



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE
ESCUELA DE INGENIERIA

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROESFERAS DE ALGINATO CARGADAS CON ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO.

SERGIO FERMIN BENAVIDES VALENZUELA

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias de la Ingeniería

Profesores Supervisores:

WENDY FRANCO

JAVIER PARADA

Santiago de Chile, (Agosto, 2017)

©2017, Sergio Fermín Benavides Valenzuela



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE
ESCUELA DE INGENIERIA

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROESFERAS DE ALGINATO CARGADAS CON ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO.

SERGIO FERMIN BENAVIDES VALENZUELA

Tesis presentada a la Comisión integrada por los profesores:

WENDY FRANCO

JAVIER PARADA

LORETO VALENZUELA

RICARDO PÉREZ

PAZ ROBERTS

CARLOS GROSSO

JUAN DE DIOS ORTÚZAR

Para completar las exigencias del grado de doctor en Ciencias de la
Ingeniería

Santiago de Chile, (Agosto, 2017)

*Todas las corrientes fluyen hacia el mar
porque el mar se encuentra más abajo que ellas
de su humildad proviene su poder.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi hija Montserrat, el más grande estímulo de mi vida, quien nació durante mi formación doctoral. A mi esposa Georgina y a mi madre Luisa, por su apoyo, por su amor, consejos y protección e impagable ayuda.

Agradezco profundamente a mis tutores: Dra. Wendy Franco y Dr. Javier Parada, por su invaluable apoyo, rectificación, formación y sostén, más allá de la academia.

Al Dr. Carlos Grosso de la Universidad de Campinas (Brasil), por su ayuda, consejos y por fortalecer la parte técnica de mi investigación.

Agradezco a los profesores que directa e indirectamente me apoyaron en mi formación y/o sustento: Dr. José Manuel del Valle, Dr. Ricardo Pérez, Dra. Loreto Valenzuela, desde el día que llegué al programa.

A mis inestimables compañeros que me ayudaron y estuvieron conmigo en momentos de dulce y agraz: María José Paredes, porque cuando estuve en el suelo, me ayudaste a pararme, pero también compartiste mis éxitos. A Andrea Reveco: porque sin tus consejos y experiencia transmitida me habría costado el doble llegar hasta acá. A Pablo Cortés: por su apoyo técnico y el *input* a la hora de iniciar la investigación.

Agradezco a todas aquellas personas que encontré acá y que de una u otra manera me apoyaron en este proceso: Carmen Gloria Parodi, María Inés Valdebenito, Romina Almasia, Joscelyn Diaz, Jackeline Salvatierra, Rosa Araya e Irma Salvatierra, a mis tres *Padawan*: Saúl Duarte, Nicolás Chandía y Diana Caudillo, y tantos otros.

Finalmente, quisiera agradecer a todas las instituciones que me brindaron ayuda económica para la realización de mis estudios doctorales; Beca ayudante becario, Beca Instructor becario y al proyecto Anillo 1105/2012 de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

INDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE DE TABLAS	vii
INDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 Problemáticas infecto-contagiosas en cultivos acuícolas.....	11
1.2 Capacidad antimicrobiana de los AE	12
1.3 Uso de los AE en alimentación animal	15
1.4 Encapsulación de AE	16
1.5 Métodos de encapsulación	18
1.5.1 Secado por aspersión (Spray drying)	19
1.5.2 Gelificación iónica	20
1.6 Liberación del aceite esencial encapsulado.....	23
1.7 Aparato digestivo peces.....	24
1.8 Hipótesis.....	26
1.8 Objetivo general	26
1.8.1 Objetivos específicos	26
2. MATERIALES Y METODOS	27
2.1 Materiales.....	27
2.2 Métodos.....	27
2.2.1 Grado de dispersión del AET.....	27
2.2.2 Evaluación y selección de emulsiones a encapsular	28
2.2.2.1 Tamaño de gota de fase dispersa (AET).....	28
2.2.2.2 Polidispersión.....	29
2.2.2.3 Selección	29

2.2.3	Preparación de las microesferas.....	29
2.2.4	Caracterización de las microesferas.....	29
2.2.4.1	Rendimiento del proceso de encapsulación.....	30
2.2.4.2	Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga	30
2.2.4.3	Caracterización de la forma y tamaño de las microesferasa	31
2.2.5	Caracterización de la microestructura de las microesferas.....	31
2.2.5.1	Microscopía de fluorescencia (MF).....	32
2.2.5.2	Microtomografía de rayos X.....	32
2.2.5.3	Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	32
2.2.6	Capacidad antimicrobiana de las microesferas.....	33
2.2.7	Estudios de la mecánica de liberación: Evaluación del hinchamiento.....	33
2.2.8	Estudios de la mecánica de liberación: Bioaccesibilidad del AET.....	34
2.2.9	Capacidad antimicrobiana del AET post-digestión (<i>in vitro</i>).....	34
2.2.10	Análisis estadístico.....	35
3.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	36
3.1	Selección de las condiciones de emulsificación.....	36
3.1.1	Polidispersión de la fase dispersa	36
3.1.2	Tamaño de gota de fase dispersa (AET).....	37
3.2	Evaluación del tamaño y forma de las microesferas.....	40
3.3	Caracterización microesferas: Rendimiento, Eficiencia de encapsulación y Capacidad de carga.....	42
3.3.1	Rendimiento (Y%).....	42
3.3.2	Eficiencia de encapsulación (EE%).....	42
3.3.3	Capacidad de carga (CC%).....	44
3.4	Caracterización de la microestructura.....	46
3.4.1	Microscopía de fluorescencia (MF).....	46
3.4.2	Microtomografía de rayos X.....	46
3.4.3	Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	48
3.5	Actividad antibacteriana de las microesferas.....	50
3.6	Caracterización del hinchamiento de las microesferas.....	52
3.7	Medición de la liberación del AET (<i>in vitro</i>).....	56

3.8 Actividad antifúngica del AET post-digestión sobre <i>Saprolegnia sp</i>	58
4. CONCLUSIONES	60
5. REFERENCIAS.....	61

INDICE DE TABLAS

Pág.

Tabla 3-1: Actividad antibacteriana de microesferas de alginato cargadas con AET....51

Tabla 3-2: Capacidad antifúngica de microesferas cargadas con AET, post-digestión sobre *Saprolegnia sp* 59

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1-1: Estructura química de los principales terpenos del aceite esencial de tomillo.....	13
Figura 1-2: Permeabilización de la membrana celular microbiana, por acción de un terpeno	14
Figura 1-3a: Tipos de cápsulas poliméricas: Microcápsula	17
Figura 1-3b: Tipos de cápsulas poliméricas: Microesfera.....	17
Figura 1-4: Efecto del encapsulado sobre la dosificación del aceite esencial.	18
Figura 1-5: Sistema de encapsulación por aspersión.....	19
Figura 1-6a: Estructura del alginato, mostrando sus grupos constitutivos: Grupos G. .	21
Figura 1-6b: Estructura del alginato, mostrando sus grupos constitutivos: Grupos M. .	21
Figura 1-6c: Estructura del alginato, mostrando sus grupos constitutivos: Alternados. .	21
Figura 1-7: Gelificación del alginato de sodio con cationes de calcio.	22
Figura 1-8: Sistema para obtención de microesferas por gelificación iónica.	22
Figura 1-9a: Sistema digestivo de peces; Esófago.....	24
Figura 1-9b: Sistema digestivo de peces; Estómago.....	24
Figura 1-9c: Sistema digestivo de peces; vesícula biliar.....	24
Figura 1-9e: Sistema digestivo de peces; ciegos pilóricos.....	24
Figura 1-9f: Sistema digestivo de peces; intestino.....	24
Figura 1-9g: Sistema digestivo de peces; ano.....	24
Figura 1-9h: Sistema digestivo de peces; molleja.....	24
Figura 3-1: Polidispersión de la fase dispersa (AET).....	37
Figura 3-2: Diámetro medio de Sauter (D_{32}) de emulsiones obtenidas en diferentes condiciones de dispersión (velocidad y tiempo)..	38
Figura 3-3: Detalle de las emulsiones obtenidas bajo diferentes condiciones de dispersión (velocidad y tiempo).....	39
Figura 3-4: Fotografía de microscopía de fluorescencia.....	41

Figura 3-5: Efecto de la concentración de AET sobre la eficiencia de encapsulación (EE%).....	43
Figura 3-6: Efecto de la concentración y grado de dispersión del AET en la capacidad de carga (CC%) en microesferas de alginato.	45
Figura 3-7a: Microscopia de fluorescencia de microesferas desarrolladas por gelificación iónica, microesferas húmedas.....	47
Figura 3-7b: Microscopia de fluorescencia de microesferas desarrolladas por gelificación iónica, microesferas secas.....	47
Figura 3-8: Imagen de Microtomografía computarizada de rayos X.....	47
Figura 3-9a: Fotografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) de microesferas secas: Forma y estado de agregación	50
Figura 3-9b: Fotografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) de microesferas secas: Superficie de microesfera	50
Figura 3-9c: Fotografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) de microesferas secas: Sección transversal de una microesfera	50
Figura 3-9d: Fotografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) de microesferas secas: Estructura interna de una microesfera	50
Figura 3-10: Efecto del pH digestivo, y del grado de dispersión del AET en las microesferas, sobre el hinchamiento.....	53
Figura 3-11: Efecto del pH digestivo, y del grado de dispersión del AET en las microesferas, sobre la velocidad de liberación.....	56

RESUMEN

El uso de aceites esenciales, incorporados a matrices alimentarias, es una buena alternativa para prevenir, e incluso tratar enfermedades infecciosas y oportunistas en cultivos acuícolas. Sin embargo, su incorporación directa en matrices alimentarias es desventajosa, dado a que se volatilizan, oxidan, o pueden generar efectos sensoriales adversos. Una solución a esta problemática, es la encapsulación del aceite esencial. La encapsulación es una alternativa atractiva, debido a que protege al aceite esencial de factores ambientales adversos, permitiendo además controlar su liberación a una tasa y lugar determinado.

El objetivo de esta investigación fue desarrollar y caracterizar microesferas de alginato de calcio, cargadas con aceite esencial de tomillo, para su uso en el control del hongo *Saprolegnia sp.* En consecuencia, se obtuvieron microesferas por el método de la gelificación iónica, y se evaluaron en cuanto a tamaño, forma, eficiencia de encapsulación, capacidad de carga y propiedades antimicrobianas en bacterias patógenas y sobre *Saprolegnia sp.* Por otro lado, se caracterizó el efecto de la microestructura y del hinchamiento, sobre la mecánica de liberación del aceite esencial en condiciones gastrointestinales simuladas de peces. Los resultados indicaron que la eficiencia de encapsulación y la capacidad de carga dependen de la concentración y el grado de dispersión del aceite esencial. Las mejores condiciones de encapsulación se obtuvieron al 2% v/v de aceite esencial de tomillo con un alto grado de dispersión (18.000 rpm / 5 min). La tasa de liberación dependió fuertemente del grado de hinchamiento y del pH del medio, con lo que se logró demostrar que la microesfera limita significativamente la liberación a nivel de pH estomacal, pero se potencia a nivel de pH intestinal, en condiciones gastrointestinales simuladas de peces. Finalmente, el aceite esencial de tomillo liberado post-digestión mantiene una significativa actividad antifúngica sobre el hongo *Saprolegnia sp.*

Palabras claves: Microesferas, microcápsulas, aceites esenciales, gelificación iónica, tomillo, carvacrol, condiciones digestivas simuladas.

ABSTRACT

Essential oils have well known antimicrobial activity, hence, the inclusion of essential oils in animal feed is a good option to prevent opportunistic infections. However, their direct incorporation to a food matrix has several disadvantages, such as volatilization, oxidation, and undesirable sensory effects. The development of essential oil microspheres may help controlling these problems. Microspheres protect the essentials oils against of adverse environmental factors, and allow to control their release and delivery. The objective of the present research was to encapsulate thyme essential oil by ionic gelation, to evaluate the impact of the dispersion degree of essential oil on the encapsulation efficiency, loading capacity and microstructure of microsphere. Furthermore, to evaluate the swelling of microcapsule, the release of TEO from the microsphere, and its antimicrobial capacity under simulated digestive conditions. Encapsulation efficiency and loading capacity were dependent on concentration and degree of dispersion. The best encapsulation conditions obtained were 2% v/v of thyme essential oil with a high dispersion degree (18,000 rpm/5 min), achieving an efficiency of 85%. The release rate was directly proportional to the swelling degree, and inversely proportional to the pH of the medium, establishing that the microsphere limits their release at the stomach pH, but it is potentiated at the intestinal pH, on gastrointestinal fish conditions. Finally, the thyme essential oil post-digestion maintains antifungal activity over the fungus *Saprolegnia sp.*

Keywords: Microspheres, microcapsules, release, essential oil, ionic gelation, thyme, carvacrol, in vitro digestive conditions.

1.

INTRODUCCIÓN

1.1 Problemáticas infecto-contagiosas en cultivos acuícolas

En la última década se ha incrementado la demanda de productos marinos, por lo que la acuicultura ha mostrado un rápido crecimiento representando un importante sector productivo (FAO, 2016). En el caso de Chile, la acuicultura ha logrado un privilegiado posicionamiento, encontrándose dentro de los 10 más importantes a nivel mundial, generando casi 1.100.000 toneladas de productos (ODEPA, 2013). De esta producción, cerca de un 80% corresponde al cultivo de especies salmónidas, en donde Chile es el segundo productor mundial del recurso. Esta industria reportó, solo en el 2012, ingresos por US\$1.980 millones (ODEPA, 2013). Sin embargo, han existido grandes pérdidas productivas, debido a que el cultivo intensivo de salmones, así como otras especies acuícolas, se encuentra asociado a una serie de enfermedades infecto-contagiosas, que reducen la productividad (Lafferty et al., 2015).

Si bien es cierto, a través de un manejo adecuado de los cultivos pueden controlarse varias enfermedades infecciosas (Rattanachaiakunsopon & Phumkhachorn, 2010), las infecciones del tipo oportunista son las más difíciles de controlar, porque su presencia es inherente a los peces (Penagos & Barato, 2008). Una de las infecciones oportunistas más importantes es la saprolegniosis (Zaror, Collado, Bohle, Landskron, & Healt, 2004), causada por el hongo *Saprolegnia parasitica*. Este hongo es difícil de controlar y puede afectar, de manera significativa, la productividad de los cultivos acuícolas (Thoen, Evensen, & Skaar, 2011) causando importantes pérdidas económicas (Zaror et al., 2004). Hoy en día su control se ha limitado al uso de antibióticos y diversos productos químicos.

Entre los productos químicos más utilizados se encuentran: Diamino-trifenilmetano (verde malaquita), prohibido en Chile y en varios países por sus efectos potencialmente cancerígenos (Sudova, Machova, Svobodova, & Vesely, 2007); productos que contienen formalina (Torres, 2011) que causan irritaciones en peces y manipuladores; cloruro de sodio que se requiere en altas dosis (Das et al., 2012). La mayoría de los agentes mencionados,

aparte de ser cuestionados sobre su seguridad, son de compleja y engorrosa aplicación, lo que afecta negativamente el manejo técnico de los centros acuícolas (Bravo et al., 2005).

Por otro lado, el uso de antibióticos tiene complejos efectos secundarios, como la generación de resistencias bacterianas y fúngicas, lo que conduce a infecciones no tratables (Benbrook, 2002). Sumado a lo anterior los restos antibióticos en las heces de los peces, y en alimento no consumido, llega al entorno y que es consumido por otras especies generando un efecto negativo en el medioambiente (Fortt & Buschmann, 2007).

Una alternativa a esta situación es el uso de compuestos antimicrobianos de origen natural, como son algunos extractos vegetales. Algunos de estos extractos vegetales son los aceites esenciales (AE), cuyo origen natural sumado a su capacidad antimicrobiana y antioxidante (Dima, Cotarlet, Alexe, & Dima, 2014), ha atraído el interés de diversas industrias del ámbito alimentario y farmacológico.

Los AE son mezclas de varios componentes de naturaleza volátil, entre los que destacan fenoles, terpenos, alcoholes y aldehídos (Nazzaro, Fratianni, De Martino, Coppola, & De Feo, 2013). Los AE se encuentran presentes como metabolitos secundarios en varias especies de plantas aromáticas y generalmente, son almacenados por la planta en células secretoras (Varona, Rodríguez, et al., 2013). Estos compuestos pueden ser liberados por las plantas como mecanismos de defensa contra insectos, hongos y bacterias fitopatógenas (Nazzaro et al., 2013).

1.2 Capacidad antimicrobiana de los Aceites Esenciales

La actividad antimicrobiana de los AE, ha sido estudiada por mucho tiempo (Benavides, Villalobos-Carvajal, & Reyes, 2012; Oussalah, Saucier, & Lacroix, 2006; Sadaka et al., 2013; Varona, Rodríguez Rojo, et al., 2013), y se ha podido demostrar fehacientemente su amplio espectro antibacteriano y antifúngico (Bakkali & Idaomar, 2008; Bnyan, Abid, & Obied, 2014; Du, Avena-bustillos, Hua, & Mchugh, 2011; Nazzaro et al., 2013). Algunos ejemplos interesantes son la efectividad antibacteriana del aceite esencial de orégano sobre

L. monocytogenes y *St. aureus* (Benavides et al., 2012), ajo sobre *E. coli*, *L. plantarum* y *S. enteritidis* (Seydim & Sarikus, 2006), el aceite esencial de pimiento contra el hongo *C. utilis* (Dima, Cotârlet, Alexe, & Dima, 2014), y el aceite esencial de tomillo sobre *S. putrefaciens*, *E. coli* y *St. aureus* (Emiroğlu, Yemiş, Coşkun, & Candoğan, 2010), solo por mencionar algunos ejemplos. Lo anterior ha significado un incremento significativo en la importancia comercial de los AE (Bakkali & Idaomar, 2008) como potenciales agentes antimicrobianos, como una alternativa al uso de antibióticos, cuyo abuso a contribuido a la generación de infecciones no tratables (Aillet, Te, Aucier, & Acroix, 2004; Pasin, Azón, & Garriga, 2012; Sadaka et al., 2013).

El efecto antimicrobiano de los AE se encuentra en función de la presencia y concentración de compuestos fenólicos, cuya sinergia determina además, la potencia antimicrobiana (Bakkali & Idaomar, 2008; Edris, 2007). Entre los principales fenoles monoterpénicos, con actividad antimicrobiana, destacan el carvacrol (Boskabady, Tabatabaee, & Jalali, 2014a), y su isómero el timol (Selzer, Abdel-Mottaleb, Hahn, Schaefer, & Neumann, 2013) mostrados en la figura 1-1. En el caso particular del aceite esencial de tomillo (AET), estos compuestos representan en conjunto entre el 20% al 85% del AE (Benavides, Cortés, Parada, & Franco, 2016; Espitia et al., 2014).

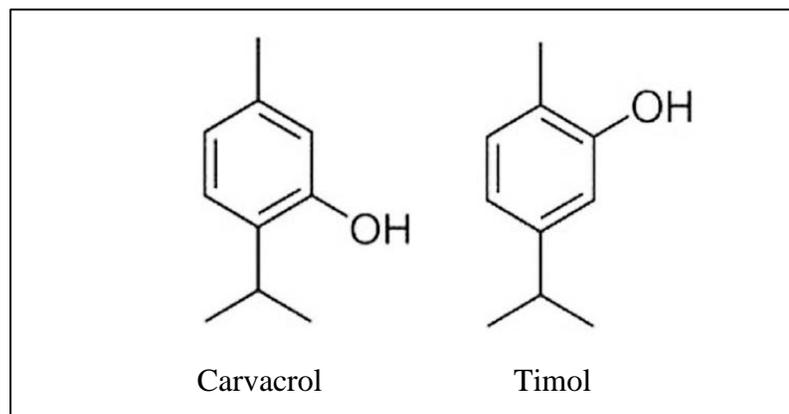


Figura 1-1: Estructura química de los principales monoterpénicos del aceite esencial de tomillo (Botre et al., 2010).

La acción antimicrobiana del carvacrol, timol, y otros terpenos se debe a la alteración estructural de la membrana citoplasmática de los microorganismos, aumentando la permeabilidad de esta (Nazzaro et al., 2013). Este efecto es consecuencia de la alteración u

omisión de la síntesis de fosfolípidos, polisacáridos o ácidos grasos constitutivos. La permeabilización de la membrana citoplasmática (figura 1-2) vulnera la célula gatillando una sucesión de fenómenos citotóxicos que provocan la lisis de la célula bacteriana o fúngica (Bnyan et al., 2014; Nazzaro et al., 2013; Pasin et al., 2012; Ultee, Bennik, & Moezelaar, 2002).

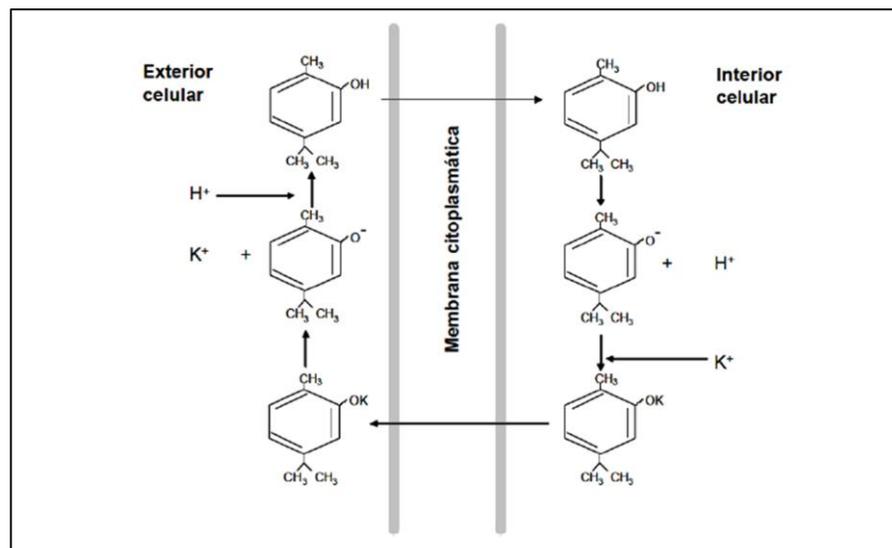


Figura 1-2: Permeabilización de la membrana celular microbiana, por acción de un monoterpreno (Ultee, Bennik, & Moezelaar, 2002).

Si bien es cierto, la aplicación de AE permite contar con un tratamiento alternativo para el control de enfermedades infecciosas y oportunistas, se requieren métodos de administración más sencillos, en especial si se trata de entregar el tratamiento a una cantidad considerable de peces. Hay que tener presente que una de las grandes dificultades en producción intensiva es el tiempo y costo involucrado en el tratamiento mismo. Hoy en día los tratamientos preventivos y de control de infecciones, son aplicados a través de baños con agentes químicos y las vacunas incrementando el nivel de *stress* de los peces, lo que afecta la productividad. Es por ello que actualmente se requieren métodos no invasivos de entrega del agente antimicrobiano (Bravo et al., 2005). Por ello, la administración oral del AE a través del alimento se ve como una solución viable.

1.3 Uso de aceites esenciales en alimentación animal

En el caso de la industria de alimentos para animales, la inclusión de AE en formulaciones y matrices alimentarias se ha estudiado con diferentes propósitos (Acar, Kesbiç, Yılmaz, Gültepe, & Türker, 2015; Blaskovic, Rosenkrantz, Neuber, Sauter-Louis, & Mueller, 2014; Boskabady et al., 2014a; Dantas et al., 2015). Algunos de ellos incluyen la estimulación del crecimiento, la prevención y control de infecciones, y la estimulación del sistema inmunológico en cobayos (Boskabady et al., 2014a), pollos (Jang, Ko, Kang, & Lee, 2007) y perros (Nolivos & Vásquez, 2012), entre otros.

Estudios homólogos se han efectuado en peces, como el de Giannenas et al. (2012), quienes demostraron un efecto estimulante del carvacrol y el timol sobre el crecimiento de truchas. Descubriéndose además, un efecto antimicrobiano residual en el tejido muscular de los peces, que aumentaron la vida útil de los filetes en el tiempo. Otro estudio, sobre AE de orégano en la dieta de bagres (Zheng, Tan, & Liu, 2009), mostró un importante efecto antibacteriano para el control de *Aeromonas sp.* En el caso de la especie tilapia, Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn (2010) incorporaron carvacrol y cimeno, a la dieta de éstas, concluyendo que una concentración de 200 ppm puede evitar la infección de la bacteria *Edwardsiella tarda*, sin que la dosis sea tóxica para las tilapias.

El estudio más relevante asociado a esta investigación fue el producto patentado por Pérez Correa, Agosin Trumper, & Rojas Hube (2014) quienes incorporaron aceite esencial de tomillo a dietas de salmones, logrando reducir en un 50% la mortalidad en salmones afectados por *Saprolegnia parasítica* cuando se utilizó como método curativo (60 ppm). Mientras que, cuando utilizaron la dieta con fines preventivos (20 ppm) redujeron en un 83% la mortalidad respecto al grupo control (dieta sin aceite esencial).

Si bien es cierto los AE incorporados a la dieta de animales y particularmente peces, tienen un probado efecto en la prevención y control de infecciones, no es menos cierto de que la adición de AE directamente en las matrices alimentarias tiene varios inconvenientes, como la rápida pérdida por oxidación o volatilización (Beyki et al., 2014; Hosseini et al., 2013;

Soliman, El-moghazy, El-din, & Massoud, 2013). Otra desventaja es la falta de control sobre la velocidad de liberación del AE (Banerjee et al., 2013), por lo que el AE tiene un efecto tipo “*shock*” muy intenso pero de corta duración, además de producir un rechazo sensorial de la matriz alimentaria. Por lo tanto, para que los AE sean administrados eficientemente, es necesario proteger el AE de factores ambientales adversos, enmascarar efectos sensoriales desagradables y entregarse a una dosis que sea eficaz y constante en el tiempo.

Una manera efectiva de proteger al AE de factores ambientales adversos, así como controlar la tasa de liberación, es por medio de la disposición de una cobertura polimérica comestible, como las generadas por encapsulación (Liolios, Gortzi, Lalas, Tsaknis, & Chinou, 2009; McClements, 2015; Nazzaro, Orlando, Fratianni, & Coppola, 2012; Soliman et al., 2013; L. W. Chan, Lee, & Heng, 2006; Erokhina et al., 2013; Nobile, Conte, Incoronato, & Panza, 2008).

1.4 Encapsulación de aceites esenciales

Para la encapsulación a nivel micrométrico de un AE existen 2 opciones: microencapsulación y microesferificación (Banerjee et al., 2013; Benavides et al., 2016; Beyki et al., 2014; Dima, Cotarlet, et al., 2014; Hosseini et al., 2013; Lertsutthiwong, Noomun, Jongaroonngamsang, Rojsitthisak, & Nimmannit, 2008), difiriendo ambas alternativas en el grado de dispersión del AE dentro de la cápsula, lo que se describe a continuación.

Una microcápsula (Figura 1-3a) tiene un núcleo interno, en donde se dispone del agente bioactivo (AE), y una envoltura exterior constituida principalmente por el polímero utilizado (Bouyer, Mekhloufi, Rosilio, Grossiord, & Agnely, 2012; Ren, Ju, Xie, & Chu, 2010).

La microesfera, en cambio (Figura 1-3b), es una matriz sólida donde el ingrediente activo (AE) está distribuido en toda la matriz (Benavides et al., 2016; Saéz, Hernáez, Sanz, &

Katime, 2004). Para la elaboración de una microesfera es necesaria la emulsificación previa del agente bioactivo (AE) en la solución polimérica (Benavides et al., 2016).

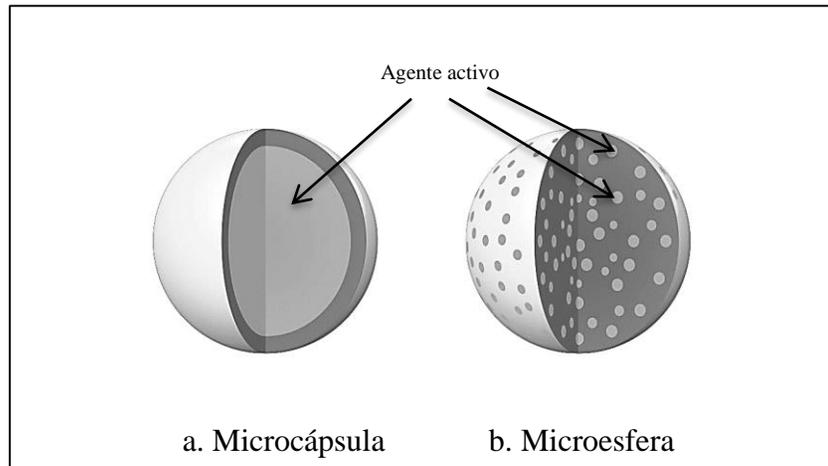


Figura 1-3: Tipos de capsulas poliméricas; a. Microcápsula, b. Microesfera. (Agroytix.com, 2014)

Tanto la microcápsula, como la microesfera, protegen al AE de la volatilización, luz UV y la oxidación (Zhang, Zhang, Hu, Bao, & Huang, 2012). Además, la cobertura polimérica permite liberar al AE bajo ciertas condiciones ambientales, como por ejemplo el pH (específico tanto para la zona estomacal o intestinal).

El polímero, o combinación de polímeros encapsulantes, permiten definir la duración de la bioactividad (Leimann, Gonçalves, Machado, & Bolzan, 2009), así como el lugar (Neubauer, Poehlmann, & Fery, 2014) y tasa de liberación del mismo (Hsieh, Chang, & Gao, 2006). Esto último es relevante, debido a que permite una dosificación eficiente y eficaz en comparación al AE libre (Cook, Tzortzis, Charalampopoulos, & Khutoryanskiy, 2012; Neubauer et al., 2014). La figura 1-4 muestra los efectos de la dosificación del AE libre (línea segmentada negra) y encapsulado (línea segmentada azul). Cuando el AE se dispone en la matriz de manera libre su liberación es intensa y breve (tipo *shock*), pudiendo llegar

incluso a una dosis tóxica. El encapsulado permite regular la tasa de liberación hasta niveles deseados.

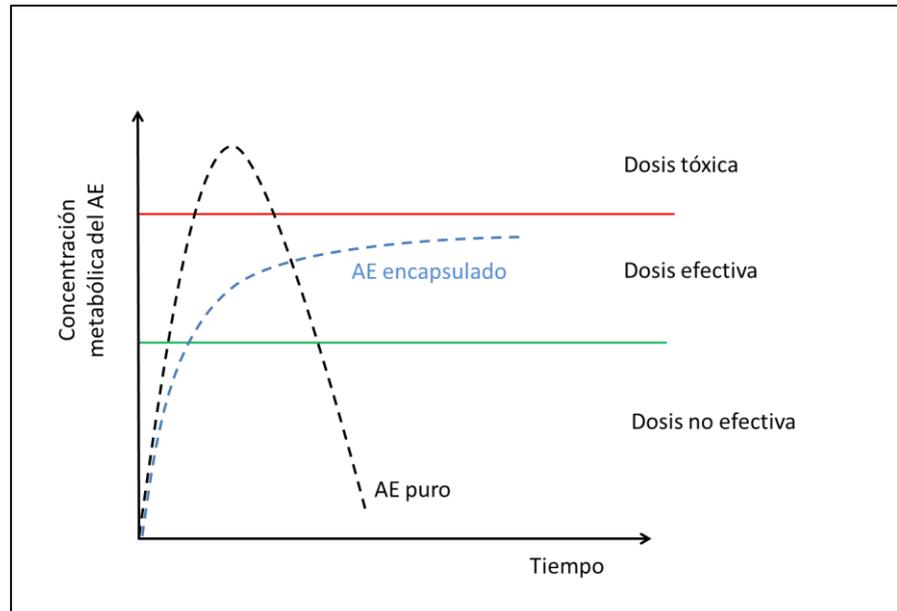


Figura 1-4: Efecto del encapsulado sobre la dosificación del aceite esencial

1.5 Métodos de encapsulación:

Los métodos de encapsulación se pueden dividir en tres clases, en función de la mecánica de obtención de la cápsula o esfera. Métodos físicos, como secado por aspersión (*Spray drying*), enfriamiento por aspersión (*Spray chilling*), co-cristalización y extrusión. Métodos químicos como la inclusión molecular y gelificación iónica, entre otros, y métodos fisicoquímicos como la coacervación y la encapsulación de liposomas.

Cada metodología, tiene aplicaciones relativamente específicas, por lo que su elección va a depender del uso final (Gouin, 2004). Los métodos de mayor interés, dada su versatilidad, sencillez, eficiencia y capacidad de liberación del principio activo durante la digestión, son el secado por aspersión (*Spray drying*) y la gelificación iónica (Chen, Chen, & Lin, 2006; Nazzaro et al., 2012). Ambos métodos se detallan a continuación.

1.5.1 Secado por aspersión (*Spray drying*): Previamente a la formación de microesferas, se requiere formar una emulsión entre una solución polimérica y el agente bioactivo (AE) (Drusch & Berg, 2008). La emulsión polimérica es bombeada a través de un aspersor, que genera pequeñas gotitas de emulsión (Figura 1-5). Estas gotitas se someten a una extracción del solvente (agua generalmente), para lo cual se utiliza aire caliente a alta temperatura (Gharsallaoui, Roudaut, Chambin, Voilley, & Saurel, 2007).

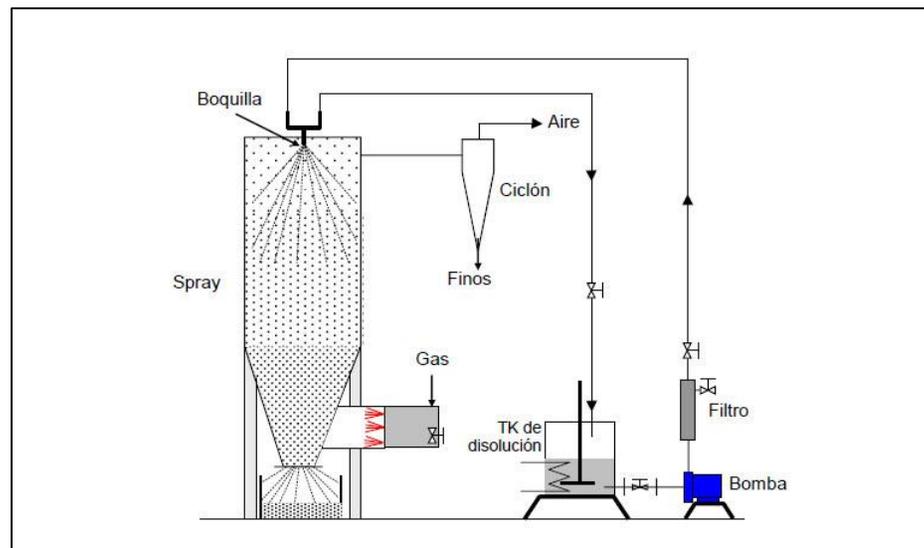


Figura 1-5: Sistema de encapsulación por aspersión (Velasco, Villafior, Flores, & Bisonard, 2014)

El secado por aspersión es un método recurrente para la obtención de microesferas asociadas a alimentos (Gharsallaoui et al., 2007), y es comúnmente utilizado para AE (Drusch & Berg, 2008). Las microesferas se producen de manera continua, con un diámetro entre 0,5 a 80 μm , dependiendo del tipo de aspersor en el secador (Aniesrani, Thagavel, Natarajan, Kasthuri, & Kailappan, 2015).

Las microesferas obtenidas por secado por aspersión son porosas, por lo que, en el caso de encapsular AE, se sugiere emplear una alta proporción de polímero, para limitar la migración de AE al medio (Gharsallaoui et al., 2007). La desventaja de este método es la limitación de materiales encapsulantes, que deben tolerar temperaturas relativamente altas (150°C a 200°C), aunque los tiempos de exposición suelen ser breves (1 a 2 segundos), lo que puede afectar la bioactividad del agente de interés (Beirão et al., 2012). Por otro lado, las

microesferas obtenidas, pueden desintegrarse por dilución en sistemas húmedos (López, 2010). Esto último es crítico en encapsulados administrados por vía digestiva, pues pueden liberar su contenido antes de lo deseado (boca o esófago), limitando su absorción.

1.5.2 Gelificación iónica (GI): Es un método químico basado en interacciones iónicas entre polímeros cargados de forma opuesta (Saravanan & Rao, 2010), o entre un polímero y un polianión o polianión (de Oliveira, Paula, & Paula, 2014). Estas interacciones generan entrecruzamientos entre las cadenas poliméricas, estableciendo uniones iónicas, y, en consecuencia, una gelificación del o los polímeros (Noppakundilograt, Piboon, Graisuwan, Nuisin, & Kiatkamjornwong, 2015). Previamente se debe preparar una emulsión entre el agente activo (AE) y una solución polimérica (Noppakundilograt et al., 2015), tras lo cual se añade el agente gelificante con carga opuesta a la del polímero, generándose la formación espontánea de microesferas (Mohammadi, Hashemi, & Hosseini, 2015). Otra forma de obtener microesferas es hacer gotear la emulsión en un baño gelificante, el que se elabora por dilución de una sal que libera al polianión o polianión (Rinaudo, 2014). La principal ventaja de la GI, respecto a la encapsulación de AE, es que es una forma de encapsulación a baja temperatura, lo que evita pérdidas por volatilización o degradación térmica, además es un método simple y versátil (Benavides et al., 2016).

El alginato (Figura 1-6) se ha convertido en el polímero de elección para la encapsulación por GI. Es un polímero aniónico natural que se extrae de algas pardas, compuesto por dos estructuras monoméricas: 1-4b-*D*-manurónico (M) y *a-L*-gulurónico (G) (Wan et al., 2008). Además, el alginato es ampliamente utilizado en la industria de los alimentos y la farmacológica debido a su biocompatibilidad, bajo costo (Baimark & Srisuwan, 2014; Paques, van der Linden, van Rijn, & Sagis, 2014) y nula toxicidad (Paques, Sagis, van Rijn, & van der Linden, 2014).

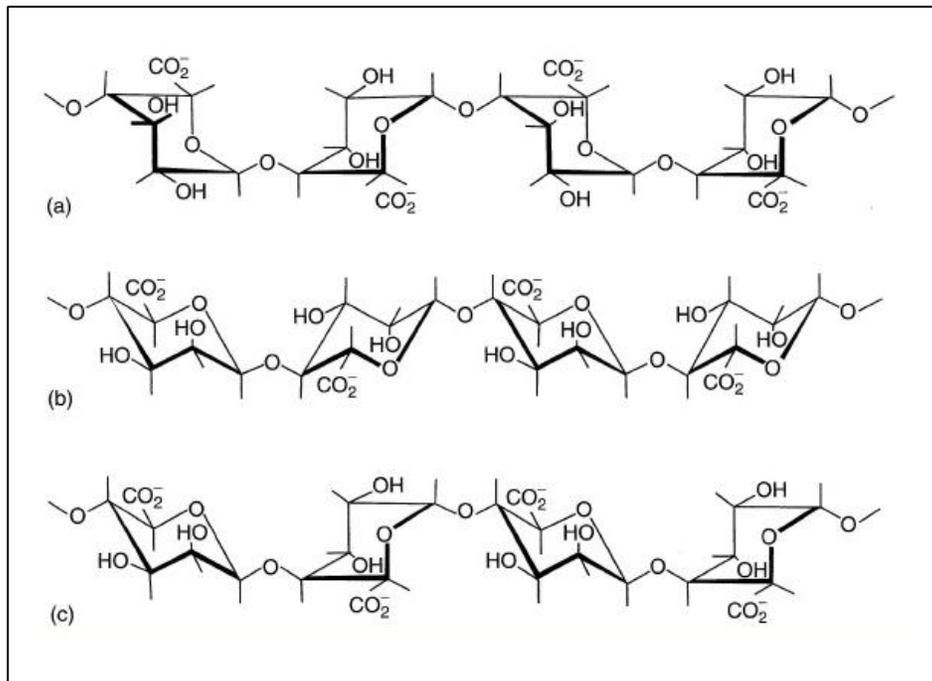


Figura 1-6: Estructura del alginato, mostrando sus grupos constitutivos; (a) grupos G, (b) grupos M, (c) grupos alternados (Rinaudo, 2014).

El alginato tiene la capacidad de formar enlaces iónicos con cationes polivalentes (Figura 1-7), como los iones calcio, generando una estructura reticulada entre los grupos G de diferentes cadenas de alginato y los iones calcio, formando una red polimérica (Biom, Umr, & Roberval, 2009).

La encapsulación por GI requiere la preparación previa de una emulsión entre el AE y la solución de alginato. Posteriormente, la emulsión se gotea en una solución de cloruro de calcio, donde la gelificación tiene lugar sobre la superficie de la gota (Figura 1-8), hasta la formación completa de las microesferas (Paques et al., 2014).

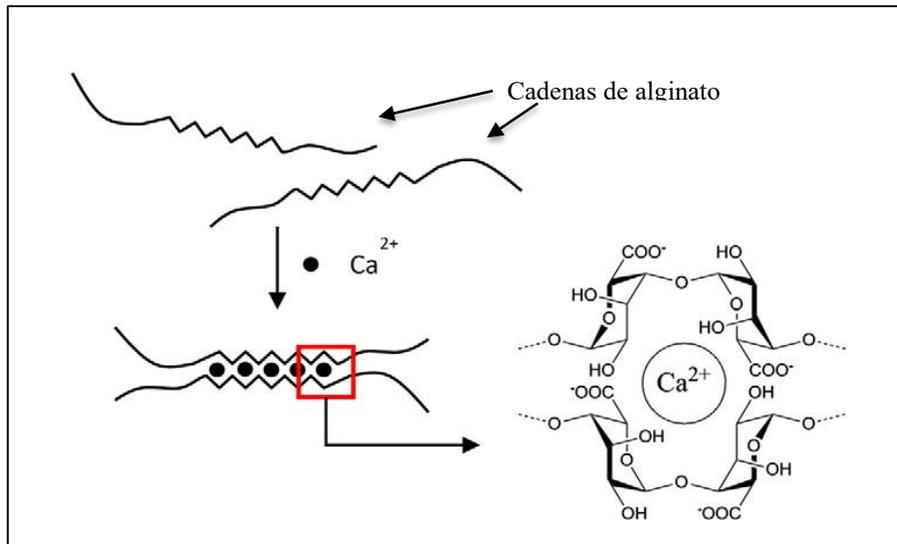


Figura 1-7: Gelificación del alginato de sodio con cationes de calcio (Paques, van der Linden, et al., 2014).

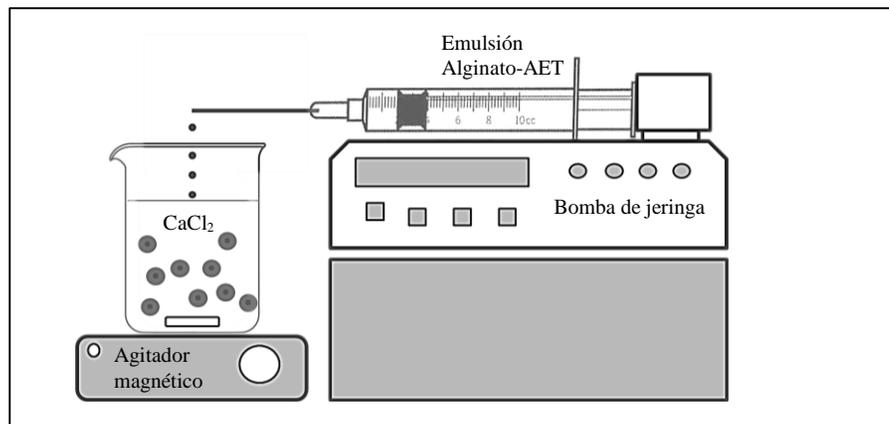


Figura 1-8: Diagrama esquemático de un sistema para obtención de microesferas por gelificación iónica. La emulsión alginato-AET se extruye por la jeringa, y se gotea sobre la solución de calcio, las microesferas se forman espontáneamente (elaboración propia).

Las cápsulas obtenidas por gelificación iónica son de naturaleza porosa, por lo que el agente bioactivo encapsulado suele liberarse por difusión, sin embargo esto es dependiente de la afinidad del bioactivo por el medio externo (Andersson Trojer et al., 2014). Las cápsulas tienen una alta resistencia a la dilución en sistemas acuosos, pero sufren un fenómeno llamado “hinchamiento”, que es incremento del volumen de la cápsula por absorción de agua desde el medio (Lee et al., 2000). Este fenómeno permite la formación de canales e incremento del tamaño del poro en la superficie de la cápsula, lo que facilita la liberación del bioactivo por difusión (Andersson Trojer et al., 2014; Vicini, Castellano, Mauri, & Marsano, 2015).

1.6 Liberación del aceite esencial desde el encapsulado

Las cápsulas deben mantener su estabilidad estructural en diversas condiciones ambientales, manteniendo la función protectora del compuesto bioactivo (Nazzaro et al., 2012). Sin embargo es necesario disponer de un agente específico externo que desencadene la liberación del principio activo (Andersson Trojer et al., 2014). Este agente puede ser el pH intestinal o estomacal (Erokhina et al., 2013), la presión osmótica (Yan, Guang, Wu, Jin, & Cha, 2011), factores enzimáticos (Matalanis, Jones, & McClements, 2011), o la temperatura (Nostro et al., 2015; Yeh, Chang, Yamamoto, & Dobashi, 2011), entre otros. Estos agentes afectan la estabilidad estructural de la microcápsula, facilitando la liberación del componente bioactivo (Sackett & Narasimhan, 2011; Ronald A Siegel & Rathbone, 2012).

Por otro lado las características físicas propias de la cápsula, como morfología (Banerjee et al., 2013), microestructura, tamaño, capacidad de carga (Boskabady, Tabatabaee, & Jalali, 2014b; Hosseini et al., 2013) y el grado de dispersión del componente bioactivo (Benavides et al., 2016) también son relevantes en la mecánica y dinámica de liberación del agente bioactivo (Dima, Pătrașcu, Cantaragiu, Alexe, & Dima, 2016). Un ejemplo interesante es cuando un incremento de la capacidad de carga tiene un efecto inverso sobre la capacidad protectora de las cápsulas (Benavides et al., 2016), y directo sobre la velocidad de liberación del compuesto bioactivo. Respecto a la microestructura (interna y externa) ésta tiene una relevancia tanto en la mecánica (Neubauer et al., 2014) como en la tasa de liberación (Matalanis et al., 2011). La liberación de los AE puede verse afectada por la integridad y porosidad de la pared de la microesfera, sumado a los cambios de microestructura durante la digestión. La porosidad de la cápsula puede facilitar la liberación (Tran, Benoît, & Venier-Julienne, 2011), en cambio el grosor de la pared puede reducir la velocidad de liberación (Dong et al., 2011; Neubauer et al., 2014). Los estudios de microscopía, en consecuencia, son necesarios para la descripción y evaluación de la microestructura interna y externa durante los fenómenos de liberación.

Factores que afectan la estabilidad estructural y las características de las microesferas, determinan varios mecanismos de liberación. Los mecanismos predominantes en las

cápsulas poliméricas son la erosión, la fragmentación, la difusión simple y el hinchamiento con difusión (Matalanis et al., 2011). En el caso de difusión simple, la velocidad de liberación se controla mediante ese mecanismo, y el agente bioactivo debe tener cierta afinidad con el medio circundante de la cápsula. Pero en el caso del hinchamiento con difusión la velocidad de liberación depende de la interacción de esos procesos. En el proceso de hinchamiento, la cápsula debe humectarse con medio acuoso, para liberar posteriormente el agente bioactivo (Xia, Wu, Liu, Theato, & Zhu, 2015). Finalmente, en el proceso de erosión y fragmentación, el polímero se degrada por disolución en el medio acuoso (Sackett & Narasimhan, 2011), liberando de manera progresiva o instantánea al principio activo.

El mecanismo de liberación, así como la tasa de liberación del agente activo (AE), se encuentra establecido por el tipo de biopolímero utilizado, la naturaleza química del agente activo y su relación con el medio ambiente externo. En nuestro caso el medio externo es el sistema digestivo al que nos referimos a continuación.

1.7 Aparato digestivo peces

El sistema digestivo de los peces, al igual que en otros animales (Figura 1-9), comienza en la cavidad bucal, seguida de un corto esófago que conecta al estómago, éste difiere mucho en forma y tamaño según la especie de pez (Sundby & Holm, 2015).

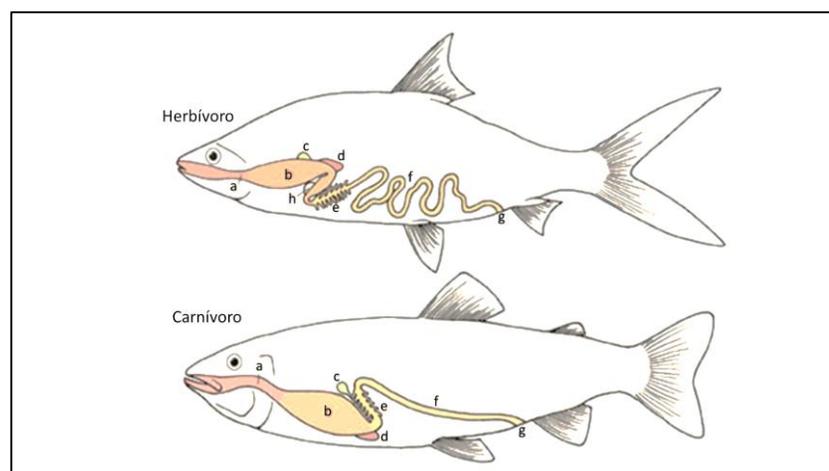


Figura 1-9: Sistema digestivo de un pez mostrando sus partes principales; (a) Esófago, (b) estómago, (c) vesícula biliar, (d) bazo, (e) ciegos pilóricos, (f) intestino, (g) ano, (h) molleja. (Myers, et al., 2017)

En muchos casos los estómagos de los peces presentan una curvatura, denominada zona sigmoidea, poco pronunciada en peces herbívoros, pero muy notoria en peces carnívoros u omnívoros, esto se debe a que estos últimos requieren de un tiempo de digestión mayor (Maldonado, 2012). El estómago de los peces tiene 4 capas bien definidas, desde el exterior se encuentra la capa cerosa, luego la muscular, submucosa y mucosa, esta última se encuentra tapizada de glándulas que secretan mucus, ácido clorhídrico, pepsina así como otras enzimas (Krogdahl, Sundby, & Holm, 2015; Maldonado, 2012). En el estómago se lleva a cabo la hidrólisis ácida y enzimática del alimento, sin embargo no se producen procesos de absorción de nutrientes a nivel estomacal (García, Hernandez, & Pardo, 2008). Según la especie de pez, el pH del estómago tiene una amplia variación, incluso dentro de una misma especie por razones de estado fisiológico y metabólico (Morken et al., 2012), en términos generales el pH estomacal de peces varía entre 2 a 7, siendo el valor usual 3 (Sundby & Holm, 2015).

El tránsito del alimento en el estómago tiene un tiempo variable pues depende fuertemente de la temperatura ambiental, sin embargo también influye el peso corporal y el nivel de consumo. En especies salmónidas por ejemplo el tránsito estomacal puede durar entre 2 a 5 horas, el que sumado al tránsito intestinal puede extenderse desde 5 a 40 horas en función de la temperatura ambiental (Maldonado, 2012).

Unido al estómago se encuentran los ciegos pilóricos, se trata de pliegues digitiformes tubulares cuya función es principalmente la digestión enzimática y la absorción de algunos nutrientes (Hernandez, Perez Gianneselli, & Domitrovic, 2009). Estos pliegues tienen un número variable, y dependen de la especie de pez, en el caso de salmónidos pueden llegar fácilmente a los 70 o más pliegues y en ellos se absorben principalmente glucosa y algunos aminoácidos (Myers, et al., 2017).

Unido a los ciegos pilóricos se encuentra la mucosa intestinal, esta se encuentra tapizada de glándulas, vasos sanguíneos y una gran cantidad de microvellosidades. En la mucosa intestinal se lleva a cabo la digestión enzimática y la absorción de la mayoría de los nutrientes, entre ellos lípidos y aminoácidos, lo que pasan de manera directa al riego sanguíneo (Hernandez et al., 2009; Myers et al., 2017). La velocidad de permeabilidad de los nutrientes a través de la mucosa intestinal depende de dos condiciones; el tamaño molecular y la liposolubilidad. A menor tamaño y mayor liposolubilidad más rápida es la

absorción del nutriente. El pH de la zona intestinal también es muy variable, pero en términos generales oscila entre 6,7 y 9,0 (Sundby & Holm, 2015).

Finalmente se encuentra la zona rectal y anal, compuesta por anillos musculares gruesos y con una alta elasticidad, y es la zona donde se eliminan las heces.

1.8 Hipótesis

H1: El incremento del grado de dispersión del aceite esencial dentro de la microesfera, aumenta significativamente la capacidad de carga y mejora la eficiencia de encapsulación.

H2: La encapsulación de aceite esencial de tomillo en microesferas de alginato de calcio permite proteger la bioactividad del aceite durante la digestión gástrica simulada en peces, permitiendo que este se libere a nivel intestinal incrementado así su biodisponibilidad.

1.8 Objetivo General

Desarrollar y caracterizar microesferas de alginato de calcio, cargadas con aceite esencial de tomillo, para evaluar la capacidad de mantener la actividad antifúngica después de un proceso de digestión simulada de peces.

1.8.1 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la concentración y grado de dispersión del aceite esencial, sobre las características físicas, eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de las microesferas obtenidas
- Caracterizar el efecto de la gelificación iónica sobre la microestructura interna y externa de las microesferas obtenidas.
- Evaluar el efecto de la concentración y grado de dispersión del aceite esencial sobre la tasa de liberación desde las microesferas en condiciones de pH digestivo de peces.
- Evaluar la capacidad antifúngica del aceite esencial de tomillo, post-liberación en condiciones digestivas simuladas, sobre *Saprolegnia sp.*

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

Para la formación de las microesferas se utilizó alginato de sodio (viscosidad media: 15 – 20 cps) y cloruro de calcio adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). El aceite esencial de tomillo (AET) fue obtenido por hidrodestilación con flujo de vapor a contracorriente en una columna de conos rotatorios (Perez Correa et al., 2014) en el Laboratorio de Compuestos de Alto Valor (Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile) a partir de hojas secas de tomillo (*Thymus vulgaris*). La composición final del AET utilizado para este estudio fue de 450 g/L de timol y 32 g/L de carvacrol.

2.2 Métodos

2.2.1 Grado de dispersión del AET

Previamente, se prepararon y seleccionaron emulsiones obtenidas con diversos grados de dispersión para evaluar el efecto del grado de dispersión del AET, sobre propiedades de las microesferas. Los grados de dispersión se obtuvieron por la combinación de diferentes velocidades y tiempos de dispersión durante la emulsificación. Para ello, se preparó una solución de alginato de sodio (1,0% p/v) por disolución en agua destilada a 35°C. La dilución se agitó por 12 horas a 200 rpm en un agitador magnético (Boeco, modelo MMS-3000, Hamburgo, Alemania). Las emulsiones se prepararon usando un equipo Ultra-Turrax (IKA, modelo T-25D, Staufen, Alemania) mezclando el AET con la solución de alginato hasta alcanzar una concentración final de AET del 1,0%(v/v). Para los diferentes grados de dispersión, se utilizaron siete velocidades (6.000, 8.000, 10.000, 12.000, 14.000, 16.000, 18.000 rpm) combinadas con tres tiempos de dispersión (1, 3 y 5 min). Las emulsiones obtenidas fueron sometidas a vacío durante 2 minutos para eliminar las burbujas de aire. Finalmente las emulsiones se evaluaron en términos de tamaño de gota de fase dispersa y la polidispersión de estas.

2.2.2 Evaluación y selección de las emulsiones a encapsular.

Tanto el tamaño de gota de fase dispersa, como la polidispersión de éstas, son parámetros que determinaron el grado de dispersión y la homogeneidad de las emulsiones obtenidas

(Mabille, Leal-Calderon, Gorria, Bibette, Faye, Deminiere, 2000; Mabille, Leal-Calderon, Bibette, & Schmitt, 2003).

Para determinar el tamaño de gota de fase dispersa, y la homogeneidad de ésta, se efectuaron observaciones microscópicas de las muestras de emulsiones. Para ello se utilizó un microscopio óptico (Olympus, modelo BX61, Tokio, Japón) equipado con cámara y sistema de adquisición de datos (Olympus, modelo UTV0.5C-3, Tokio, Japón). Las imágenes obtenidas se analizaron mediante análisis de imagen utilizando el software Image-Pro Plus (Versión 6.0.0.260-2006, Rockville, Washington, EE.UU.). Se determinaron los diámetros de las gotas de fase dispersa (AET) para cada muestra de emulsión. Finalmente se determinaron el tamaño promedio de gota de la fase dispersa y su polidispersión.

2.2.2.1. Tamaño de gota de fase dispersa (AET).

El tamaño promedio de gota de fase dispersa se determinó a partir diámetro de *Sauter* (D_{32}), que se define como la razón entre el volumen y la superficie de las gotas. Esta es una medida representativa del tamaño medio de las gotitas en la fase dispersa (Bouyer et al., 2012). El diámetro de *Sauter* se calculó de la siguiente manera:

$$D_{32} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad (2.1)$$

En donde:

n_i = número de gota

d_i = diámetro de gota

2.2.2.2. Polidispersión.

La polidispersión es una medida del tamaño de la distribución de gotitas de la fase dispersa, que se puede calcular usando la siguiente expresión (Mabille, C., Leal-Calderon, F., Bibette, J., & Schmitt, 2003):

$$P = \left(\frac{1}{\bar{d}}\right) \times \left(\frac{\sum (d_i^3 \times |\bar{d} - d_i|)}{\sum d_i^3}\right) \quad (2.2)$$

En donde:

d_i = diámetro de gota

\bar{d} = diámetro promedio de gota

En la medida que la polidispersión sea pequeña, más homogéneo será el tamaño de gotas de la fase dispersa. Una polidispersión igual a cero indicaría que cada gota, de la fase dispersa, es exactamente igual a las otras, por lo que no existe una distribución de tamaño. Se consideran polidispersiones razonablemente homogéneas las que sean $\leq 0,5$.

2.2.2.3 Selección condiciones de emulsificación

Se seleccionaron emulsiones homogéneas, es decir con una polidispersión $\leq 0,5$ (Mabille, C., Leal-Calderon, F., Bibette, J., & Schmitt, 2003), y con tamaños de gota de fase dispersa (AET) significativamente diferentes. De esta manera fue posible encapsular el AET con diferentes grados de dispersión y evaluar este efecto en las características y propiedades de las microesferas obtenidas.

2.2.3. Preparación de microesferas

Una vez seleccionadas las condiciones de dispersión, se prepararon emulsiones siguiendo el protocolo descrito, con tres concentraciones finales de AET (1, 2 y 3% v/v). Para la formación de las microesferas, las emulsiones de alginato-AET obtenidas, se extruyeron con una jeringa a través de una aguja de diámetro 0,55 mm y se gotearon en una solución gelificante de cloruro de calcio (1,0% p/v). La punta de la aguja se fijó a 30 cm por encima de la superficie del baño gelificante. La velocidad de caída se fijó en 30 gotas por minuto (Figura 2-1). La solución gelificante se agitó suavemente con un agitador magnético a temperatura ambiente (20°C). Las microesferas se mantuvieron en el baño de gelificación durante 1 h para fomentar la reticulación entre el alginato y el calcio. Las microesferas obtenidas se secaron en estufa durante 24 h a 40°C.

2.2.4. Caracterización de las microesferas.

La caracterización de las microesferas se basó en la evaluación física (forma y tamaño) y en la evaluación de los parámetros asociados a la calidad del proceso de encapsulación: el rendimiento (Y%), la eficiencia de encapsulación (EE%) y la capacidad de carga (CC%), detallados a continuación.

2.2.4.1. Rendimiento del proceso de microencapsulación (Y%).

El rendimiento es la relación porcentual, entre la masa de microesferas obtenidas y la masa de emulsión utilizada en el proceso de encapsulación. El rendimiento del proceso de encapsulación se calculó usando la siguiente expresión:

$$Y(\%) = \left(\frac{M_m}{M_e}\right) \times 100 \quad (2.3)$$

En donde:

M_n = Masa de microesferas obtenida

M_e = Masa de emulsión dispuesta para encapsular

2.2.4.2. Eficiencia de encapsulación (EE%) y capacidad de carga (CC%).

La cantidad de aceite esencial de tomillo (AET) encapsulada en las microesferas de alginato se determinó por espectrofotómetro UV-visible (Biochrom, modelo WPA, Cambridge, RU) siguiendo el método descrito por Hosseini et al., (2013) con pequeñas modificaciones. En resumen, se vertió una muestra de 100 mg de microesferas en 10 mL de una mezcla de etanol-agua (1:1) y se agitó durante toda la noche.

La absorbancia de la solución obtenida se midió a 260 nm utilizando carvacrol como referencia. La concentración de la muestra se calculó utilizando una curva de calibración. Para la construcción de la curva de calibración, se utilizó AET a diferentes concentraciones conocidas, midiendo la absorbancia a 260 nm. La %EE y %CC de la encapsulación se calcularon utilizando las siguientes expresiones:

$$\%CC = \frac{M_a}{M_m} \times 100 \quad (2.4)$$

En donde:

M_a = Masa AET en una muestra de microesferas

M_m = Masa de una muestra de microsferas

$$\%EE = \frac{M_{aec}}{M_{aem}} \times 100 \quad (2.5)$$

En donde:

M_{aec} = Masa del AET encapsulado

M_{aem} = Masa del AET en la emulsión

2.2.4.3. Caracterización de la forma y tamaño de las microesferas.

La forma y el tamaño de las microesferas se determinaron a través de microscopía óptica, para ello se utilizó un microscopio óptico (Olympus, modelo BX61, Tokio, Japón), equipado con cámara y sistema de adquisición de datos. Las imágenes obtenidas se analizaron mediante el software Image-Pro Plus (Versión 6.0.0.260-2006).

Se midió el diámetro máximo (D_{max}) y el diámetro perpendicular a este (D_{per}) de cada microesfera. A continuación, se calcularon el tamaño de las microesferas y la esfericidad. El tamaño de las microesferas se calculó a partir del promedio entre D_{max} y D_{per} . La esfericidad se obtuvo utilizando el factor de esfericidad (SF) como indicador de la redondez de las microesferas (Chan, 2011). Un valor alto de SF indica un mayor grado de distorsión de la forma, mientras que el valor cero indica que la partícula es una esfera perfecta. El SF se puede calcular utilizando la siguiente expresión:

$$SF = \frac{D_{max} - D_{per}}{D_{max} + D_{per}} \quad (2.6)$$

Se considera que si $SF \leq 0,05$ es una cápsula esférica (Chan, 2011).

2.2.5 Caracterización de la microestructura de las microesferas.

La microestructura interna y externa de las microesferas tienen un efecto importante en la mecánica (Neubauer et al., 2014) y en la tasa de liberación (Matalanis et al., 2011). La liberación de AET puede verse afectada por la integridad y porosidad de la microesfera y los cambios de su microestructura durante la digestión. Los estudios de microscopía son necesarios para la descripción y evaluación de la microestructura interna y externa.

2.2.5.1 Microscopía de fluorescencia (FM)

Con el fin de evaluar la distribución del AET en las microesferas se utilizó la microscopía de fluorescencia. Previamente el AET se pigmentó con oxazona, un cromóforo lipófilo (0,05 g/L) (Sigma-Aldrich, lote 30H3730). Las microesferas con AET pigmentado se observaron utilizando un microscopio óptico (Olympus modelo BX61, Tokio, Japón) en modo de fluorescencia, equipado con cámara y sistema de adquisición de datos (Olympus, modelo U-TV0.5C-3, Tokio, Japón). Las imágenes se obtuvieron digitalmente en formato PNG con dimensiones de 681 x 508 píxeles, y se analizaron mediante análisis de imagen utilizando el software Image-Pro Plus (Versión 6.0.0.260-2006, Rockville, Washington, EE.UU).

2.2.5.2. Microtomografía de rayos X

La microtomografía de rayos X permite evaluar estructuras internas, sin la necesidad de fracturar las microesferas, y por lo tanto no altera la microestructura interna de las microesferas. Las imágenes microtomografía de rayos X, se tomaron en un micro-CT de alta resolución (Bruker, modelo SkyScan 1272, Massachusetts, EE.UU.), utilizando rayos X monoenergéticos a 25 keV. Las muestras de microesferas se dispusieron en tubos Eppendorf para las mediciones. Las imágenes se obtuvieron digitalmente en formato PNG con dimensiones de 1366 x 768 píxeles.

2.2.5.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) se realizó en el Departamento de Anatomía, Histología y Patología de la Universidad Austral de Chile. Las muestras se cubrieron con oro/paladio usando un evaporador de vacío y se analizaron con el microscopio electrónico (LEO electron microscopy Ltd., Cambridge, RU). Las imágenes fueron obtenidas digitalmente en formato TIF con dimensiones de 1024 x 768 píxeles (EDS INCA x vista, Oxford instrumentos, Oxford, Reino Unido). Se analizaron las características microestructurales de la superficie y las secciones transversales de las microesferas.

2.2.6 Capacidad antibacteriana de las microesferas (condiciones *in vitro*)

Con el fin de evaluar la actividad antimicrobiana del AET encapsulado, se efectuó un ensayo de difusión de agar, propuesto por Özyildiz, Karagönlü, Basal, Uzel, & Bayraktar (2012). Se practicaron tres perforaciones de 10 mm de diámetro con un sacabocados en las placas con agar Muller Hinton (MHA, Merck, Darmstadt, Alemania). Se diseminaron 100 µL de cultivos bacterianos que contenían 10^7 - 10^8 UFC/mL en la placa con MHA. Las perforaciones se cargaron con 50 mg de microesferas, y las placas se incubaron a 37°C durante 24 h. Los diámetros de inhibición se midieron considerando un efecto inhibitor para halos ≥ 11 mm. Se utilizaron microesferas de alginato sin AET para el control.

La actividad antibacteriana se evaluó en las especies bacterianas del tipo gramnegativas: *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) (Guard-petter, 2001), *Escherichia coli* (ATCC 25922) (Road, 1997), y especies grampositivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) (Bergonier et al. Al., 2014) y *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) (Adzitey & Huda, 2010). Todas las cepas bacterianas fueron obtenidas del Laboratorio de Microbiología Avanzada del Depto. de Ingeniería Química y Bioprocesos (Pontificia Universidad Católica de Chile).

2.2.7 Estudios de la mecánica de liberación: Evaluación del hinchamiento.

Dado a que el mecanismo predominante de liberación, en microcápsulas y microesferas de alginato es el hinchamiento, se evaluó este fenómeno usando el método modificado descrito por Dima et al., (2014). Se prepararon soluciones fisiológicas de tampón de fosfato (SFT) normalizadas a pH 2,9 y pH 8,1 (emulando el pH del estómago e intestino de peces respectivamente)(Krogdahl et al., 2015). Paralelamente en cada solución de 60 mL, se introdujeron 1,0 g de microesferas y se mantuvieron durante 3 horas a 20°C. Las muestras de microesferas se retiraron de las soluciones a intervalos regulares de tiempo (15, 30, 60, 120 y 180 minutos), se secaron con papel de filtro y posteriormente se pesaron. El grado de hinchamiento (% S_w) se calculó usando la ecuación (2.7).

$$\%S_w = \left(\frac{P_t - P_0}{P_0} \right) \times 100 \quad (2.7)$$

En donde:

P_t = *Peso microesferas hinchadas en tiempo t*

P_0 = *Peso microesferas secas (tiempo 0)*

2.2.8 Estudios de la tasa de liberación: Bioaccesibilidad del AET.

La evaluación de la bioaccesibilidad en condiciones *in vitro* del AET, se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Hosseini et al., (2013). Se añadieron 0,1 g de microesferas en 6 ml de SFT a pH 2,9 (pH estomacal simulado), al mismo tiempo se colocaron 0,1 g de microesferas a pH 8,1 (pH intestinal simulado). Las suspensiones se agitaron en una incubadora orbital (Stuart, modelo S1500, Staffordshire, UK) a 20°C. Posteriormente, se recogieron muestras de los tubos a los tiempos de 15, 30, 60, 120 y 180 minutos y se filtraron utilizando un filtro de jeringa (Biofil, tamaño de poro 0,22 µm, Kowloon, Hong Kong). A continuación, las suspensiones filtradas se diluyeron (1:1) en etanol puro (Merck, Darmstadt, Alemania). La concentración del AET en las suspensiones se determinó por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm (usando carvacrol como patrón) a través de un espectrofotómetro UV-VIS (Spectroquant, modelo Pharo 300, Darmstadt, Alemania). La muestra en blanco fue una solución de SFT/etanol 1:1. Para determinar la concentración de AET se elaboró, previamente, una curva de calibración de AET a diferentes concentraciones en una solución de SFT/etanol 1:1. La tasa de liberación de AET (R%) se calculó con la Ec. (2.8).

$$R\% = \left(\frac{M_t}{M_0} \right) \times 100 \quad (2.8)$$

En donde:

M_t = *Masa de AET liberada al tiempo t*

M_0 = *Masa total de AET en las microesferas*

2.2.9 Capacidad antimicrobiana del AET post-digestión (*in vitro*).

Para evaluar la actividad antimicrobiana post-digestión, se efectuó un desafío contra la especie *Saprolegnia sp.* Las muestras de *Saprolegnia sp.* se obtuvieron de carpas Koi (*Cyprinus carpio*) infectadas por saprolegniosis. El aislamiento y purificación de la *Saprolegnia sp.* se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Zaror et al., (2004) en el Laboratorio de Microbiología de la Pontificia Universidad Católica de Chile (Santiago de Chile).

La actividad antimicrobiana del AET liberado desde las microesferas, se evaluó mediante el método propuesto por Wang, Gong, Huang, Yu, & Xue, (2009), con algunas modificaciones. Se dispusieron muestras de las microesferas, cuya concentración de AET maximizara la capacidad de carga (2% v/v AET), en diferentes cantidades (1,0; 0,5; 0,1 y 0,05 g) en 10 mL de solución fisiológica tamponada (SFP) a un valor de pH de 2,9 (pH estomacal simulado del pez). La suspensión se incubó a 20°C durante 3 h. A continuación, se ajustó la suspensión a pH 8,1 usando NaOH (pH simulado del intestino del pez). Las suspensiones se filtraron usando un filtro de jeringa (Biofil, tamaño de poro 0,22 µm, Kowloon, Hong Kong). Finalmente las suspensiones filtradas se mezclaron con 10 mL de solución de agar papa dextrosa (PDA, Merck, Darmstadt, Alemania), se plaquearon y se dejaron coagular. Posteriormente las placas se inocularon con micelio de *Saprolegnia sp.* El micelio (10 mm de diámetro) se dispuso en el centro de la placa de agar, en un pozo practicado con un sacabocados. Las placas se incubaron a 30 ° C durante 6-7 días, hasta que el crecimiento del hongo en la placa control negativo (sin AET) alcanzó el borde de las placas. A continuación, se midieron los diámetros de crecimiento miceliar considerando un efecto inhibitor para diámetros miceliares ≤ 40 mm. Como control negativo se utilizaron placas con agar PDA al que se le incorporó el producto de digestión de microesferas de alginato de calcio sin AET.

2.2.10 Análisis estadístico

Se aplicó un diseño experimental aleatorio. Todas las muestras fueron triplicadas con el fin de determinar la media y la desviación estándar. Los datos se analizaron con el software Sthatgraphics Centurion XV (versión 15.2.05, Warrenton, Virginia, EE.UU.) utilizando el

análisis de varianza ANOVA y prueba LSD, y el nivel de significancia se estableció en $\alpha = 0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Selección de condiciones de emulsificación

Para seleccionar las condiciones de emulsificación fue necesario caracterizar las emulsiones obtenidas. Para este propósito, se evaluaron tanto el tamaño de gota de fase dispersa (AET) a través del diámetro de *Sauter* (S_{32}), y la homogeneidad del tamaño de gota a partir de la polidispersión. Estos resultados se muestran a continuación.

3.1.1. Polidispersión de la fase dispersa

En el proceso de emulsificación, tanto la velocidad como el tiempo de dispersión, tuvieron un efecto inversamente proporcional en la polidispersión (figura 3-1). Estos factores, juntos o individualmente, disminuyeron la polidispersión, mejorando significativamente la homogeneidad de la fase dispersa en las emulsiones. Las propiedades de una emulsión están en función de la intensidad del proceso de emulsificación, es decir, la velocidad y tiempo de agitación. Se determinó que, velocidades de 8.000 rpm o menores aumentaron la heterogeneidad de tamaño de la gota de la fase dispersa.

Nuestro estudio fue consistente con lo observado por Ruiz-Márquez, Partal y Gallegos (2010), quienes demostraron que emulsiones obtenidas a bajas velocidades de dispersión fueron menos estables, dado su bajo de homogeneidad, favoreciendo la separación de fases. Sin embargo, al incrementar la velocidad de dispersión la homogeneidad de las emulsiones aumenta de manera significativa.

Las velocidades superiores a 10.000 rpm (figura 3-1) permitieron obtener polidispersiones apropiadas (≤ 0.5). Según Mabile, Leal-Calderon, Gorria, Bibette, Faye, Deminiere (2000), si el proceso de emulsificación se produce a alta velocidad, se forma un flujo turbulento, caracterizado por pequeños remolinos en el flujo durante la dispersión. Estos remolinos ejercen esfuerzos de cizalla sobre las gotas de la fase dispersa (Mason, 1999), afectando así el tamaño y la uniformidad de las gotas.

Se determinó que un aumento en el tiempo de agitación generó un incremento en la homogeneidad en la fase dispersa, sin embargo, esto solo fue significativo para velocidades de agitación entre 12.000 y 14.000 rpm y para un tiempo de agitación de 5 minutos.

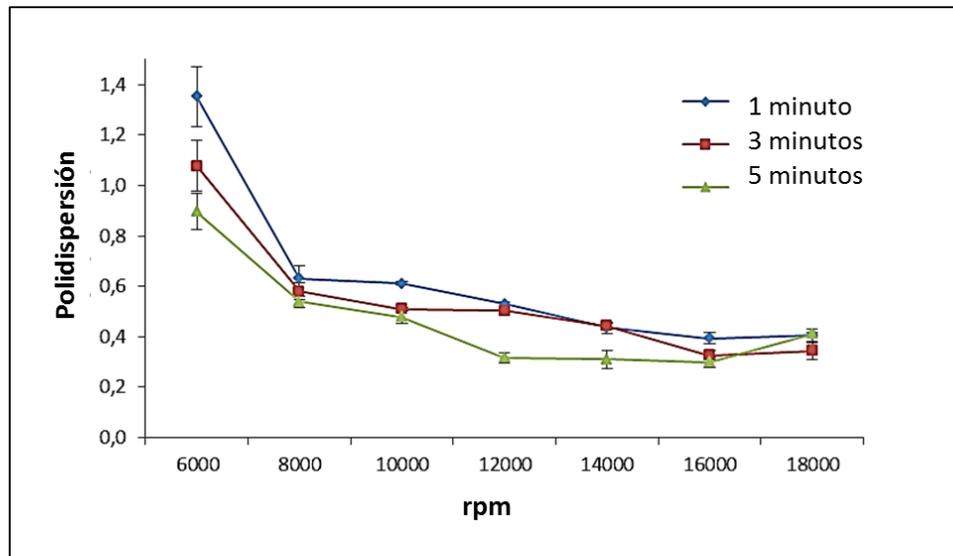


Figura 3-1: Polidispersión de la fase dispersa (AET). Se obtuvieron emulsiones variando la velocidad y los tiempos de dispersión, para AET a una concentración del 1% v/v. Las barras de error indican desviaciones estándar (SD), valores *p*: 1 min: 0,0063; 3 min: 0,0042; 5 min: 0,0057.

El efecto del tiempo se debe a que para que una gota se rompa durante la homogeneización, el tiempo de acción de las fuerzas disruptivas debe ser mayor que el tiempo requerido para la deformación de las gotitas (Mabille, C., Leal-Calderon, F., Bibette, J., & Schmitt, 2003). En este caso, el tiempo requerido para la rotura de la gota fue de 5 min.

De acuerdo con estos resultados, la mejor condición para obtener una polidispersión adecuada ($\leq 0,5$) fue un tiempo de 3-5 minutos a velocidades de agitación de 10.000 rpm, ya que esta configuración permitió producir emulsiones homogéneas.

3.1.2. Tamaño de gota de fase dispersa (AET)

Para calcular el diámetro medio de gota de la fase dispersa, se utilizó el diámetro medio de Sauter (D_{32}). Este parámetro relaciona el volumen y la superficie de las gotitas de la fase dispersa, haciendo de este un diámetro medio más representativo en emulsiones. Se calculó el diámetro de Sauter (D_{32}) para las emulsiones seleccionadas en la sección 3.1.1, es decir

emulsiones obtenidas a partir de 10.000 rpm por 3 a 5 min. Los D_{32} se midieron con el objetivo de establecer los grados de dispersión del AET en las emulsiones, y evaluar su posterior efecto en las características de las microesferas. Se seleccionaron emulsiones que mostraron diferencias significativas en sus D_{32} de gota de fase dispersa, para el posterior proceso de encapsulación.

Como se muestra en la Figura 3-2, para un tiempo de dispersión de 3 min, no se encontraron diferencias significativas entre los D_{32} . La excepción es una velocidad de agitación de 10.000 rpm, lo que generó un D_{32} significativamente mayor (5,07 μm en comparación con otras emulsiones de 3,00 μm en promedio). Sin embargo, para un tiempo de dispersión de 5 min, a velocidades de 10.000, 14.000 y 18.000 rpm los D_{32} de gota de la fase dispersa resultaron ser significativamente diferentes entre sí (valor $p = 0,0002$), asegurando diferentes grados de dispersión en las emulsiones (3,77; 3,01 y 2,28 μm , respectivamente).

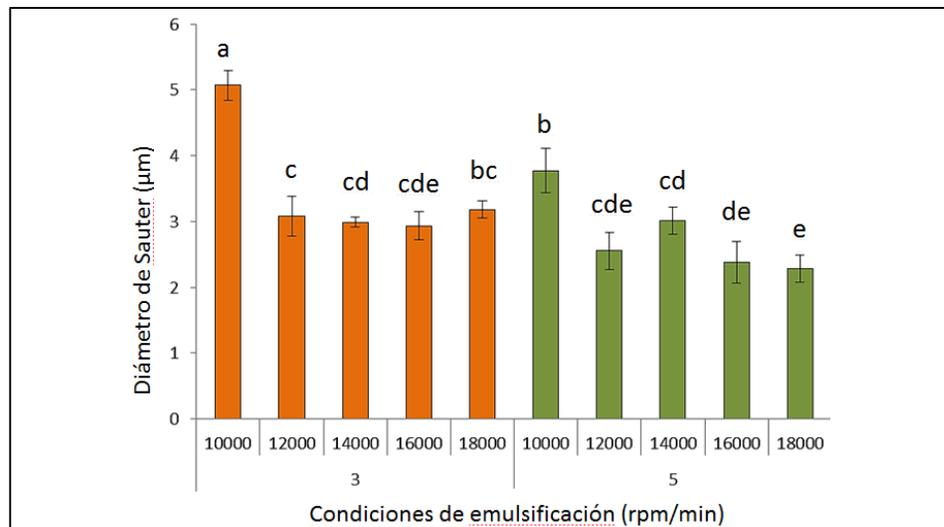


Figura 3-2: Diámetro medio de Sauter (D_{32}) de emulsiones obtenidas en diferentes condiciones de dispersión (velocidad y tiempo). La fase dispersa (AET) a una concentración de 1% v/v. Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes (valor $p = 0,0002$).

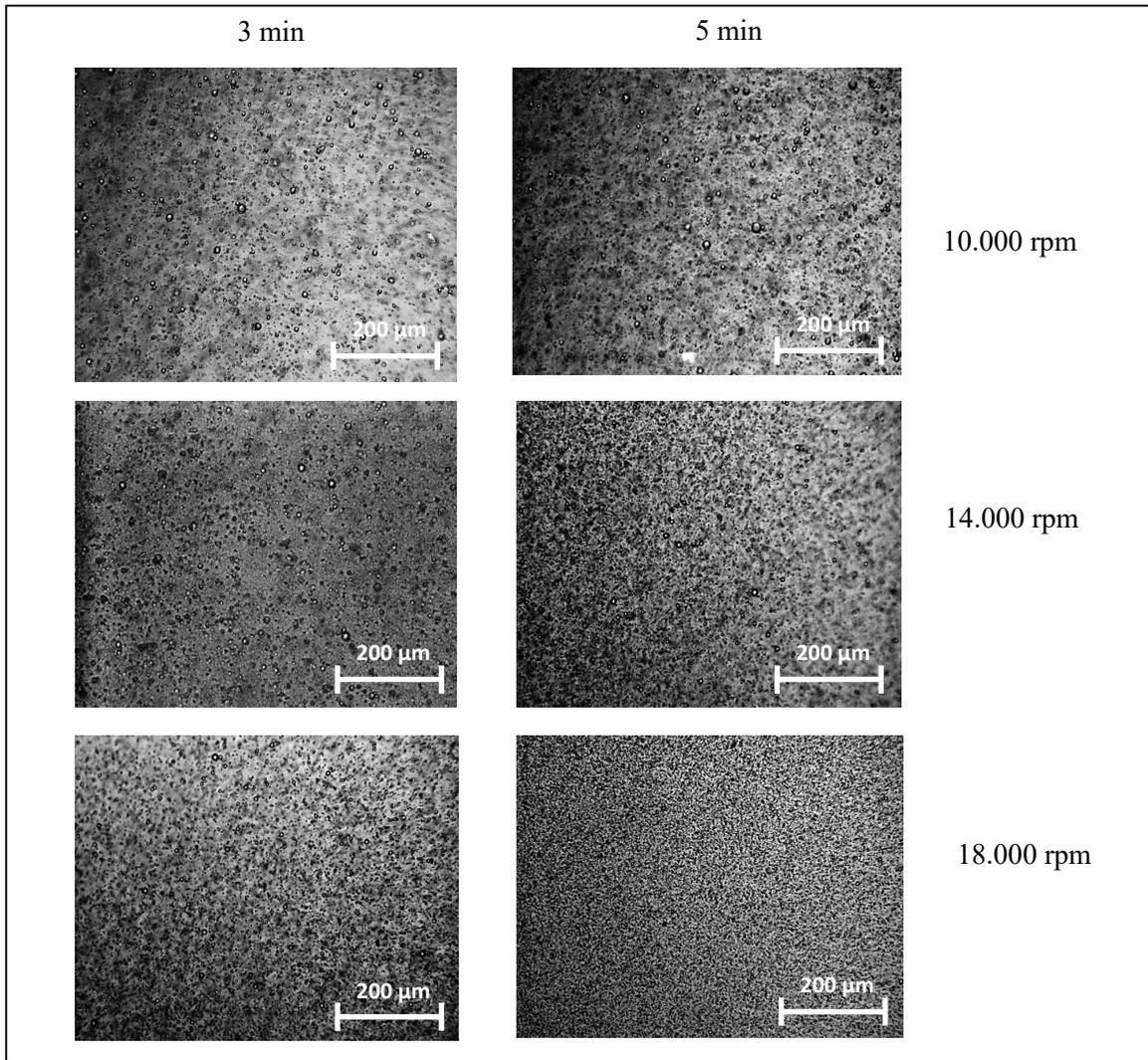


Figura 3-3: Detalle de las emulsiones obtenidas bajo diferentes condiciones de dispersión (velocidad y tiempo). La fase dispersa (AET) a una concentración de 1% v/v.

El aspecto de las emulsiones se puede apreciar en la imagen 3-3. Obtenida por microscopía óptica. Para que una gota de fase dispersa se rompa durante la homogenización, las fuerzas disruptivas deben exceder las fuerzas interfaciales. Estas fuerzas disruptivas, establecidas por la velocidad y tiempo de dispersión, generan un cizallamiento en las gotas de AET. Como consecuencia de este esfuerzo de cizalla las gotas de la fase dispersa se rompen haciéndose más pequeñas (Mason, 1999). El tamaño de las gotas disminuye a medida que el tiempo y/o velocidad de dispersión se incrementa. El tamaño mínimo de tamaño de gota que

se puede alcanzar depende de varios factores, como la concentración y viscosidad del polímero, presencia de emulsionantes y la potencia del mezclador entre otros.

Basándose en estos resultados, se encapsularon emulsiones obtenidas a partir de un tiempo de emulsión de 5 min y velocidades de 10.000, 14.000 y 18.000 rpm. Además, se evaluó el efecto de la concentración de AET (1%, 2% y 3% v/v). Las microesferas obtenidas se evaluaron en función del tamaño, forma, rendimiento (Y%), capacidad de carga (CC%) y eficiencia de encapsulación (EE%).

3.2. Evaluación del tamaño y forma de las microesferas

El tamaño y la forma de las microesferas se evaluaron mediante el diámetro de *Sauter* (D_{32}) aplicado a las microesferas, y el Factor de Esfericidad (SF), respectivamente. Las microesferas con $SF \leq 0,05$ se consideraron esféricas. Se pudo observar un aumento en el D_{32} de las microesferas, proporcional a la cantidad de AET incorporada. Al incrementar el contenido de AET del 1% y 3% v/v, se generó un aumento del D_{32} desde 450 a 530 μm , es decir un incremento del 18% en promedio del D_{32} . El efecto de la concentración del AET sobre el tamaño de las microesferas se muestra en la figura 3-4.

Debe observarse que la diferencia en el tamaño de las microesferas es sólo perceptible después del el secado. El tamaño medio de las microesferas húmedas fue de 890 μm sin diferencias significativas con respecto al contenido de AET. El grado de dispersión del AE (generado por la velocidad de dispersión) no tuvo efecto significativo sobre el tamaño de las microesferas secas ni húmedas, ni mostró una tendencia al respecto (valor $p = 0,843$).

El efecto de la concentración de AET sobre el tamaño de las microesferas puede ser explicado a partir de la formación de gota de emulsión alginato-AET durante el goteo en la solución gelificante (Ca^{++}). Esto es porque la gota requiere una masa mínima capaz de romper la tensión superficial, para precipitar su caída (por efecto de la gravedad). El AET incorporado reduce la densidad de la gota formada. De este modo, se requiere un volumen mayor para que la masa de la gota pueda romper la tensión superficial y precipitar sobre la

solución gelificante. Como consecuencia de lo anterior un incremento del contenido de AET permite la obtención de microesferas más grandes. Este resultado es concordante con varios estudios (Banerjee et al., 2013; Hosseini et al., 2013; Lertsutthiwong et al., 2008).

Se pudo observar que las microesferas obtenidas, independientemente del grado de concentración y dispersión de AET, no presentaban forma esférica sino de óvalo. Por otra parte, se determinó que un aumento del contenido de AET, independientemente de su grado de dispersión, afecta significativamente a la pérdida de esfericidad de las microesferas. Esta diferencia significativa se produce aumentando el contenido de aceite de 1% a 3% v/v. Este fenómeno es causado por cambios en la viscosidad de la emulsión mediante la adición de AET.

Por otro lado Chan (2011) señaló que también influye la distancia entre la aguja y la superficie del medio de encapsulación. Los efectos sobre la viscosidad de la emulsión pueden alterar la fluidez durante el goteo, afectando la forma de la gota. Durante la gelificación con calcio, la forma tiende a permanecer, pero dada la turgencia de la microesfera por el contenido de agua, el efecto sobre la forma no es evidente. Sin embargo, una vez que las microesferas se secan el efecto del contenido de aceite en la forma se hace más perceptible.

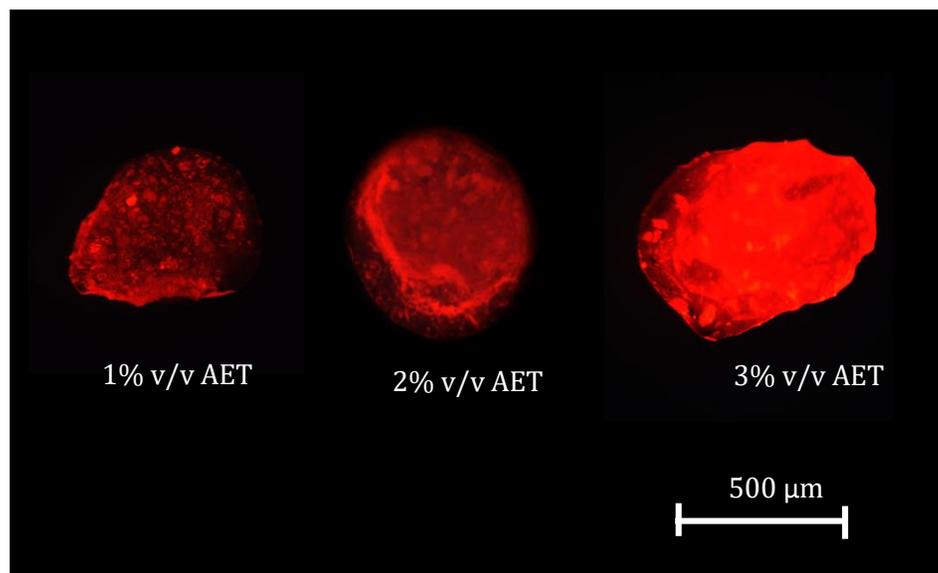


Figura 3-4: Fotografía de microscopía de fluorescencia. Se muestra el efecto de la concentración de AET, sobre el tamaño y la forma de las microesferas de alginato. La muestra se preparó a diferentes concentraciones de aceite esencial (1%, 2% y 3% v/v), se dispersó a 10.000 rpm durante 5 min.

3.3. Caracterización microesferas: Rendimiento (Y%), eficiencia de encapsulación (EE%) y capacidad de carga (CC%)

Las microesferas obtenidas se evaluaron según la Capacidad de Carga (CC%), la Eficiencia de Encapsulación (EE%) y el Rendimiento (Y%) del proceso de encapsulación, con los siguientes resultados:

3.3.1. Rendimiento (Y%)

En cuanto al rendimiento, no se encontraron diferencias o tendencias significativas en ninguno de los casos estudiados (valor $p = 0,7073$). En promedio, el rendimiento se estableció en torno al 61,2% con valores entre 60,2% y 62,3%. Los bajos rendimientos pueden explicarse por la pérdida de emulsión que se produce durante la transferencia de la emulsión entre el tubo de emulsión y la jeringa. También existen pérdidas durante el proceso de goteo a través de la jeringa. Banerjee et al. (2013) fueron capaces de obtener rendimientos por encima del 80% para el aceite esencial de limonelo. Sin embargo, utilizaron la técnica de coacervación con evaporación de solvente, por lo que las microesferas se formaron espontáneamente dentro del medio acuoso, sin existir pérdidas significativas de producto.

Ribeiro, Neufeld, Arnaud, & Chaumeil (1999) obtuvieron rendimientos similares a esta investigación (60-80%). Sin embargo, ellos requirieron el uso de emulsiones dobles (aceite/agua/aceite) y la interacción de alginato-quitosano, lo que aumenta la complejidad del proceso de encapsulación, en comparación a este estudio.

3.3.2. Eficiencia de encapsulación (EE%)

Con respecto al EE% (Figura 3-5), fue posible establecer una relación inversa entre el contenido de AET y el EE%. En todos los casos estudiados, un aumento en el contenido de AET disminuyó significativamente el EE% (valor $p = 0,00001$), un incremento del 1% al 3% del AET disminuyó en un 14% la EE%. Este resultado es consistente con los reportados por Hosseini et al. (2013), quien informó que un aumento del contenido de aceite esencial de orégano de 1% a 3% disminuye el EE% de microesferas en un 21%.

En este estudio, se observó una disminución de EE% por el aumento del contenido de AET, este efecto se puede explicar por la capacidad máxima que tiene la microesfera para contener aceite. Se pudo observar que un incremento en el contenido de AET por sobre un 2% v/v, provoca la saturación de la capacidad de la microesfera, por lo que una cantidad significativa de AET queda en la superficie o cerca de ella. Es muy probable que durante el secado de las microesferas este AET se volatilice junto con el agua, reduciendo el EE%.

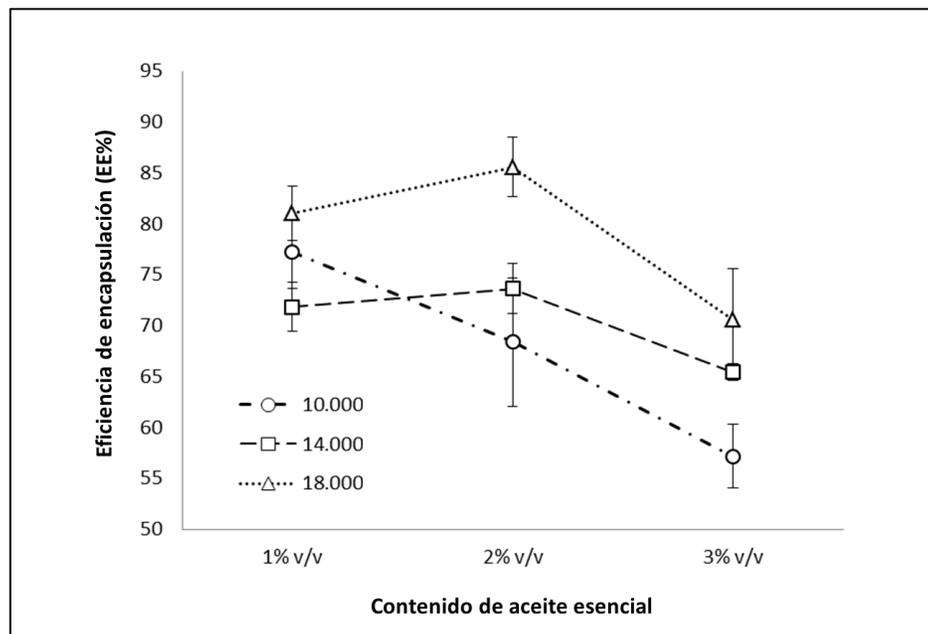


Figura 3-5: Efecto de la concentración de AET sobre la eficiencia de encapsulación (EE%). Efecto a diferentes velocidades de dispersión (10.000, 14.000 y 18.000 rpm) y concentraciones de AET del: 1%, 2% y 3% v/v. Los puntos representan el promedio de 3 ensayos y 2 repeticiones, las barras de error indican SD (valor $p = 0,00001$).

Sin embargo, el grado de dispersión de la AET dentro de la microesfera es decisivo para el EE%. La figura 3-5 muestra que la EE% es significativamente más alta para las emulsiones obtenidas a un alto grado de dispersión (18.000 rpm). Esto se puede explicar, debido a que un mayor grado de dispersión permite la generación de pequeños *clusters* de AET en la microesfera, que se distribuyen finamente entre las cadenas de alginato, ocupando la mayor parte de los espacios libres, aumentando la capacidad de la microesfera.

Basándonos en estos resultados, podemos indicar que la mejor EE% (> 85%) se obtuvo con un alto grado de dispersión (18.000 rpm por 5 min) a una concentración de 2% v/v de AET. Banerjee et al. (2013) obtuvieron eficiencias de 83,8%, pero requirieron del uso de un agente emulsionante (Tween-80) que mejoró la retención de aceite esencial, pero a un mayor costo y en un proceso más complejo, debido a que se utilizó dobles emulsiones y evaporación de solvente para formar las cápsulas. Baimark & Srisuwan (2014) determinaron que para EE% superiores al 80% se lograban a bajas concentraciones de aceite esencial (concentraciones del 10% v/v respecto al polímero encapsulante), por lo que si bien la EE% es alta, la CC% es extremadamente baja, comparadas con las de esta investigación.

3.3.3. Capacidad de carga (CC%)

La CC% se refiere a la cantidad (en peso) de aceite esencial que es capaz de contener una microesfera y es dependiente de la cantidad de polímero utilizada. En este estudio, la concentración de polímero utilizado (alginato) es de 1% p/v, por lo que se determinó la CC% para esta condición.

La figura 3-6 muestra las diferentes CC% dependiendo de la cantidad de AET utilizada y su grado de dispersión. Los resultados indican que existe una relación proporcional directa entre CC% y la cantidad de AET en la emulsión. Un incremento del 1% al 3% de AET en las emulsiones encapsuladas, incrementaron del 33% al 52% la CC% de las microesferas. Este comportamiento se expresó en todos los grados de dispersión, indicando que una microesfera que contiene alginato al 1% p/v es capaz de cargar más del 50% en peso de AET en promedio. Por otro lado la figura 3-6 también muestra que el CC% de las microesferas aumenta significativamente si el grado de dispersión de la AET es mayor.

Como se observa en este estudio, una emulsión con un grado de dispersión alto (una mayor relación área/superficie), permite una mayor incorporación de la fase oleosa (AET) entre las cadenas de alginato durante la gelificación con calcio, lo que favorece la CC% de la microesfera.

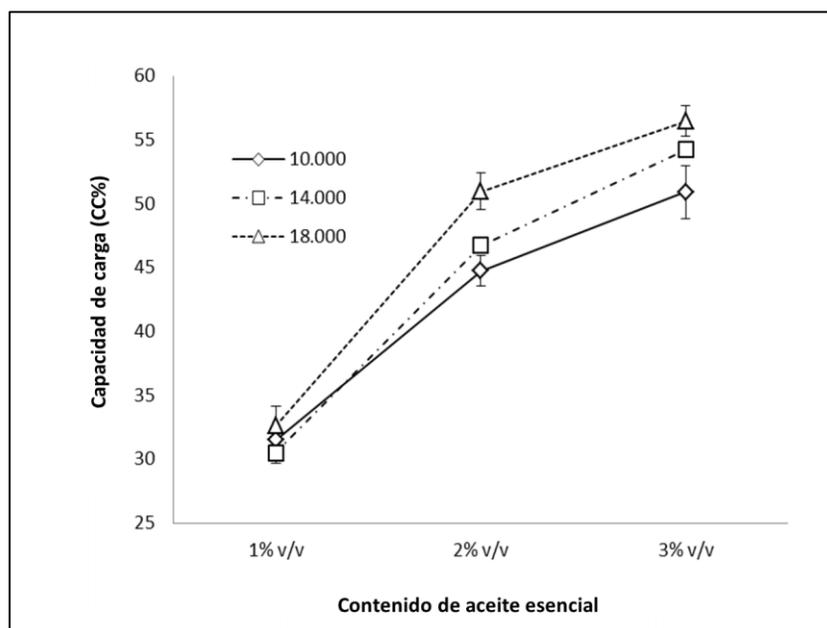


Figura 3-6: Efecto de la concentración y grado de dispersión del AET de las emulsiones en la capacidad de carga (CC%) en microesferas de alginato obtenidas. Los grados de dispersión fueron obtenidos a diferentes velocidades de dispersión (10.000, 14.000 y 18.000 rpm/5min.) y concentraciones utilizadas de AET fueron de: 1%, 2% y 3% v/v. Los puntos representan el promedio de 3 ensayos y 2 repeticiones, las barras de error indican SD (valor $p = 0,00001$)

En nuestro caso, un alto grado de dispersión (18.000 rpm/5 min) alcanza un CC% del 56,4% para una concentración de AET del 3% v/v, comparado con un bajo grado de dispersión (10.000 rpm/ 5 min), donde la %CC fue del 50,8%. Sin embargo, esto sólo es significativo (valor $p = 0,00001$) cuando la concentración de aceite es 3% v/v en la formulación.

3.4 Caracterización de la microestructura (Estudios de microscopia)

3.4.1 Microscopía de fluorescencia (MF)

Con el fin de observar la eficacia de la encapsulación y la distribución de AET en microesferas se realizó un análisis de imagen por microscopía de fluorescencia (MF). Las microesferas de las imágenes MF se muestran en la figura 3-7. La aplicación de oxazona (colorante fluoróforo liposoluble) al AET facilitó la observación de los cúmulos de AET tanto en microesferas húmedas como secas. Las microesferas húmedas mostraron una forma esférica y una distribución homogénea del AET. Esto se debe principalmente a las condiciones por las que se forma la gota durante la extrusión en la jeringa y a la rápida

gelificación con iones de calcio durante el proceso de polimerización del alginato con iones calcio, que ayudan a mantener la forma esférica de la cápsula. Fue posible ver pequeñas gotas de AET heterogéneamente distribuidas en las microesferas, con ciertas regiones mostrando una mayor concentración.

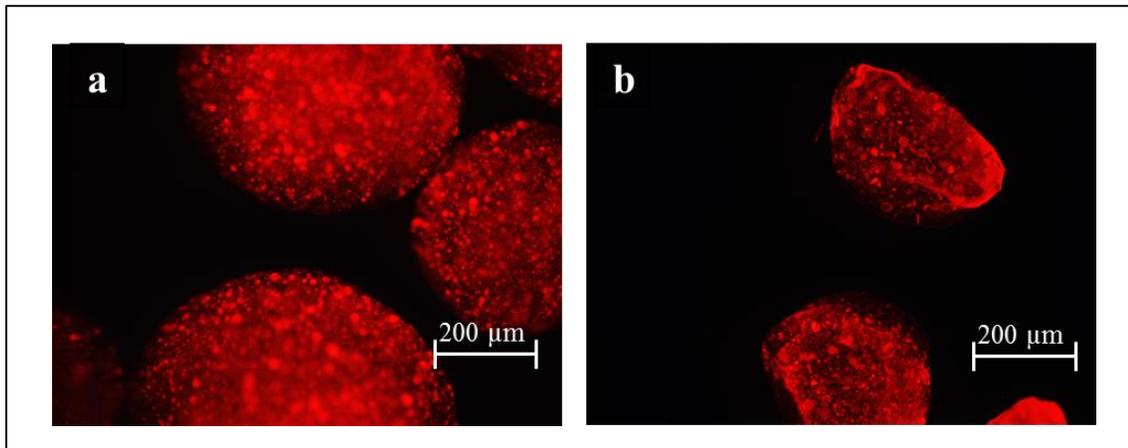


Figura 3-7: Microscopia de fluorescencia de microesferas desarrolladas por gelificación iónica. Concentración de AET 2% v/v. a: microesferas húmedas, b: microesferas secas.

3.4.2 Microtomografía de rayos X

Con el fin de observar la distribución del AET en la microesfera sin fracturarlos, se realizó un análisis de imagen mediante la microtomografía de rayos X. Los resultados se muestran en la figura 3-8. La figura 3-8a muestra una microesfera sin AET, es decir, compuesta únicamente de alginato de calcio. En esta imagen se evidencia una uniformidad total dentro de la microesfera, debido a que no hay presencia de aceite, ni otros componentes que puedan causar fluctuaciones de densidad en el interior de la microesfera. Las Figuras 3-8b, 3-8c y 3-8d muestran la presencia de AET dentro de la estructura, en forma de pequeñas gotitas sobre la matriz polimérica. Estas gotitas están uniformemente distribuidas a lo largo de la microesfera. No se observaron diferencias visuales para los tres diferentes grados de dispersión. Esto se puede explicar por la pérdida significativa de volumen, durante el proceso de secado de las microesferas, lo que da como resultado que las gotitas de AET queden más juntas en la matriz polimérica (Benavides et al., 2016; Soliman et al., 2013). También se observó la formación de una pared alrededor de la microesfera, esta estructura responde a la reticulación entre alginato y calcio, durante el proceso de gelificación iónica (Benavides et

al., 2012; Qin Wang, Liu, Wang, Zhu, & Yang, 2015). El calcio interactúa con la emulsión de alginato-AET a nivel superficial (Liu, et al., 2004) formando las microesferas, y posteriormente migra al interior de la microesfera. (Noppakundilokrat et al., 2015). Es posible que el proceso de gelificación iónica permita generar un gradiente de concentración de calcio desde la superficie (concentración más alta) hasta el interior (concentración más baja). Durante el secado la capa rica en calcio sobre la superficie aumenta su densidad por eliminación de agua, permitiendo el desarrollo de una cubierta que protege el contenido de las microesferas (Style & Peppin, 2005). Esto también se puede ver en las fotografías SEM (figura 3-9).

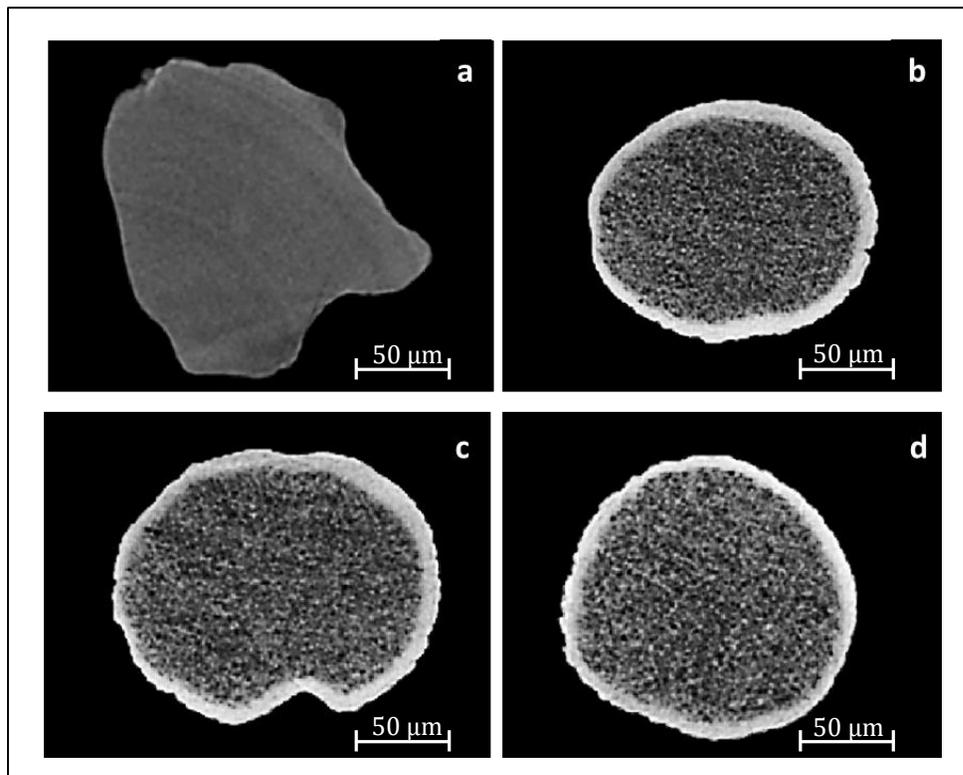


Figura 3-8: Imagen de Microtomografía computarizada de rayos X. Efecto de la incorporación de AET en la microestructura interna de microesferas secas a: microesferas de alginato de calcio (control, sin AET añadido), b: microesferas obtenidas a 10.000 rpm durante 5 minutos (2% v/v AET), c: microesferas obtenidas a 14.000 rpm durante 5 minutos (2% v/v AET), d: microesferas obtenidas a 18.000 rpm durante 5 minutos (2% v/v AET).

3.4.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las imágenes SEM de las microesferas se muestran en la figura 3-9. La figura 3-9a muestra la aglomeración de microesferas producida por el proceso de secado. Este fenómeno se debe a la proximidad entre las microesferas y la humedad en la superficie. Esta humedad superficial contiene iones de calcio, que entran y salen de la red de alginato, por un efecto de flujo dinámico. Además, la cercanía entre las microesferas favorece un flujo superficial continuo entre el alginato y los iones de calcio, generando una reacción de reticulación entre las microesferas. Por lo tanto, durante el secado, se forman puntos de contacto entre las microesferas, lo que finalmente da lugar a una alta aglomeración (Cook et al., 2012). Sin embargo, la conexión entre las microesferas es extremadamente débil, por lo que una agitación mecánica suave puede separarlas fácilmente. El fenómeno de aglomeración también fue observado por Leimann et al., (2009) en microcápsulas con alcohol polivinílico reticulado con glutaraldehído.

Otro aspecto a destacar es la pérdida de esfericidad de las microesferas. En la figura 3-9a se puede ver que las microesferas mantienen una forma de domo. Es muy probable que este fenómeno sea causado durante el secado, al estar apoyadas las microesferas en bandejas planas. La Figura 3-9b muestra la superficie de una microesfera. Se puede observar una estructura porosa irregular en toda la superficie de la cápsula. El tamaño de los poros es bastante heterogéneo, de 500 a 100 nm. Esta heterogeneidad en el tamaño de poro se debe a varios factores relacionados tanto con la formación de cápsulas (gelificación iónica) como con el proceso de secado. Durante la gelificación iónica, los grupos de ácido gulurónico presentes en las cadenas de alginato interactúan e intersectan con el ion calcio. En este proceso las cadenas de alginato se están reorganizando constantemente, este fenómeno es más intenso a nivel superficial donde se encuentra la concentración de calcio más alta. Entre cadenas paralelas se forman espacios que se encuentran libres de ácido gulurónico, en donde no hay conjugación con calcio, generándose microcanales que forman los poros en la superficie de la microesfera (Qin Wang et al., 2015). Durante el subsiguiente proceso de secado, la microesfera pierde turgencia por eliminación de agua, variando el tamaño de poro e incluso formando un aumento de la variabilidad dentro de los poros. Liu et al. (2004)

informaron que estos poros son muy pequeños en microesferas con gelificación iónica externa, pero muy variables, lo que se evidencia en nuestros resultados.

La Figura 3-9c muestra en detalle la formación de una cubierta superficial en la microesfera. Esta capa tiene un espesor entre 15 y 20 μm , bajo el cual se puede apreciar una estructura esponjiforme. El mecanismo de formación de esta capa exterior depende del grado de reticulación alcanzado con el calcio durante el proceso de gelificación iónica. La gelificación con iones calcio se lleva a cabo en la superficie de la gota de emulsión (alginato-AET), dando como resultado una capa superficial más densa, como una cáscara, donde se encuentra la mayor cantidad de calcio (Yu et al., 2011). Durante el proceso de secado, hay una migración de agua desde el interior de la microesfera hasta la superficie. A continuación, el agua se evapora rápidamente junto con parte del AET que se encuentra a nivel superficial. Por lo tanto, la presencia predominante de calcio en la superficie junto con la evaporación del agua durante el secado, terminan con la formación de este tipo de estructura de envoltura semejante a una "corteza de secado".

La figura 3-9d muestra la estructura interna de una microesfera, presentando una estructura esponjiforme donde el AET se encuentra ocluido. Esto también se evidencia en las fotografías de microscopía de fluorescencia que confirman la presencia de AET dentro de la microestructura de la microesfera. Las celdas de la microestructura interna tenían diámetros heterogéneos que oscilaban entre 1 y 10 μm .

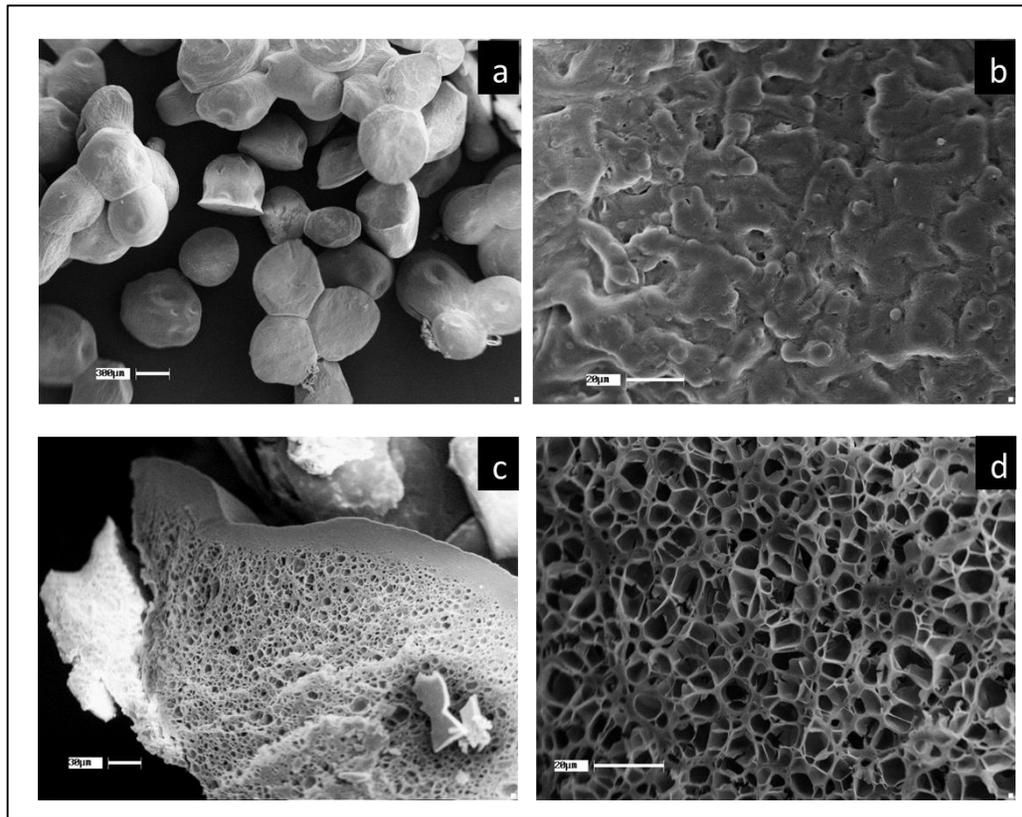


Figura 3-9: Fotografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) de microesferas secas. Obtenidas por gelificación iónica con AET al 2% v/v, disperso a 18.000 rpm por 5 minutos: a: Forma y estado de agregación, b: Superficie de la microesfera, c: Sección transversal de una microesfera, d: Estructura interna de una microesfera.

3.5. Actividad antibacteriana de las microesferas

Se evaluó si el proceso de encapsulación altera la actividad antimicrobiana del AET. Para ello se midió la actividad antimicrobiana del AET encapsulado, sobre bacterias grampositivas y gramnegativas. La actividad antibacteriana se evaluó midiendo los halos de inhibición en condiciones *in vitro*; Los resultados se resumen en la Tabla 3-1.

Tabla 3-1: Actividad antibacteriana de microesferas de alginato cargadas con AET

Rpm	AET (%v/v)	Halos de inhibición (mm)			
		<i>St. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>E. coli</i>
500*	0	10,0±0,00 ^{Aa}	10.0 ±0.00 ^{Aa}	10.0 ±0.00 ^{Aa}	10.0 ±0.00 ^{Aa}
	1	10.2 ± 0.06 ^{Ba}	10.1 ± 0.06 ^{Ba}	10.4 ± 0.06 ^{Bac}	12.0 ± 1.52 ^{Bab}
	2	12.1 ± 1.52 ^{Cb}	12.2 ± 0.57 ^{Cac}	12.3 ± 1.52 ^{Cabc}	11.1 ± 0.57 ^{Ba}
10.000	3	12.0 ± 0.57 ^{Cb}	15.2 ± 1.00 ^{Dbde}	13.0 ± 0.57 ^{Cbd}	13.0 ± 0.57 ^{Cbc}
	1	12.3 ± 0.57 ^{Cb}	11.1 ± 0.57 ^{Ba}	11.1 ± 0.57 ^{Bc}	13.3 ± 0.57 ^{Cbc}
	2	12.2 ± 1.00 ^{Cb}	15.0 ± 0.57 ^{Dbde}	14.1 ± 1.00 ^{Dd}	12.1 ± 1.52 ^{Bab}
14.000	3	13.1 ± 2.31 ^{Dbc}	15.3 ± 0.57 ^{Dbde}	14.3 ± 1.52 ^{Dd}	14.2 ± 0.57 ^{Dc}
	1	11.2 ± 0.57 ^{Bab}	13.1 ± 0.57 ^{Ecd}	11.2 ± 0.57 ^{Bc}	13.0 ± 1.00 ^{Cb}
	2	15.1 ± 1.15 ^{Ecd}	14.0 ± 0.57 ^{DEd}	10.0 ± 1.00 ^{Bc}	12.1 ± 0.57 ^{Bab}
18.000	3	16.0 ± 0.57 ^{Ed}	16.2 ± 0.57 ^{Fe}	14.0 ± 2.00 ^{Dd}	14.2 ± 0.57 ^{Dc}

Letras mayúsculas diferentes señalan diferencias significativas en la misma columna, letras minúsculas diferentes señalan diferencias significativas en la misma línea.

*Control negativo, microesferas de alginato de calcio, sin AET

La actividad antibacteriana del AET encapsulado fue significativamente mayor, respecto al control (sin AET) a partir de una concentración del 3% v/v sobre todas las cepas bacterianas. La actividad antibacteriana del AET liberado desde las microesferas fue significativamente mayor sobre bacterias grampositivas (*St. aureus* y *L. monocytogenes*) que sobre bacterias gramnegativas (*E. coli* y *S. enteritidis*). El efecto antibacteriano más intenso que se observó en las bacterias grampositivas, se debe a que este tipo de bacterias poseen una pared celular menos compleja que las bacterias gramnegativas (Benavides et al., 2012). Esta característica hace de las bacterias grampositivas microorganismos más permeables y vulnerables al efecto de los componentes del aceite esencial.

Wattanasatcha y Wanichwecharungruang (2012), obtuvieron resultados similares, tras evaluar el efecto antimicrobiano de nanoesferas cargadas con timol. Estas nanoesferas mostraron un efecto, significativamente más intenso, sobre *Staphylococcus aureus* (bacteria grampositiva), que sobre *Escherichia coli* (bacteria gramnegativa).

La capacidad antimicrobiana del AET, se manifiesta una vez que migra desde la microesfera, hacia el medio en el que se encuentra. Este fenómeno depende del grado de hinchamiento de la microesfera (Freiberg & Zhu, 2004; Y. Liu, Zhang, Zhang, & Zheng, 2015) por incorporación de agua y la afinidad del AET al medio. Según lo observado, el proceso de hinchamiento de las microesferas es comparativamente lento respecto al crecimiento microbiano. Además, no hay afinidad entre el medio de agar y AET, lo que también dificulta su migración. Sin embargo, el objetivo de las microesferas es liberar AET durante el proceso digestivo en peces. En estas condiciones, las microesferas se ven afectadas por fluctuaciones de pH, peristaltismo y otros factores metabólicos (Augustin et al., 2011), que favorecen el hinchamiento de las microesferas y la liberación de AET, mejorando su efecto antimicrobiano.

3.6 Caracterización del hinchamiento de las microesferas.

La microesfera de alginato de calcio, es una matriz polimérica de baja solubilidad. Sin embargo, esta matriz tiene la propiedad de hincharse en medios acuosos (Lević et al., 2015). Este fenómeno es de importancia pues gatilla la liberación del aceite esencial. Durante el hinchamiento, se generan microcanales dentro de las microesferas que permiten la liberación del aceite esencial al medio (Y. Liu et al., 2015). En consecuencia el grado de hinchamiento es un mecanismo principal que influye en la liberación del AET. En esta investigación se evaluó el fenómeno de hinchamiento en las microesferas, bajo condiciones gastrointestinales simuladas. En la Figura 3-10 se puede observar el comportamiento del hinchamiento de las microesferas en condiciones de pH estomacales simuladas (2,9) y pH intestinales simuladas (8,1).

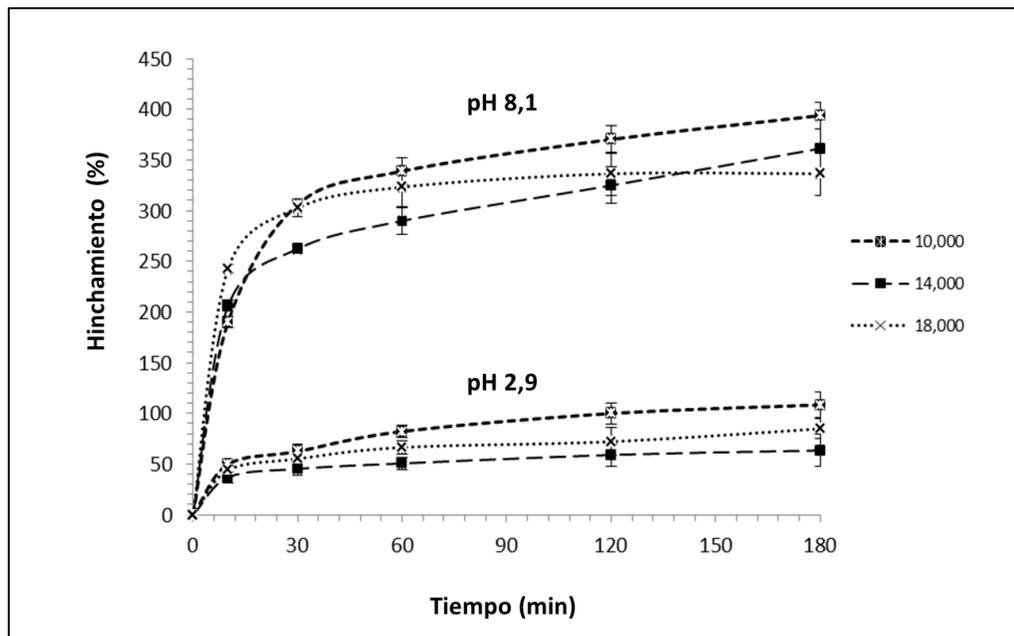


Figura 3-10: Efecto del pH digestivo, y del grado de dispersión del AET en las microsferas, sobre el hinchamiento. Las microsferas se obtuvieron a diferentes grados de dispersión (10.000, 14.000 y 18.000 rpm/ 5 min.) y un contenido del 2% v/v de AET. Los puntos representan el promedio de 3 ensayos y 2 repeticiones, las barras de error indican *SD* (valor $p = 0.0008$).

Las microsferas bajo condiciones gástricas simuladas (pH 2,9) mostraron un %Sw significativamente menor que las microsferas bajo condiciones intestinales simuladas (pH 8,1) (valor $p = 0,0008$). Las microsferas expuestas a pH 2,9 aumentaron rápidamente su peso por absorción de agua. Sin embargo, el peso de las microsferas después de 3 horas no excedió de 50 a 100% (Figura 3-10) de su peso original. Esto ocurre dado a que iones monovalentes (Na^+) presentes en el medio, interactúan de manera dinámica con las cadenas de alginato, generándose un intercambio Na^+ con Ca^{2+} . Este intercambio genera un proceso de desestructuración entre las cadenas de alginato y el calcio, que se sustituye por Na^+ , lo que presupone un mayor grado de hinchamiento. Sin embargo, este fenómeno es amortiguado por la presencia de H^+ en un medio fuertemente ácido, como el pH del estómago. Los grupos carboxílicos de alginato son protonados, lo que reduce la repulsión electrostática entre las cadenas de alginato. Esto sumado a la generación de puentes hidrógeno, estabilizan la matriz de la microsfera (Dima et al., 2014). Consecuentemente se produce un incremento de la insolubilidad de las microsferas, limitando su absorción de

agua. En cuanto al grado de dispersión de AET, se detectaron diferencias significativas con respecto al %Sw en condiciones gástricas simuladas (pH: 2,9). Las microesferas con un grado de dispersión bajo (10.000 rpm/5 min) tuvieron un %Sw significativamente mayor, en comparación con las microesferas con grados de dispersión medios y altos (14.000 y 18.000 rpm/5 min respectivamente). Es posible que un grado de dispersión menor deje más espacio entre las gotas de fase dispersa (AET). Estos espacios permiten la incorporación de una mayor cantidad de agua. Por otro lado, un mayor grado de dispersión del AET, deja menos espacios disponibles para la incorporación de agua, además de generar un frente hidrófobo, dada la mayor relación área/superficie que mantienen las gotas de aceite como fase dispersa.

Las microesferas sometidas a condiciones intestinales simuladas (pH 8,1), mostraron un %Sw significativamente mayor que en condiciones gástricas (pH 2,9). Las microesferas tuvieron un aumento del 350% en peso húmedo en promedio (figura 3-10). Un medio alcalino (intestino) promueve el intercambio iónico entre Ca^{2+} y Na^+ , lo que resulta en la hinchazón y la erosión progresiva de la microesfera (Silva et al., 2011). En consecuencia, la absorción de agua se incrementa favoreciendo el hinchamiento de la cápsula. Sin embargo, a diferencia de los que ocurre en el estómago y ciegos pilóricos (pH 2,9), en el intestino predomina un pH levemente alcalino. En estas condiciones, los grupos carboxilo del alginato (ácidos gularónicos) son totalmente ionizados (Dima et al., 2016), generando una repulsión electrostática entre ellos (Lević et al., 2015). Este fenómeno favorece la incorporación de agua en la estructura interna de las microesferas, resultando en un mayor grado de hinchamiento.

En cuanto al efecto del grado de dispersión del AET sobre el %Sw, en condiciones intestinales simuladas, se detectaron diferencias significativas (valor $p = 0,002$). Las microesferas con alto grado de dispersión tuvieron un %Sw significativamente menor. En promedio el incremento del hinchamiento (%Sw) fue de un 320% en peso, alcanzando este porcentaje al cabo de una hora. Para el caso de grados de dispersión medio y bajo (14.000 y 10.000 rpm/5 min) el incremento del hinchamiento fue de 340% y 380% respectivamente, después de 3 horas.

En términos generales la presencia de AET, puede limitar la incorporación de medio acuoso a la microesfera. Esta limitación podría ser producida por una barrera física formada por el AET (componente hidrófobo), que limita la difusión de agua en la microesfera. Además, el componente hidrófobo puede limitar los intercambios de iones entre Na^+ y Ca^{2+} , que también influyen en el %Sw final (Lević et al., 2015). Estos resultados sugieren que no sólo la presencia de AET afecta el %Sw, sino que también el grado de dispersión de este.

En otras palabras, un mayor grado de dispersión crea una fase hidrofóbica (AET) con mayor contacto superficial, limitando la entrada de agua y iones. Por el contrario, una fase hidrófoba, con un bajo grado de dispersión, tiene una superficie de contacto reducida, dejando espacios que facilitan la incorporación de agua y iones Na^+ . Todos estos factores no solo intervienen en el Sw%, sino que también en la liberación posterior del AET.

Los resultados obtenidos en este estudio son consistentes con los obtenidos por Dima et al., (2016), quienes demostraron que las microcápsulas de alginato tenían un grado de hinchamiento inferior al 30% en un medio de pH 2,5 y 200% a pH 6,5. Nizam El-Din, Abd Alla, & El-Naggar, (2010) también mostraron que las microesferas compuestas sólo de alginato, generaron un mayor hinchamiento en condiciones de pH neutro o alcalino, y un menor hinchamiento a pH ácido.

Los resultados obtenidos permiten indicar que, en el %Sw de las microesferas convergen dos fenómenos: el primero por la incorporación del medio acuoso en la microesfera, el segundo por la desintegración progresiva de la microesfera debido a la alteración de la matriz de alginato de calcio. En este último caso la disrupción de la matriz es desencadenada por el intercambio iónico entre Ca^{2+} (microesferas de alginato cálcico) y Na^+ (medio simulado gastrointestinal), además del pH (gástrico o intestinal) presente en el ambiente fisiológico simulado (Allan-wojtas, Hansen, & Paulson, 2008; Cook et al., 2012).

3.7 Medición de la tasa de liberación del AET (*in vitro*).

La tasa liberación de AET de las microesferas se evaluó bajo condiciones digestivas simuladas. Las propiedades físicas y mecánicas de las microesferas de alginato dependen del grado de gelificación entre las cadenas de alginato y los iones calcio (Lee et al., 2000). Estas interacciones generan una estructura superficial de las microesferas altamente porosa (figura 3-8c). La formación de estos poros facilitan el hinchamiento y posterior liberación del agente bioactivo (AET).

La Figura 3-11 muestra las tasas de liberación del AET desde las microesferas en condiciones gástricas e intestinales simuladas. La liberación en condiciones gástricas fue inferior al 20% del AET contenido en la microesfera. Esta baja liberación se correlaciona con el bajo grado de hinchamiento observado durante la digestión ácida.

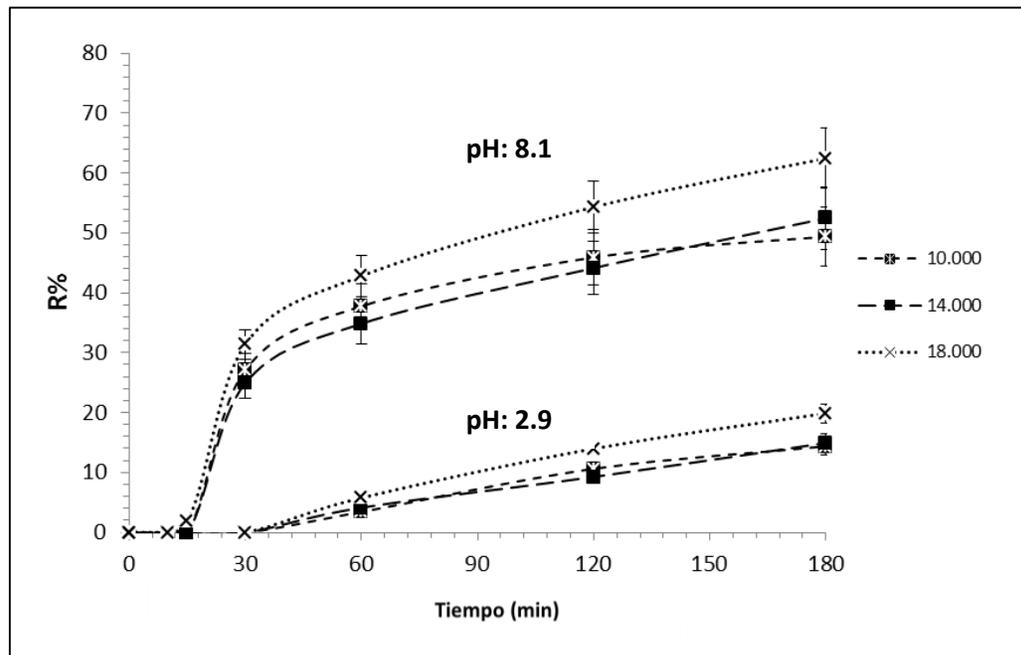


Figura 3-11: Efecto del pH digestivo, y del grado de dispersión del AET en las microesferas, sobre la velocidad de liberación. Las microesferas se obtuvieron a diferentes grados de dispersión (10.000, 14.000 y 18.000 rpm/ 5 min.) y un contenido del 2% v/v de AET. Los puntos representan el promedio de 3 ensayos y 2 repeticiones, las barras de error indican *SD* (valor $p = 0.0006$).

La tasa de liberación del AET, en condiciones intestinales mostró un incremento significativo del AET liberado. En estas condiciones se libera hasta un 55% del AET contenido en las microesferas después de 3 horas. La liberación de AET en estas condiciones, mostró dos etapas: una liberación intensa inicial, cuya duración es de 35 minutos aproximadamente, y donde llega a liberarse el 32% del AET encapsulado. Posteriormente se desarrolla una segunda etapa de liberación más lenta, cuya duración resultó ser de 145 min, y donde llega a liberarse un 16% del AET encapsulado inicialmente. La liberación inicial (más intensa) puede ser una consecuencia de dos factores. En primer lugar, la progresión de la hinchazón que aumentó gradualmente el contenido de agua en la microesfera; y segundo, la distancia entre las gotas de AET dentro de la cápsula y cerca de la superficie de la microesfera al comienzo de la liberación (Hosseini et al., 2013). Ambos factores favorecieron la liberación rápida e intensa de AET desde las microesferas. Liu et al. (2004), demostraron que este fenómeno es intenso en la primera media hora de contacto con condiciones intestinales simuladas, ya que la progresión de la hinchazón permite la formación de poros y canales que facilitan la migración del AE al medio acuoso.

Por otra parte, la segunda etapa comienza cuando la microesfera alcanza su máximo hinchamiento (hidratación completa de la microesfera), y las gotitas de AET comienzan a fluir desde el interior de la esfera a la superficie, esto ocurre entre los primeros 15 a 30 minutos en que la microesfera toma contacto con el medio acuoso. Esta distancia es mayor, ya que las gotitas están cerca del centro de la microesfera, por lo que la liberación es más lenta pero más sostenida (Abdekhodaie, Cheng, & Wu, 2015). Es muy probable que en esta etapa los fenómenos de difusión comiencen a dominar el proceso de liberación (Sadaka et al., 2013).

Resultados similares a los de este estudio fueron encontrados por Dima et al., (2016) quienes determinaron que el grado de hinchamiento afecta de manera directa la velocidad de liberación de aceite esencial de cilantro. Estos resultados muestran que la encapsulación del AET, en microesferas de alginato de calcio, limitan su liberación a nivel estomacal dadas las

condiciones de pH ácido predominantes. Sin embargo la microesfera favorece la liberación del AET a pH intestinal, lo que favorece su bioaccesibilidad. Resultados similares fueron obtenidos por Q. Wang et al. (2009), aunque investigaron mayores concentraciones de alginato y calcio.

El grado de dispersión de AET fue directamente proporcional a la cantidad de AET liberada desde la microesfera. Nuestro estudio demostró que, un grado de dispersión alto (18.000 rpm/5 min), liberó una cantidad significativamente mayor de AET (valor de $p = 0,006$), en comparación a un grado de dispersión bajo (10.000 rpm/ 5 min) (figura 3-11). En el primer caso, un 63% del AET se liberó desde la microesfera, mientras que en el segundo caso sólo se alcanzó una liberación del 42%. Resultados similares fueron encontrados por Hsieh et al., (2006), quienes estudiaron microcápsulas de quitosano cargadas con aceite esencial de citronela con un rango de dispersión de aceite esencial entre 400-1.500 rpm y también encontraron una relación directamente proporcional entre el grado de dispersión y una mayor tasa de liberación porcentual (20% y 38% respectivamente a los 200 min). Esta relación entre el grado de dispersión y la tasa de liberación del AET, puede deberse a que la mayor dispersión en la que las gotitas de aceite tienen una relación superficie/volumen más alta que facilita la difusión a través de la matriz de las microesferas. Mientras que las gotitas de aceite más grandes (menos dispersión) que tienen una relación superficie/volumen más baja, lo que dificulta la migración de las estructuras internas de la microesfera (Hsieh et al., 2006).

3.8 Actividad antifúngica del AET post-digestión sobre *Saprolegnia sp.*

La actividad antifúngica del AET encapsulado se evaluó frente al hongo *Saprolegnia sp.* La selección de esta cepa se debe a que es un hongo oportunista que afecta la piscicultura, produciendo graves pérdidas (Zaror et al., 2004). Previamente se ha demostrado la eficacia del AET puro sin encapsular como agente de control sobre *Saprolegnia sp.* (Perez Correa et al., 2014), en nuestro caso se determinó que una concentración de 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ fue la CMF (concentración mínima fungicida) para *Saprolegnia sp.* (Datos no mostrados). No se contaban con datos sobre su actividad antifúngica sobre *Saprolegnia sp.* tras la encapsulación. La actividad antimicrobiana después de condiciones digestivas simuladas se muestra en la Tabla 3-2.

Tabla 3-2: Capacidad antifúngica de microesferas cargadas con AET, post-digestión sobre *Saprolegnia sp.*

Grado de Dispersion	Microesferas (g/mL)	Halo de crecimiento (mm) <i>Saprolegnia sp.</i>
Control (-)*	0,100	85.0 ± 0.00 ^a
10,000 rpm (bajo)	0.100	25.3 ± 2.4 ^c
	0.050	53,4 ± 4.7 ^d
	0.010	78,5 ± 3.5 ^e
	0.005	83.5 ± 1.4 ^{af}
14,000 rpm (medio)	0.100	24.0 ± 2.42 ^c
	0.050	52,5 ± 3.25 ^d
	0.010	77,2 ± 2.61 ^e
	0.005	82.7 ± 2.10 ^{fk}
18,000 rpm (alto)	0.100	22.5 ± 1.36 ^g
	0.050	46,5 ± 2.13 ^h
	0.010	73,5 ± 2.51 ⁱ
	0.005	81.1 ± 1.20 ^k

* Control, microesferas sin AET

Letras diferentes significan diferencias significativas entre los datos.

Nuestros resultados muestran que el AET liberado, tras el proceso digestivo simulado, tiene una actividad antifúngica eficaz, como puede observarse por su efecto sobre el crecimiento radial del hongo. La concentración mínima de microesferas necesaria para inhibir el hongo de manera significativa fue de 0,05 g/mL, lo que equivale a una concentración de AET de 0,0175 g/mL.

Como se esperaba, el grado de dispersión tuvo también un efecto significativo. Un mayor grado de dispersión (18.000 rpm/5 min) tuvo un mayor efecto antifúngico un 13,3% mayor en comparación con las microesferas con un grado de dispersión más bajo (10.000 rpm/5 min), para una concentración de 0,1 g/mL. Estos resultados son consistentes con las tasas de liberación establecidas anteriormente en la sección 3.7.

Los resultados obtenidos muestran que la microesfera, protege la bioactividad del AET de las condiciones ácidas del estómago (pH 2,9). Por otro lado la cantidad de AET liberado, al

cabo de 3 horas del proceso digestivo, permiten controlar el crecimiento de *Saprolegnia sp.* en condiciones *in vitro*.

4 CONCLUSIONES

Esta investigación permitió disponer de información relevante sobre el efecto del grado de dispersión del AET, sobre la tasa de carga y eficiencia de encapsulación de las microesferas del alginato de calcio obtenidas.

Fue posible establecer una relación directamente proporcional entre el grado de dispersión del AET y la tasa de carga, así como la eficiencia de encapsulación de las microesferas, concretamente un mayor grado de dispersión (18.000 rpm/5 min) incrementó la eficiencia de encapsulación en un 21%, y la capacidad de carga en un 36%, respecto a un grado de dispersión bajo (10.000 rpm/5 min). Esto se debe a que un mayor grado de dispersión, permite una mayor relación área/superficie total de las gotas de fase dispersa (AET) en la emulsión. El manejo de esta variable permite potenciar la capacidad de la microesfera, así como la eficiencia de encapsulación, aprovechando de mejor manera el agente bioactivo (AET).

Paralelamente la tasa de liberación del AET desde la microesfera, también se ve afectado en parte por el grado de dispersión, esto es porque, indirectamente un mayor grado de dispersión, genera una mayor superficie hidrófoba dentro de la microesfera, lo que limitó el grado de hinchamiento y en consecuencia la liberación del AET. Sin embargo el mayor efecto sobre el grado de hinchamiento fue el generado por el pH de la digestión simulada, el que resultó ser inversamente proporcional, un pH estomacal ácido (2,9) limitó el hinchamiento, y en consecuencia la tasa de liberación fue menor. Lo contrario ocurrió a pH intestinal (8,1), en donde el hinchamiento fue mayor y también la tasa de liberación. En concreto las microesferas protegen el AET durante la digestión estomacal, pero permiten la liberación de este a nivel intestinal mejorando su biodisponibilidad para su absorción y manteniendo su bioactividad para combatir al hongo *Saprolegnia sp.* por lo que se presenta como una alternativa viable para la prevención y/o control de la infección por vía digestiva.

5 REFERENCIAS

- Abdekhodaie, M. J., Cheng, J., & Wu, X. Y. (2015). Effect of formulation factors on the bioactivity of glucose oxidase encapsulated chitosan – alginate microspheres : In vitro investigation and mathematical model prediction, *125*, 4–12.
<https://doi.org/10.1016/j.ces.2014.11.010>
- Acar, Ü., Kesbiç, O. S., Yılmaz, S., Gültepe, N., & Türker, A. (2015). Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*. *Aquaculture*, *437*, 282–286.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.015>
- Adzitey, F., & Huda, N. (2010). *Listeria monocytogenes* in foods : Incidences and possible control measures. *African Journal of Microbiology Research*, *4*(December), 2848–2855.
- Aillet, Ä. P. C., Te, S., Aucier, L. I. S., & Acroix, M. O. L. (2004). Antimicrobial and Antioxidant Effects of Milk Protein-Based Film Containing Essential Oils for the Preservation of Whole Beef Muscle, *7*, 5598–5605.
- Allan-wojtas, P., Hansen, L. T., & Paulson, A. T. (2008). Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation \$, *41*, 101–108.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.02.003>
- Andersson Trojer, M., Nordstierna, L., Bergek, J., Blanck, H., Holmberg, K., & Nydén, M. (2014). Use of microcapsules as controlled release devices for coatings. *Advances in Colloid and Interface Science*, *222*, 1–26. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.06.003>
- Aniesrani, D. S., Thagavel, K., Natarajan, N., Kasthuri, R., & Kailappan, R. (2015). Microencapsulation of Turmeric Oleoresin by Spray Drying and In Vitro Release Studies of Microcapsules Drying and in vitro Release Studies of Microcapsules. *Journal of Food Process Engineering*, *38*(August 2014), 37–48.
<https://doi.org/10.1111/jfpe.12124>
- Baimark, Y., & Srisuwan, Y. (2014). Preparation of alginate microspheres by water-in-oil emulsion method for drug delivery: Effect of Ca²⁺ post-cross-linking. *Advanced Powder Technology*, *25*(5), 1541–1546. <https://doi.org/10.1016/j.appt.2014.05.001>
- Bakkali, F., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review, *46*, 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Banerjee, S., Chattopadhyay, P., Ghosh, A., Goyary, D., Karmakar, S., & Veer, V. (2013). Influence of process variables on essential oil microcapsule properties by carbohydrate polymer-protein blends. *Carbohydrate Polymers*, *93*(2), 691–7.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.028>

- Beirão, S., Duarte, C., Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C., Teresa, A., Moldão, M., ... Luísa, M. (2012). Effect of the matrix system in the delivery and in vitro bioactivity of microencapsulated Oregano essential oil, *110*, 190–199. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.05.043>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.104>
- Benavides, S., Villalobos-Carvajal, R., & Reyes, J. E. (2012). Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. *Journal of Food Engineering*, *110*(2), 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.05.023>
- Benbrook, C. M. (2002). Antibiotic Drug Use in U . S . Aquaculture, (February).
- Beyki, M., Zhavah, S., Khalili, S. T., Rahmani-Cherati, T., Abollahi, A., Bayat, M., ... Mohsenifar, A. (2014). Encapsulation of Mentha piperita essential oils in chitosan–cinnamic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *Industrial Crops and Products*, *54*, 310–319. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.033>
- Biom, L., Umr, C., & Roberval, L. (2009). Measurement of mechanical properties of alginate beads using ultrasound Abstract : Mots clefs : *19` Eme Congres Francais de Mecanique*, 1–6.
- Blaskovic, M., Rosenkrantz, W., Neuber, a, Sauter-Louis, C., & Mueller, R. S. (2014). The effect of a spot-on formulation containing polyunsaturated fatty acids and essential oils on dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, *199*(1), 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.10.024>
- Bnyan, I. A., Abid, A. T., & Obied, H. N. (2014). Antibacterial Activity of Carvacrol against Different Types of Bacteria. *Journal of Natural Sciences Research*, *4*(9), 13–17.
- Boskabady, M. H., Tabatabaee, A., & Jalali, S. (2014a). Potential effect of the extract of *Zataria multiflora* and its constituent, carvacrol, on lung pathology, total and differential WBC, IgE and eosinophil peroxidase levels in sensitized guinea pigs. *Journal of Functional Foods*, *11*, 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.08.021>
- Boskabady, M. H., Tabatabaee, A., & Jalali, S. (2014b). Potential effect of the extract of *Zataria multiflora* and its constituent, carvacrol, on lung pathology, total and differential WBC, IgE and eosinophil peroxidase levels in sensitized guinea pigs. *Journal of Functional Foods*, *11*(C), 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.08.021>
- Botre, D. A., Fatima, N. De, Soares, F., Judith, P., Espitia, P., Sousa, S. De, ... Renhe, T. (2010). Avaliação de filme incorporado com óleo essencial de orégano para

conservação de pizza pronta. *Ceres Viçosa*, 57, 283–291.

- Bouyer, E., Mekhloufi, G., Rosilio, V., Grossiord, J.-L., & Agnely, F. (2012). Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? *International Journal of Pharmaceutics*, 436(1–2), 359–378. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.052>
- Bravo, S., Dölz, H., Silva, M. T., Lagos, C., Millanao, A., & Urbina, M. (2005). Diagnóstico del uso de fármacos y otros productos químicos en la acuicultura. *Proyecto FIP 2003-28*, 24–38.
- C Mabile, C., Leal-Calderon, Gorria, Ph., L., Bibette, J., Faye, V., Deminiere, B. & S. (2000). Rheological and Shearing Conditions for the Preparation of Monodisperse Emulsions. *Langmuir*, 422–429.
- Chan, E.-S. (2011). Preparation of Ca-alginate beads containing high oil content: Influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties. *Carbohydrate Polymers*, 84(4), 1267–1275. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.01.015>
- Chan, L. W., Lee, H. Y., & Heng, P. W. S. (2006). Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. *Carbohydrate Polymers*, 63(2), 176–187. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.07.033>
- Chen, K., Chen, M., & Lin, C. (2006). Optimal combination of the encapsulating materials for probiotic microcapsules and its experimental verification (R1), 76, 313–320. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.05.036>
- Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, 162(1), 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.06.003>
- Dantas, B. P. V., Alves, Q. L., de Assis, K. S., Ribeiro, T. P., de Almeida, M. M., de Vasconcelos, A. P., ... Silva, D. F. (2015). Participation of the TRP channel in the cardiovascular effects induced by carvacrol in normotensive rat. *Vascular Pharmacology*, 67–69, 48–58. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.02.016>
- Das, S. K., Murmu, K., Das, A., Shakuntala, I., Das, R. K., Ngachan, S. V., & Majhi, S. K. (2012). Studies on the identification and control of pathogen Saprolegnia in selected Indian major carp fingerlings at mid hill altitude. *Journal of Environmental Biology*, 33(3), 545–549.
- de Oliveira, E. F., Paula, H. C. B., & Paula, R. C. M. de. (2014). Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 113, 146–151. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.08.038>
- Dima, C., Cotarlet, M., Alexe, P., & Dima, S. (2014). Reprint of “Microencapsulation of

essential oil of pimento [Pimenta dioica (L) Merr.] by chitosan/k-carrageenan complex coacervation method.” *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 25(C), 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.07.008>

Dima, C., Cotârlet, M., Alexe, P., & Dima, S. (2014). Microencapsulation of essential oil of pimento [Pimenta dioica (L) Merr.] by chitosan/k-carrageenan complex coacervation method. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 22, 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.12.020>

Dima, C., Pătrașcu, L., Cantaragiu, A., Alexe, P., & Dima, Ș. (2016). The kinetics of the swelling process and the release mechanisms of Coriandrum sativum L. essential oil from chitosan/alginate/inulin microcapsules. *Food Chemistry*, 195, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.044>

Dong, Z., Ma, Y., Hayat, K., Jia, C., Xia, S., & Zhang, X. (2011). Morphology and release profile of microcapsules encapsulating peppermint oil by complex coacervation. *Journal of Food Engineering*, 104(3), 455–460. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.01.011>

Drusch, S., & Berg, S. (2008). Extractable oil in microcapsules prepared by spray-drying: Localisation, determination and impact on oxidative stability. *Food Chemistry*, 109(1), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.016>

Du, W., Avena-bustillos, R. J., Hua, S. S. T., & Mchugh, T. H. (2011). Antimicrobial volatile essential oils in edible films for food safety, 1124–1134.

Edris, A. E. (2007). Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents : A Review, (October 2006). <https://doi.org/10.1002/ptr>

Emiroğlu, Z. K., Yemiş, G. P., Coşkun, B. K., & Candoğan, K. (2010). Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Science*, 86(2), 283–8. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.04.016>

Erokhina, S., Konovalov, O., Bianchini, P., Diaspro, A., Ruggiero, C., Erokhin, V., & Pastorino, L. (2013). Release kinetics of gold nanoparticles from collagen microcapsules by total reflection X-ray fluorescence. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 417, 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.11.012>

Espitia, P. J. P., Avena-Bustillos, R. J., Du, W.-X., Chiou, B.-S., Williams, T. G., Wood, D., ... Soares, N. F. F. (2014). Physical and Antibacterial Properties of Açai Edible Films Formulated with Thyme Essential Oil and Apple Skin Polyphenols. *Journal of Food Science*, 79(5), M903–M910. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12432>

FAO. (2016). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la

seguridad alimentaria y la nutrición para todos. *Organización de Las Naciones Unidas Para La Alimentación Y La Agricultura*, 224.

- Fortt, A., & Buschmann, A. (2007). Uso y abuso de Antibióticos en la Salmonicultura, 1–14. *Oceana*. www.oceana.org. enero 2007.
- Freiberg, S., & Zhu, X. X. (2004). Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, 282(1–2), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.04.013>
- García, A., Hernandez, J., & Pardo, S. (2008). Descripción Morfológica del Tubo Digestivo de Juveniles de Rubio *Salminus affinis* (Pisces: Characidae) Alimentary tract of juvenile Rubio *Salminus affinis* (Pisces : Characidae) morphological description. *Acta Biologia Colombia*, 13(3), 99–112.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients : An overview. *Food Research International*, 40, 1107–1121. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>
- Giannenas, I., Triantafillou, E., Stavrakakis, S., Margaroni, M., Mavridis, S., Steiner, T., & Karagouni, E. (2012). Assessment of dietary supplementation with carvacrol or thymol containing feed additives on performance, intestinal microbiota and antioxidant status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 350–353, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.027>
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation. *Trends in Food Science & Technology*, 15(7–8), 330–347. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.10.005>
- Hernandez, D. R., Perez Gianneselli, M., & Domitrovic, H. A. (2009). Morphology , Histology and Histochemistry of the Digestive System of South American Catfish (*Rhamdia quelen*). *Introduction Journal Morphology*, 27(1), 105–111.
- Hosseini, S. M., Hosseini, H., Mohammadifar, M. A., Mortazavian, A. M., Mohammadi, A., Khosravi-Darani, K., ... Khaksar, R. (2013). Incorporation of essential oil in alginate microparticles by multiple emulsion/ionic gelation process. *International Journal of Biological Macromolecules*, 62, 582–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.09.054>
- Hsieh, W.-C., Chang, C.-P., & Gao, Y.-L. (2006). Controlled release properties of Chitosan encapsulated volatile Citronella Oil microcapsules by thermal treatments. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 53(2), 209–14. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.09.008>
- Jang, I. S., Ko, Y. H., Kang, S. Y., & Lee, C. Y. (2007). Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*, 134(3–4), 304–315. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.06.009>

- Krogdahl, Å., Sundby, A., & Holm, H. (2015). Characteristics of digestive processes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Enzyme pH optima , chyme pH , and enzyme activities. *Aquaculture*, 449, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.02.032>
- Lafferty, K. D., Harvell, C. D., Conrad, J. M., Friedman, C. S., Kent, M. L., Kuris, A. M., ... Saksida, S. M. (2015). Infectious Diseases Affect Marine Fisheries and Aquaculture Economics. *The Annual Review of Marine Science*, 7(September 2014), 1–26. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010814-015646>
- Lee, K. Y., Rowley, J. A., Eiselt, P., Moy, E. M., Bouhadir, K. H., & Mooney, D. J. (2000). Controlling Mechanical and Swelling Properties of Alginate Hydrogels Independently by Cross-Linker Type and Cross-Linking Density.
- Leimann, F. V, Gonçalves, O. H., Machado, R. A. F., & Bolzan, A. (2009). Antimicrobial activity of microencapsulated lemongrass essential oil and the effect of experimental parameters on microcapsules size and morphology. *Materials Science & Engineering C*, 29(2), 430–436. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.08.025>
- Lertsutthiwong, P., Noomun, K., Jongaroonngamsang, N., Rojsitthisak, P., & Nimmannit, U. (2008). Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil. *Carbohydrate Polymers*, 74(2), 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.02.009>
- Lević, S., Pajić Lijaković, I., Dorević, V., Rac, V., Rakić, V., Šolević Knudsen, T., ... Nedović, V. (2015). Characterization of sodium alginate/d-limonene emulsions and respective calcium alginate/d-limonene beads produced by electrostatic extrusion. *Food Hydrocolloids*, 45, 111–123. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.10.001>
- Liolios, C. C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., & Chinou, I. (2009). Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 112(1), 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.060>
- Liu, X., Xue, W., Liu, Q., Yu, W., Fu, Y., Xiong, X., ... Yuan, Q. (2004). Swelling behaviour of alginate-chitosan microcapsules prepared by external gelation or internal gelation technology. *Carbohydrate Polymers*, 56(4), 459–464. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.03.011>
- Liu, Y., Zhang, H., Zhang, J., & Zheng, Y. (2015). Constitutive modeling for polymer hydrogels: A new perspective and applications to anisotropic hydrogels in free swelling. *European Journal of Mechanics - A/Solids*, 54, 171–186. <https://doi.org/10.1016/j.euromechsol.2015.07.001>
- López, O. (2010). Microencapsulación de sustancias oleosas mediante secado por aspersión Microencapsulation of oily substances by aspersion drying. *Revista Cubana de Farmacia*, 44(3), 381–389.

- Mabille, C., Leal-Calderon, F., Bibette, J., & Schmitt, V. (2003). Monodisperse fragmentation in emulsions: Mechanisms and kinetics. *Europhysics Letters*.
- Maldonado, D. (2012). "Evaluación del perfil de disolución del mecanismo de liberación de florfenicol en dos tipos de alimentos medicados usados en salmonicultura." Universidad Austral de Chile.
- Matalanis, A., Jones, O. G., & McClements, D. J. (2011). Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1865–1880. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.04.014>
- McClements, D. J. (2015). Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 219, 27–53. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.02.002>
- Mohammadi, A., Hashemi, M., & Hosseini, S. M. (2015). Chitosan nanoparticles loaded with Cinnamomum zeylanicum essential oil enhance the shelf life of cucumber during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 110, 203–213. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.08.019>
- Morken, T., Javier, F., Márquez, L., Sørensen, M., Torunn, L., & Øverland, M. (2012). Effects of autoclaving and sodium diformate supplementation to diets on amino acid composition, in vivo digestibility in mink (Neovison vison) and in vitro bioavailability using digestive enzymes from Atlantic salmon (Salmo salar). *Animal Feed Science and Technology*, 178(1–2), 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.09.010>
- Myers, P., Espinosa, C. S., Parr, T., Jones, G. S., Hammond, & Dewey, T. A. (2017). The Animal Diversity Web (online). Accessed at http://animaldiversity.org./digestive_system/.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451–1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>
- Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni, F., & Coppola, R. (2012). Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 182–6. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.10.001>
- Neubauer, M. P., Poehlmann, M., & Fery, A. (2014). Microcapsule mechanics: From stability to function. *Advances in Colloid and Interface Science*, 207(1), 65–80. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.11.016>
- Nizam El-Din, H. M., Abd Alla, S. G., & El-Naggar, A. W. M. (2010). Swelling and drug release properties of acrylamide/carboxymethyl cellulose networks formed by gamma irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 79(6), 725–730.

<https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2010.01.011>

- Nobile, M. A. Del, Conte, A., Incoronato, A. L., & Panza, O. (2008). Antimicrobial efficacy and release kinetics of thymol from zein films, 89, 57–63.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.04.004>
- Nolivos, S., & Vásquez, M. (2012). VALORACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN DE CARVACROL Y TIMOL PRESENTES EN EL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Origanum vulgare*) SOBRE LA DIGESTIBILIDAD DE LA DIETA EN PERROS ADULTOS. Trabajo. *Universidad Central Del Ecuador Facultad De Medicina Veterinaria Y Zootecnia Carrera De Medicina Veterinaria Y Zootecnia Valoración*.
- Noppakundiligrat, S., Piboon, P., Graisuwan, W., Nuisin, R., & Kiatkamjornwong, S. (2015). Encapsulated eucalyptus oil in ionically cross-linked alginate microcapsules and its controlled release. *Carbohydrate Polymers*, 131, 23–33.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.054>
- Nostro, A., Scaffaro, R., Botta, L., Filocamo, A., Marino, A., Bisignano, G., ... Bisignano, G. (2015). Effect of temperature on the release of carvacrol and cinnamaldehyde incorporated into polymeric systems to control growth and biofilms of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Biofouling*, 31(8), 639–649.
<https://doi.org/10.1080/08927014.2015.1079703>
- ODEPA. (2013). *SECTOR PESQUERO y ACUÍCOLA*. (O. D. E. Y. P. AGRARIAS, Ed.), *Sector pesquero y acuícola; panorama 2013*. Santiago.
- Oussalah, M., Saucier, L., & Lacroix, M. (2006). ARTICLE IN PRESS MEAT Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.11.019>
- Özyildiz, F., Karagönlü, S., Basal, G., Uzel, A., & Bayraktar, O. (2012). Micro-encapsulation of ozonated red pepper seed oil with antimicrobial activity and application to nonwoven fabric. *Letters in Applied Microbiology*, 56(3), 168–179.
- Paques, J. P., Sagis, L. M. C., van Rijn, C. J. M., & van der Linden, E. (2014). Nanospheres of alginate prepared through w/o emulsification and internal gelation with nanoparticles of CaCO₃. *Food Hydrocolloids*, 40, 182–188.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.02.024>
- Paques, J. P., van der Linden, E., van Rijn, C. J. M., & Sagis, L. M. C. (2014). Preparation methods of alginate nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 209, 163–71. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.03.009>
- Pasin, B. L., Azón, C. G., & Garriga, A. M. (2012). Revisión Microencapsulación con alginato en alimentos . Técnicas y aplicaciones Microencapsulation in alginate for food . *Technologies and applications*, 3(1), 130–151.

- Penagos, G., & Barato, P. (2008). SISTEMA INMUNE Y VACUNACIÓN DE PECES
Immune System And Vaccination In Fish. *Acta Biologica Colombiana*, 13(3), 3–26.
- Perez Correa, J. R., Agosin Trumper, E. E., & Rojas Hube, A. (2014). Composición
alimenticia para peces que comprende un agente antifungico que corresponde a aceite
esencial de tomillo; uso de dicha composición para tratar Saprolegnia en peces. Chile.
- Rattanachaikunsopon, P., & Phumkhachorn, P. (2010). Potential of cinnamon
(*Cinnamomum verum*) oil to control *Streptococcus iniae* infection in tilapia
(*Oreochromis niloticus*). *Fisheries Science*, 76(2), 287–293.
<https://doi.org/10.1007/s12562-010-0218-6>
- Ren, P.-W., Ju, X.-J., Xie, R., & Chu, L.-Y. (2010). Monodisperse alginate microcapsules
with oil core generated from a microfluidic device. *Journal of Colloid and Interface
Science*, 343(1), 392–5. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.11.007>
- Ribeiro, a J., Neufeld, R. J., Arnaud, P., & Chaumeil, J. C. (1999). Microencapsulation of
lipophilic drugs in chitosan-coated alginate microspheres. *International Journal of
Pharmaceutics*, 187(1), 115–23.
- Rinaudo, M. (2014). Biomaterials based on a natural polysaccharide: alginate. *Tip*, 17(1),
92–96. [https://doi.org/10.1016/S1405-888X\(14\)70322-5](https://doi.org/10.1016/S1405-888X(14)70322-5)
- Sackett, C. K., & Narasimhan, B. (2011). Mathematical modeling of polymer erosion:
consequences for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 418(1),
104–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.11.048>
- Sadaka, F., Nguimjeu, C., Brachais, C.-H., Vroman, I., Tighzert, L., & Couvercelle, J.-P.
(2013). Review on antimicrobial packaging containing essential oils and their active
biomolecules. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.01.004>
- Saéz, V., Hernández, E., Sanz, L., & Katime, I. (2004). Liberación controlada de fármacos.
micropartículas. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 5(2), 87–101.
- Saravanan, M., & Rao, K. P. (2010). Pectin–gelatin and alginate–gelatin complex
coacervation for controlled drug delivery: Influence of anionic polysaccharides and
drugs being encapsulated on physicochemical properties of microcapsules.
Carbohydrate Polymers, 80(3), 808–816.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.12.036>
- Selzer, D., Abdel-Mottaleb, M. M. a, Hahn, T., Schaefer, U. F., & Neumann, D. (2013).
Finite and infinite dosing: Difficulties in measurements, evaluations and predictions.
Advanced Drug Delivery Reviews, 65(2), 278–94.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.06.010>
- Seydim, A. C., & Sarikus, G. (2006). Antimicrobial activity of whey protein based edible

films incorporated with oregano , rosemary and garlic essential oils, 39, 639–644.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.01.013>

- Siegel, R. A., & Rathbone, M. J. (2012). Overview of Controlled Release Mechanisms. In R. A. Siegel (Ed.), *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery* (pp. 19–44). Minneapolis. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0881-9>
- Silva, M. D. S., Cocenza, D. S., Grillo, R., de Melo, N. F. S., Tonello, P. S., de Oliveira, L. C., ... Fraceto, L. F. (2011). Paraquat-loaded alginate/chitosan nanoparticles: preparation, characterization and soil sorption studies. *Journal of Hazardous Materials*, 190(1–3), 366–74. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.03.057>
- Soliman, E. A., El-moghazy, A. Y., El-din, M. S. M., & Massoud, M. A. (2013). Microencapsulation of Essential Oils within Alginate : Formulation and in Vitro Evaluation of Antifungal Activity, 2013(March), 48–55.
- Style, B. R. W., & Peppin, S. S. L. (2005). Crust formation in drying colloidal suspensions. *Oxford Centre for Collaborative Applied Mathematics, University of Oxford, Mathematical Institute.*, (2002), 24–29.
- Sudova, E., Machova, J., Svobodova, Z., & Vesely, T. (2007). Negative effects of malachite green and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish : a review. *Veterinarni Medicina*, 52(12), 527–539.
- Sundby, A., & Holm, H. (2015). Characteristics of digestive processes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Enzyme pH optima , chyme pH , and enzyme activities. *Aquaculture*, (April 2016), article in press. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.02.032>
- Thoen, E., Evensen, O., & Skaar, I. (2011). Pathogenicity of *Saprolegnia* spp. to Atlantic salmon, *Salmo salar* L., eggs. *Journal of Fish Diseases*, 34(8), 601–8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01273.x>
- Torres, J. (2011). Tratamientos profilácticos anti-saprolegniasis para mejorar la sobrevivencia embrionaria en ovas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). *Zootecnia Trop.*, 29(2), 235–239.
- Tran, V.-T., Benoît, J.-P., & Venier-Julienne, M.-C. (2011). Why and how to prepare biodegradable, monodispersed, polymeric microparticles in the field of pharmacy? *International Journal of Pharmaceutics*, 407(1–2), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.01.027>
- Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. (2002). The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiology*, 68(4), 1561–1568. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1561>
- Varona, S., Rodríguez, S., Martín, Á., José, M., Teresa, A., Crespo, T., & Duarte, C. M. M.

- (2013). Antimicrobial activity of lavandin essential oil formulations against three pathogenic food-borne bacteria. *Industrial Crops & Products*, 42, 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.020>
- Varona, S., Rodríguez Rojo, S., Martín, Á., Cocero, M. J., Serra, A. T., Crespo, T., & Duarte, C. M. M. (2013). Antimicrobial activity of lavandin essential oil formulations against three pathogenic food-borne bacteria. *Industrial Crops and Products*, 42, 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.020>
- Velasco, J. W., Villafior, G. V, Flores, J. E., & Bisonard, E. (2014). Operación y Simulación de un Secador Spray para la Producción de Pentaborato de Sodio. *Información Tecnológica*, 25(5), 89–94. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642014000500013>
- Vicini, S., Castellano, M., Mauri, M., & Marsano, E. (2015). Gelling process for sodium alginate : New technical approach by using calcium rich micro-spheres. *Carbohydrate Polymers*, 134, 767–774. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.064>
- Wan, L. Q., Jiang, J., Arnold, D. E., Guo, X. E., Lu, H. H., & Mow, V. C. (2008). Calcium Concentration Effects on the Mechanical and Biochemical Properties of Chondrocyte-Alginate Constructs. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 1(1), 93–102. <https://doi.org/10.1007/s12195-008-0014-x>
- Wang, Q., Gong, J., Huang, X., Yu, H., & Xue, F. (2009). In vitro evaluation of the activity of microencapsulated carvacrol against Escherichia coli with K88 pili. *Journal of Applied Microbiology*, 107(6), 1781–1788. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04374.x>
- Wang, Q., Liu, S., Wang, H., Zhu, J., & Yang, Y. (2015). Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects Alginate droplets pre-crosslinked in microchannels to prepare monodispersed spherical microgels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 482, 371–377. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.06.041>
- Yan, X., Guang, X., Wu, Z., Jin, H., & Cha, D. (2011). Preparation of alginate / chitosan / carboxymethyl chitosan complex microcapsules and application in Lactobacillus casei ATCC 393. *Carbohydrate Polymers*, 83(4), 1479–1485. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.09.053>
- Yeh, K.-W., Chang, C. P., Yamamoto, T., & Dobashi, T. (2011). Release model of alginate microcapsules containing volatile tea-tree oil. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 380(1–3), 152–155. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.02.043>
- Yu, W., Song, H., Zheng, G., Liu, X., Zhang, Y., & Ma, X. (2011). Study on membrane characteristics of alginate–chitosan microcapsule with cell growth. *Journal of*

Membrane Science, 377(1–2), 214–220.
<https://doi.org/10.1016/j.memsci.2011.04.053>

Zaror, L., Collado, L., Bohle, H., Landskron, E., & Healt, A. (2004). Saprolegnia parasitica en salmones y truchas del sur de Chile Saprolegnia parasitica in salmon and trout from southern Chile, 71–78.

Zhang, K., Zhang, H., Hu, X., Bao, S., & Huang, H. (2012). Synthesis and release studies of microalgal oil-containing microcapsules prepared by complex coacervation. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 89, 61–6.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.08.023>

Zheng, Z. L., Tan, J. Y. W., & Liu, H. Y. (2009). Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L .) on growth , antioxidant effect and resistance against *aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 292(3–4), 214–218.