aceite agregada.

2.3. Determinación del Rendimiento de Encapsulación

Para determinar el rendimiento, se pesaron el total de microcápsulas (w_m) obtenidas y conociendo la cantidad exacta de principio activo (w_a) y de polímero (w_p) que se empleó para preparar la emulsión, se aplicó la siguiente ecuación (2), González y col (2005):

$$R\% = \frac{w_m}{w_a + w_p} 100 \quad (2)$$

2.4. Caracterización de Microcápsulas

Se analizó la forma y tamaño de las microcápsulas obtenidas con microscopio óptico con aumento de 4x, se fotografiaron con el software de control de cámara TopView (x86).

2.5. Diseño Experimental

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

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

Donde y es cada respuesta a analizar, β son los efectos medios, x_1 y x_2 son los factores determinados, y ε es el error medio aleatorio.

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

Tabla 1. Factores y niveles del diseño experimental

Niveles	Factores	
	Cc CaCl ₂ (%p/p)	Tiempo (min)
	a	b
1	10	1
2	20	3
3	30	5

3. Resultados y Discusión

3.1. Obtención de Microcápsulas

Las microcápsulas obtenidas son de forma esférica y con tamaños similares (aproximadamente 2000 micrómetros), con buena dureza y flexibilidad, como puede observarse

en la Figura 1.a, similares resultados fueron obtenidos por Liu (2012). En la Figura 1.b) se pueden observar las gotas del aceite dentro de las microcápsulas, vistas con microscopio óptico con aumento de 4x. Se pueden ver también las elevaciones en la superficie por los poros llenos de aceite. En la figura 1.c) se observa la cápsula luego de extraer el aceite con alcohol ter-butílico, se puede ver la superficie de la cápsula y los poros vacíos.

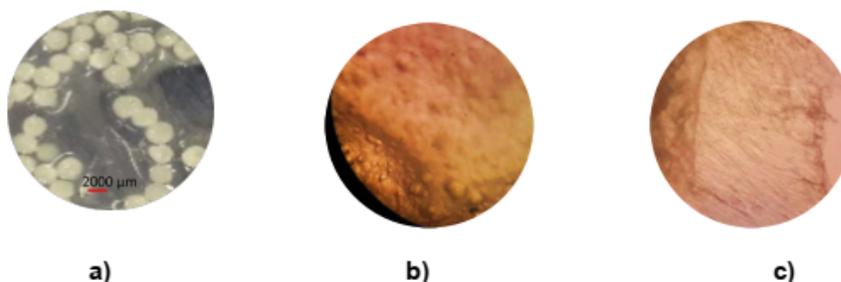


Figura 1. Morfología de las microcápsulas: a) Fotografía de las microcápsulas esféricas. Vistas con microscopio óptico: b) con aceite, c) sin aceite.

3.1. Eficiencia y Rendimiento

En la tabla 2 se muestran los valores medios obtenidos de eficiencia y rendimiento de encapsulación para cada factor y nivel, aplicando respectivamente las ecuaciones (1) y (2). Los valores máximos de eficiencia (53,01%) y rendimiento (89,15%) se dan con concentración de cloruro de calcio de 20%p/p y tiempo de curado de 3 minutos. En estudios similares se reportaron eficiencias del 85% pero con una carga de aceite esencial de 2% v/v, Benavides y col (2016); y eficiencias del 83,8% pero requirieron el uso de un agente emulsionante (Tween-80) que mejora la retención del aceite esencial en la emulsión Banerjee y col (2013). Aunque este resultado es consistente con aquellos indicados por Hosseini y col (2013), quien informó que un aumento de la carga de aceite esencial de orégano del 1% al 3% disminuye la eficiencia de microcápsulas en un 21%. Esto puede deberse a que la cápsula tiene una carga limitada de aceite esencial, si se sobrepasa la misma, comienza a quedar aceite en superficie y luego se volatiliza. También puede explicarse por altas tensiones en las paredes de la gota que provoca el material de relleno, Benavides y col (2016).

El rendimiento máximo obtenido es mayor al reportado por Benavides (2016) de un 60 a 62%, puede ser explicado por el uso una alta concentración de cloruro de calcio y tiempo corto de curado, que inducen una alta velocidad de reticulación con formación rápida de la pared de la cápsula evitando la pérdida de material sólido y agua. En otro estudio de Ribeiro y col (1999) se obtuvieron rendimientos del 60-80% pero requerían el uso de emulsiones dobles de aceite y agua, además de la incorporación de quitosano, aumentando la complejidad del proceso de encapsulación.

En la tabla 3 se observan los resultados de la prueba ANOVA para la eficiencia de encapsulación. Se observa que, tanto la concentración de cloruro de calcio y el tiempo de curado, tienen efecto significativo (para $\alpha=0,05$) sobre la respuesta. El valor p del efecto tiempo es relativamente menor que el de la concentración de cloruro de calcio (y por consiguiente su F es mayor), por lo que el tiempo de curado tiene un efecto mayor en el proceso de reticulación, si bien

ambos son significativos. También se observa que el término de la interacción entre ambos factores no tiene un efecto significativo en la eficiencia. El 83,2% de la variabilidad de la eficiencia es explicada por los factores. En la Tabla 4, en cambio, se ve que el valor p para la concentración de cloruro de calcio es bastante menor que el valor p del tiempo, y en consecuencia el valor de la prueba F de ambos también presenta mayor diferencia; por lo que la concentración de cloruro de calcio demuestra tener un efecto mayor en el rendimiento de encapsulación, siendo 77,4% de la variabilidad del rendimiento explicado por el tiempo de curado y la concentración de cloruro de calcio. En este caso la interacción de ambos factores tampoco afecta la respuesta.

Tabla 2. Medias de Eficiencia y Rendimiento de encapsulación.

Fuente	Eficiencia		Rendimiento	
	Media	DST	Media	DST
Cc CaCl ₂				
10	46,95	1,68	75,25	5,28
20	42,19	1,68	51,36	5,28
30	37,36	1,68	43,53	5,28
Tiempo				
1	36,99	1,68	49,35	5,28
3	47,50	1,68	67,03	5,28
5	42,02	1,68	53,76	5,28
Cc CaCl ₂ *Tiempo				
10-1	37,09	2,91	46,09	9,16
10-3	43,66	2,91	49,46	9,16
10-5	45,83	2,91	58,54	9,16
20-1	44,86	2,91	71,01	9,16
20-3	53,01	2,91	89,15	9,16
20-5	42,98	2,91	65,59	9,16
30-1	29,02	2,91	30,95	9,16
30-3	45,83	2,91	62,48	9,16
30-5	37,24	2,91	37,15	9,16

Tabla 3. Tabla ANOVA para Eficiencia de Encapsulación.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Cc CaCl ₂	2	275,94	137,94	8,12	0,010
Tiempo	2	331,55	165,77	9,76	0,006

Cc CaCl ₂ *Tiempo	4	147,50	36,88	2,17	0,154
Error	9	152,92	16,99		
Total	17	907,91			

Tabla 4. Tabla ANOVA para Rendimiento de Encapsulación.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Cc CaCl ₂	2	3276,5	1638,3	9,77	0,006
Tiempo	2	1016,7	508,4	3,03	0,099
Cc CaCl ₂ *Tiempo	4	875,1	218,8	1,3	0,339
Error	9	1509,6	167,7		
Total	17	6677,9			

Las ecuaciones (4) y (5) muestran las optimizaciones obtenidas para la Eficiencia y el Rendimiento de encapsulación basadas en un modelo de regresión cuadrático. En ambas puede observarse el efecto positivo de los factores concentración de cloruro de calcio (x_1) y tiempo de reticulación (x_2) sobre la Eficiencia ($E\%$) y el Rendimiento ($R\%$).

$$E\% = 6,3 + 2,647x_1 + 13,380x_2 - 0,006x_1x_2 - 0,072x_1^2 - 1,998x_2^2 \quad (4)$$

$$R\% = -60,640 + 10,964x_1 + 25,880x_2 - 0,078x_1x_2 - 0,278x_1^2 - 3,869x_2^2 \quad (5)$$

Las gráficas de contorno: Figura 2 para Eficiencia y Figura 3 para Rendimiento, muestran una curvatura central, sugiriendo una superficie cuadrática en ambos casos. Se puede observar que para tiempo de 3 minutos y concentración de cloruro de calcio de 20%p/p se obtiene el máximo rendimiento y eficiencia de encapsulación.

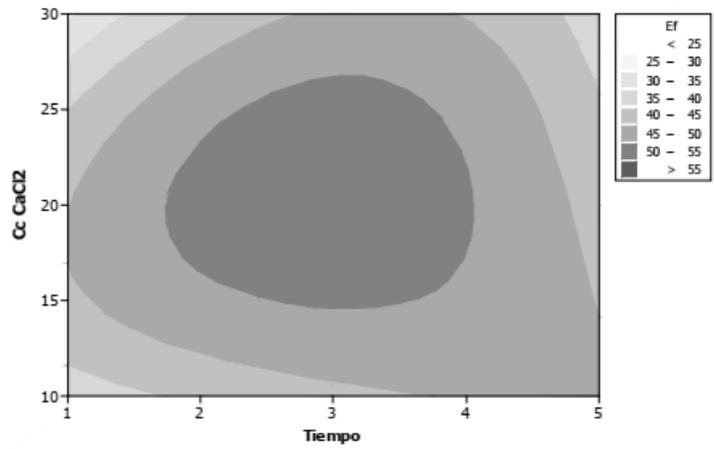


Figura 2. Grafica de Contorno para Eficiencia de encapsulación.

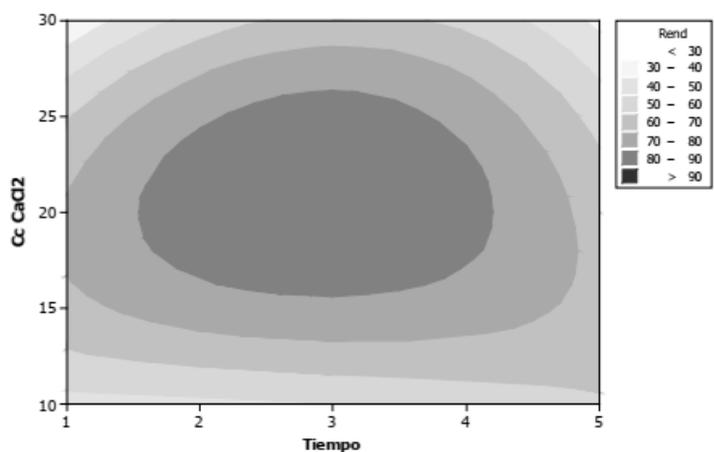


Figura 3. Grafica de Contorno para Rendimiento de Encapsulación.

4. Conclusiones

Se estudió la encapsulación de aceite de pomelo por gelificación iónica externa y extrusión. Se obtuvo una emulsión estable con alginato y alta carga de aceite de pomelo. Se determinó que en estas condiciones el cloruro de calcio y el tiempo de reticulación tienen un efecto significativo en la eficiencia y el rendimiento de encapsulación. Las cápsulas producidas, de forma esférica, presentaron una eficiencia máxima del 53,01% y un rendimiento del 89,15%.

Referencias

- Jun-xia, X., Hai-yan, Y., Jian.Y. (2011). Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chemistry*, 125, 1267–1272.
- Liu, K., Xu, Y., Wang, X. (2012). Microencapsulation of sweet orange oil terpeneless using the orifice method. *Journal of Food Engineering*, 110, 390–394.
- Lupo Pasin, B., González Azón, C., Maestro Garriga, A. (2012). Microencapsulation in alginate for food. Technologies and applications. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(1), 130-151.
- Rhim, J. (2004). Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films LWT- *Food Science and Technology*, 37, 323–330.
- Smidsrod, O., Draget, K. (1996). Alginates: chemistry and physical properties. *Carbohydrates in Europe*, 14, 6-13.
- Mahdi, M., Diryak, R., Kontogiorgos, V., Morris, G., Smith. A. (2016). In situ rheological measurements of the external gelation of alginate. *Food Hydrocolloids*, 55, 77-80.
- Chan, E. (2011). Preparation of Ca-alginate beads containing high oil content: Influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties. *Carbohydrate Polymers*, 84, 1267–1275.
- Pasukamonset P., Kwon O., Adisakwattana, S. (2016). Alginate-based encapsulation of polyphenols from *Clitoria ternatea* petal flower extract enhances stability and biological activity under simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocolloids*, 61, 772-779
- B. Solomon a,b, F.F. Sahle a, T. Gebre-Mariam b,ft, K. Asres c, R.H.H. Neubert. (2012). Microencapsulation of citronella oil for mosquito-repellent application: Formulation and in vitro permeation studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 80, 61–66.
- Maji, T., Baruah, I., Dube, S., Hussain, M. (2007). Microencapsulation of *Zanthoxylum limonella* oil (ZLO) in glutaraldehyde crosslinked gelatin for mosquito repellent application. *Bioresource Technology*, 98, 840–844.
- González, N., Fernández, D., Gómez, M., Núñez, L., Lafita, O. (2005). Efecto del eudragit y la etilcelulosa como agentes retardantes de la liberación sobre las características físico-químicas y la liberación in vitro de microesferas cargadas con zidovudina. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 24(3), 350-5.
- Montgomery, D. (2004). *Diseño de experimentos*. Mexico. Limusa Wiley.
- Kuehl, R. (2001). *Diseño de experimentos. Principios estadísticos para el diseño y el análisis de las investigaciones*. México. Thompson, Learning.
- Benavides, S., Cortés, P., Parada, J., Franco, W. (2016). Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. *Food Chemistry*. 204, 77–83.
- Banerjee, S., Chattopadhyay, P., Ghosh, A., Goyary, D., Karmakar, S., Veer, V. (2013). Influence of process variables on essential oil microcapsule properties by carbohydrate polymer-protein lends. *Carbohydrate Polymers*, 93(2), 691–697. Web: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.028>.

Hosseini, S., Hosseini, H., Mohammadifar, M., Mortazavian, A., Mohammadi, A., Khosravi-Darani, K., Shojaee-Aliabadi, S., Khaksar, R. (2013). Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion/ionic gelation process. *International Journal of Biological Macromolecules*, 62, 582–588. Web: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.09.054>

Ribeiro, A., Neufeld, R., Arnaud, P., Chaumeil, J. (1999). Microencapsulation of lipophilic drugs in chitosan-coated alginate microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 187(1), 115–123. Web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10502618>

