

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA**

DISEÑO DE MICROCÁPSULAS DE PECTINA PROTEGIDAS CON GOMA LACA- ALGINATO DE SODIO CON SENSIBILIDAD DE DEGRADACIÓN AL pH INTESTINAL DE RUMIANTES

GUADALUPE TORIZ CERÓN

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2018

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Guadalupe Toriz Cerón, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dr. J. Efrén Ramírez Bribiesca, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Diseño de microcápsulas de pectina protegidas con goma laca- alginato de sodio on sensibilidad de degradación al pH intestinal de rumiantes

y de los producto de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre el colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 23 de abril de 2018

Guadalupe Toriz Cerón

Firma del
Alumno (a)

Dr. J. Efrén Ramírez Bribiesca

Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

Se presenta la tesis titulada "DISEÑO DE MICROCÁPSULAS DE PECTINA PROTEGIDAS CON GOMA LACA- ALGINATO DE SODIO CON SENSIBILIDAD DE DEGRADACIÓN AL pH INTESTINAL DE RUMIANTES." realizada por la alumna Guadalupe Toriz Cerón bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANDERÍA

CONSEJO PARTICULAR

Consejero



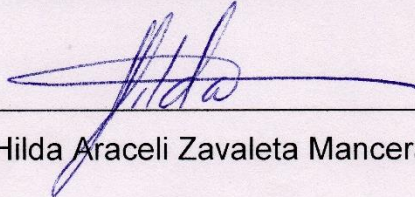
Dr. J. Efrén Ramírez Bribiesca

Asesor



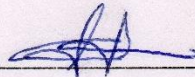
Dra. Leonor Miranda Jiménez

Asesor



Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera

Asesor



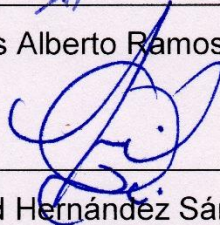
Dra. Rosy Gabriela Cruz Monterrosa

Asesor



Dr. Jesús Alberto Ramos Juárez

Asesor



Dr. David Hernández Sánchez

DISEÑO DE MICROCÁPSULAS DE PECTINA PROTEGIDAS CON GOMA LACA-ALGINATO DE SODIO CON SENSIBILIDAD DE DEGRADACION AL pH INTESTINAL DE RUMIANTES

Guadalupe Toriz Cerón, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2018

RESUMEN

La pectina es un polisacárido presente en alimentos, usada como agente gelificante, espesante y estabilizante. La estructura básica de la pectina es una cadena de ácido anhidro- D- galacturónico con uniones α 1,4 con grupos carboxilos (COOH) metilados que le permiten formar un gel viscoso, el cual se une con el β -caroteno y probablemente reduzca el color amarillo de la grasa de cobertura en la canal de bovino. El objetivo del presente estudio fue diseñar y caracterizar microcápsulas de pectina, con goma laca y alginato de sodio como encapsulantes. El estudio se planteó en dos fases, en la primera se diseñaron las microcápsulas de pectina y en la segunda se evaluaron las microcápsulas In vitro. Las microcápsulas fueron elaboradas por el método de extrusión, se utilizó un encapsulador BUCHI-390. La morfología de las microcápsulas se evaluó por microscopía electrónica de barrido. . En la liberación de ácido D- galacturónico, los tratamientos fueron: T1: Pectina + alginato + goma laca con aspersion de goma laca. T2: pectina + alginato + goma laca con baño de goma laca. T3: pectina + alginato con aspersion de goma laca. T4: pectina + alginato con baño de goma laca. T5: pectina sola. Las microcápsulas presentaron formas irregulares con variación de tamaño. Se evaluó el efecto del polímero (goma laca/ alginato) sobre la cantidad de pectina liberada en base a la concentración de ácido D- galacturónico. El T3 presentó mayor ($P < 0.05$) liberación de ácido D- galacturónico a pH =3 indicando una mejor disponibilidad de pectina a nivel intestinal. Por lo tanto el método de extrusión resulta una alternativa viable para elaborar microcápsulas de pectina.

Palabras clave: pectina, microcápsulas, goma laca, alginato de sodio.

DESIGN OF PECTIN MICROCAPSULES PROTECTED WITH RUBBER LACA-SODIUM ALGINATE WITH SENSITIVITY OF DEGRADATION TO THE INTESTINAL pH OF RUMINANTS

Guadalupe Toriz Cerón, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2018

ABSTRACT

Pectin is a polysaccharide present in food, used as a gelling agent, thickener and stabilizer. The basic structure of the pectin is an anhydro-D-galacturonic acid chain with α 1,4-bonds with methylated carboxyl groups (COOH). These methylated groups allow the pectin to form a viscous gel, which binds with β -carotene and probably reduces the yellow color of the covering fat in the bovine carcass. The objective of the present study was to design and characterize pectin microcapsules, with shellac and sodium alginate as encapsulants. The study was proposed in two phases, in the first the pectin microcapsules were designed and in the second phase the in vitro microcapsules were evaluated. The microcapsules were elaborated by the extrusion method, a BUCHI-390 encapsulator was used. The morphology of the microcapsules was evaluated by scanning electron microscopy. . In the release of D-galacturonic acid, the treatments were: T1: Pectin + alginate + shellac with shellac spray. T2: pectin + alginate + shellac with a shellac bath. T3: pectin + alginate with shellac spray. T4: pectin + alginate with shellac bath. T5: pectin alone. The microcapsules had irregular shapes with variation in size. The effect of the polymer (shellac / alginate) on the amount of pectin released based on the concentration of D-galacturonic acid was evaluated. The T3 showed higher (P <0.05) release of D-galacturonic acid at pH = 3 indicating a better availability of pectin at the intestinal level. Therefore, the extrusion method is a viable alternative for making pectin microcapsules.

Key words: pectin, microcapsules, shellac, sodium alginate.

AGRADECIMIENTOS

Al **Colegio de Postgraduados Campus Montecillo**, por formarme y darme las herramientas necesarias para alcanzar esta meta.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** y **Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT)** por el apoyo económico recibido.

A mi profesor consejero el **Dr. Efrén Ramírez Bribiesca** y a mis asesores, **Dra. Leonor Miranda Jiménez, Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera, Dra. Rosy Gabriela Cruz Monterrosa, Dr. Jesús Alberto Ramos Juárez, y Dr. David Hernández Sánchez** por su valiosa colaboración en la realización de esta investigación.

A la **Dra. María Magdalena Crosby Galván** y a la **Ing. Margarita Crosby Galván**, por sus conocimientos compartidos y apoyo en la realización de este proyecto de investigación.

Al **Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología (LINAN)** asociado a la División de Materiales Avanzados (DMAv) del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnología (**IPICYT**) por las observaciones realizadas en el Microscopio ESEM FEI-QUANTA 200.

A todos y cada uno de los **Profesores del Colegio de Postgraduados** con quienes me forme académicamente.

Al **Equipo Secretarial del Programa en Ganadería**, por su disposición y apoyo en trámites académicos y administrativos.

Finalmente agradezco **a todas esas personas** que aportaron en gran forma durante mi investigación.

DEDICATORIA

A **Dios** y a la **Virgen** por haberme dado la vida, pero sobre todo por haberme dado el regalo más hermoso de la vida, mi **familia** y mi **hija**.

A mis padres **María Isabel Cerón González** y **Carlos Toriz Monroy** por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que incluye este. Me formaron con reglas y con libertades, pero al final de cuentas, me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos, gracias por su amor incondicional.

A mis hermanos **Adriana Berenice Toriz Cerón** y **Carlos Ernesto Toriz Cerón** por estar siempre presentes aportando buenas cosas a mi vida, por los grandes lotes de felicidad, por brindarme su apoyo y estar siempre conmigo.

A mi sobrino **Hadriel Luna Toriz** que siempre está conmigo para alegrar mis días con sus ocurrencias, por todo su apoyo y cariño que son una gran bendición, que dan muestra de las buenas cosas que un sobrino tiene para ofrecer.

A mi hija **Alba Guadalupe Toriz Cerón** por ser mi pequeño amanecer y la motivación de seguir luchando y salir adelante, por enseñarme lo que es el verdadero amor, por todo tu afecto y cariño, por cada sonrisa que me das, gracias por ser el detonante de mi felicidad.

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
DEDICATORIA	vii
LISTA DE CUADROS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
1 INTRODUCCIÓN	1
2 REVISION DE LITERATURA	3
2.1 Pectina	3
2.1.1 Estructura de la pectina.....	3
2.1.2 Efecto de la pectina en animales domésticos y humanos	5
2.2 Microencapsulación.....	6
2.3 Técnicas de microencapsulación	11
2.3.1 Procesos químicos	11
2.3.1.1 Coacervación	11
2.3.1.2 Co- cristalización	12
2.3.1.3 Atrapamiento en liposomas.....	13
2.3.1.4 Inclusión molecular.....	14
2.3.2 Procesos mecánicos	15
2.3.2.1Secado por aspersion.....	15
2.3.2.2 Aspersion por enfriamiento o congelamiento	17
2.3.2.3 Extrusion	18
2.4 Materiales de encapsulacion.....	19
2.4.1 Alginato	20
2.4.2 Goma laca.....	24
2.5 Caracterizacion de microcapsulas.....	25

2.5.1 Tamaño de microcápsula	25
2.5.2 Morfología Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	26
2.5.3 Índice de polidispersibilidad.....	27
3 JUSTIFICACIÓN.....	28
4 HIPÓTESIS	29
5 OBJETIVOS.....	30
5.1 Objetivo general	30
5.2 Objetivos particulares.....	30
6 MATERIAL Y METODOS	31
6.1 Localización.....	31
6.2 Microcápsulas	31
6.2.1 Materiales.....	31
6.2.2 Obtención de microcápsulas de pectina.....	32
6.3 Caracterización de microcápsulas.....	36
6.3.1 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	36
7 DISOLUCIÓN DE MICROCÁPSULAS	38
7.1 Preparación de soluciones búfer	38
7.2 Prueba de disolución a diferente pH y eficiencia de encapsulación de la pectina	39
8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y DISEÑO EXPERIMENTAL	44
9 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
9.1 Microcápsulas de pectina	45
9.2 Estudios de liberación de pectina en función del pH	50
10 CONCLUSIONES	54
11 LITERATURA CITADA.....	55

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Aplicaciones de la encapsulación en diferentes áreas de ciencias veterinarias.....	7
Cuadro 2 Materiales de encapsulación.	19
Cuadro 3 Aplicación de alginato para la microencapsulación de probióticos agregados a alimentos.	23
Cuadro 4 Porcentaje de liberación de Pectina como ácido D-galacturónico en cuatro preparaciones de microcápsulas.	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura básica de las sustancias pécticas.	4
Figura 2. Diferentes estructuras de las microcápsulas.	10
Figura 3. Formación de microcápsulas por coacervación compleja.....	12
Figura 4. Atrapamiento en liposoma.	13
Figura 5. Inclusión molecular.....	14
Figura 6. Esquema del equipo de Spray- dryer.	16
Figura 7. Extrusión.....	18
Figura 8. Estructura química del alginato.	21
Figura 9. Modelo de caja de huevo, que describe la estructura del alginato.....	21
Figura 10. Estructura química de la goma laca.	24
Figura 11. Micrografía (MEB) de microcápsulas de pectina.....	45
Figura 12. Micrografía (MEB) de microcápsulas de pectina elaboradas con tratamiento uno: pectina+ alginato de sodio+ goma laca con aspersion de goma laca.	46
Figura 13. Micrografía (MEB) de microcápsulas de pectina elaboradas con el tratamiento dos: pectina+ alginato de sodio+ goma laca con baño de goma laca.	47
Figura 14. Micrografía (MEB) de microcápsulas d pectina elaboradas con el tratamiento tres: pectina+ alginato de sodio con aspersion de goma laca.....	48
Figura 15. Micrografía (MEB) de microcápsulas de pectina elaboradas con el tratamiento cuatro: pectina+ alginato de sodio con baño de goma laca.	49

1 INTRODUCCIÓN

La coloración amarilla en la grasa de cobertura de la canal de rumiantes, se ha convertido en una limitante en la producción de carne de bovino, provocando que la comercialización en el mercado disminuya. Esta coloración está definida por el consumo de pigmentos como los carotenoides presentes en la dieta (Cruz-Monterrosa *et al.*, 2015).

Los carotenoides son liberados del bolo alimenticio por medio de gotas lipídicas en el estómago o intestino, formándose así micelas debido a la acción de sales biliares y lipasas pancreáticas (Parker, 1996). Estas micelas se difunden por la mucosa duodenal a través de la membrana del enterocito, por difusión pasiva, similar al colesterol. Los quilomicrones son los responsables del transporte de los carotenoides desde la mucosa intestinal hacia el torrente sanguíneo vía sistema linfático (Mosquera y Hornero, 2005). La tasa de deposición de los carotenoides en órganos y tejidos depende de la absorción selectiva a través de la pared intestinal por una parte, y de su utilización y excreción por otra (Brenes, 2014).

El β -caroteno es uno de estos pigmentos, y debido a que no todo el β -caroteno ingerido y absorbido es transformado a vitamina A, el excedente puede circular en la sangre para depositarse en tejido adiposo y en el hígado, los cuales acumulan a éste (Barrón *et al.*, 2006).

La pectina ha tenido numerosos usos en medicina humana como reductor de colesterol y desintoxicante, tiene la capacidad de atrapar ciertos compuestos a nivel intestinal, reduciendo la absorción de algunos nutrientes (Cruz-Monterrosa *et al.*, 2015), formando

complejos helicoidales con lípidos, siendo la responsable de los efectos dietarios que favorecen la excreción fecal de grasas y sales biliares.

La Microencapsulación es una técnica mediante la cual sustancias activas son introducidas en una matriz para impedir su pérdida, con el fin de protegerlos del medio ambiente, y de interacciones con otros componentes presentes en el alimento, o bien para controlar su liberación (Fernández *et al.*, 2005). La encapsulación ha permitido solucionar algunos problemas presentes en la aplicación de ingredientes o aditivos alimentarios, como enmascarar sabores indeseados (Favaro *et al.*, 2010) utilizados en animales.

En la actualidad la microencapsulación es usada en el ámbito de nutrición animal, ya que se busca incorporar aditivos alimentarios en la dieta para que lleguen intactas a su sitio de liberación. El uso de polímeros sintéticos ha garantizado que estos aditivos lleguen intactos; sin embargo, una desventaja para el uso de estos polímeros es su elevado costo (Fernández *et al.*, 2005).

Debido a lo anterior, en el presente trabajo se plantea usar de goma laca y alginato de sodio como agente encapsulante, para proteger a la pectina de los microorganismos durante su paso por el rumen, y se libere a nivel de abomaso y duodeno por acción del pH ácido, donde llevará a cabo su función como antagonista de cromógenos para evitar la coloración amarilla en la grasa de cobertura de la canal de rumiantes.

2 REVISION DE LITERATURA

2.1 Pectina

La fibra dietaria es la parte estructural de las plantas que no puede ser digerida por el organismo ya que carece de las enzimas para tal fin. Se clasifica en fibra soluble (pectinas, gomas, mucílagos y algunas hemicelulosas) y fibra insoluble (celulosa, hemicelulosa y lignina); la fibra insoluble es la responsable de aumentar el bolo fecal y ayudar a regular los movimientos peristálticos del intestino, mientras que la fibra soluble influye sobre los niveles de lípidos plasmáticos y protege contra las enfermedades cardiovasculares (Theuwissen y Mensink, 2008). La pectina se encuentra en mayor porcentaje en las frutas cítricas (naranjas, limones, uvas), en guayaba, manzana y en vegetales de color verde. En frutas y verduras, las pectinas constituyen un factor determinante de la textura y firmeza, y por tanto de la calidad del producto (Badui y Valdés, 2010).

2.1.1 Estructura de la pectina

Es un polisacárido lineal que contiene de 300 a 1000 unidades de ácido D-galacturónico unidas por enlaces glicosídicos α 1-4 además contiene L-ramnosa, D-galactosa y L-arabinosa. En la pectina los residuos de ácido D-galacturónico pueden estar esterificados con grupos metilo; si esta esterificación es mayor del 50% se considera de alto metoxilo (Cruz-Monterrosa *et al.*, 2015; Fig. 1).

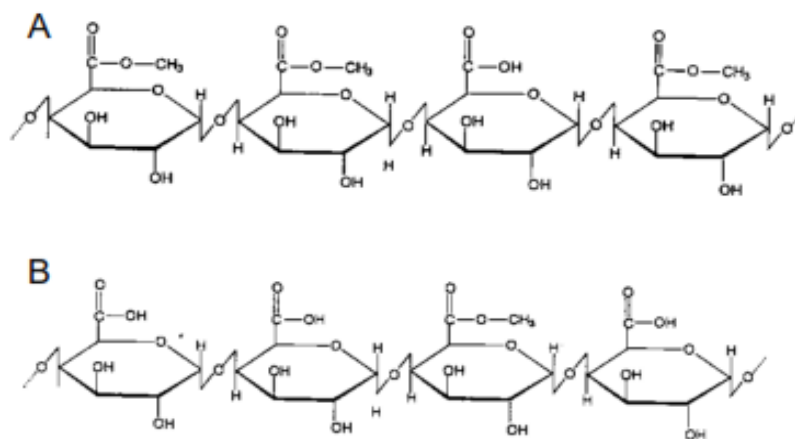
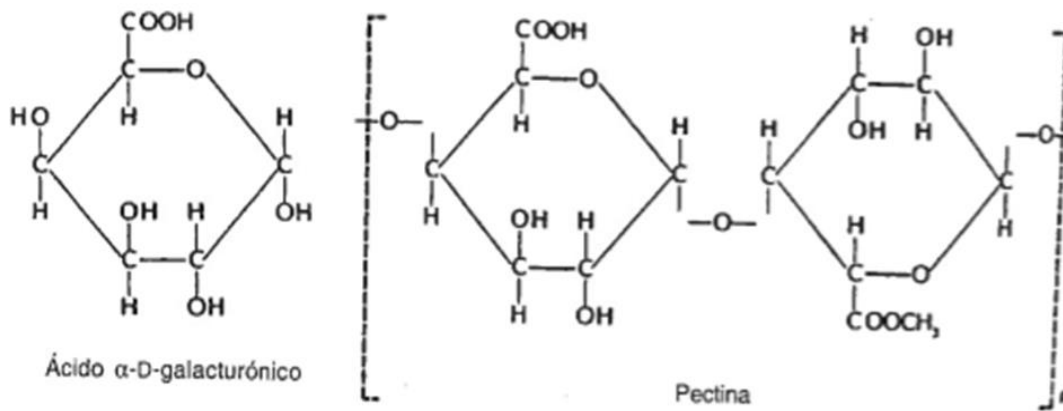


Figura 1. Estructura básica de las sustancias pécticas.

Pectina con a) bajo grado de metoxilo; b) alto grado de metoxilo

2.1.2 Efecto de la pectina en animales domésticos y humanos

Se ha demostrado que el alto consumo de fibra dietaria como pectina presenta beneficios para la salud, ya que posee propiedades anti-cancerígenas y contribuye a disminuir los niveles de colesterol en sangre. Se ha establecido que la interferencia de la fibra dietaria con la absorción del colesterol consumido en la dieta se debe a la formación de micelas en el lumen intestinal que encapsulan ácidos biliares y colesterol aumentando su excreción y disminuyendo su reabsorción; como resultado se incrementa la conversión hepática de colesterol en ácidos biliares, disminuyendo las reservas de colesterol hepático (Brown *et al.*, 1992). En estudios realizados en humanos donde se administró por vía oral la pectina en forma de gel por 21 días, se encontró una disminución de 5% de colesterol en suero y 13% en plasma, al igual que se observó una disminución de 44% de la excreción de grasa en heces y 33% de ácidos biliares, pero sin efecto en la concentración de triglicéridos.

Con respecto a su uso en nutrición de animales, algunas investigaciones realizadas en pollos y en animales de laboratorio reportan efectos de la pectina como antagonista sobre la absorción de los carotenoides (Erdman *et al.*, 1986). En ratas, la pectina aumenta la excreción fecal de lípidos, colesterol y ácidos biliares, y disminuye la concentración de colesterol sanguíneo (Tsai *et al.*, 1976). En animales canulados, captura al β -caroteno, por un atrapamiento físico en el gel de pectina de alto metoxilo formado. Paralelamente, se observó que la pectina redujo el contenido del colesterol en suero sanguíneo en los animales suplementados (Cruz-Monterrosa *et al.*, 2015).

2.2 Microencapsulación

La microencapsulación es un método empleado donde el ingrediente funcional o activo, puede ser un gas, líquido o sólido recubierto por un segundo material para así formar una microcápsula (Desai y Jin Park, 2005). Existen diferentes tipos de encapsulados: 1) Microcápsulas que presentan una definición marcada entre el núcleo y la pared, las cuales pueden ser simples (un núcleo) o compuestas (multinúcleos), o presentar monocubierta o multicubierta. 2) Microcápsulas donde el activo se encuentra disperso o solubilizado en el interior de una matriz, ambos tipos pueden presentar diferentes formas. 3) Liposomas utilizados en distintas áreas de ciencias veterinarias, los cuales se caracterizan por ser formaciones de micelares a partir de bicapas de fosfolípidos, los cuales, dependiendo del método utilizado para su preparación, pueden ser pequeños liposomas, grandes o compuestos por múltiples bicapas concéntricas. Los procesos de encapsulación fueron desarrollados entre 1930 y 1940, por la National Cash Register (NCR), los cuales encapsularon un tinte utilizando gelatina como agente encapsulante, mediante el proceso de coacervación (Fernández et al., 2005; Avila, 2011).

La encapsulación ha evolucionado bastante en las últimas décadas, teniendo diferentes aplicaciones en la industria alimenticia, ciencias biomédicas, ingeniería, cosmética, agricultura y en ciencias veterinarias. En el Cuadro 1 se enlistan las aplicaciones de la encapsulación en cuatro áreas de producción animal.

Cuadro 1. Aplicaciones de la encapsulación en diferentes áreas de ciencias veterinarias.

Aplicaciones en nutrición			
Autor (es)	Tipo de micropartícula	Material activo	Efecto
Bontempo <i>et al.</i> (2000)	Liposomas	α -tocoferol	Suplementación oral para cerdos
Wang <i>et al.</i> (2009)	Nanocompuestos	Cromo	Suplementación oral para cerdos
Wang <i>et al.</i> (2011)	Nanopartículas	Cobre	Suplementación oral para pollos broiler
Sacadura <i>et al.</i> (2008)	Micropartículas	Vitaminas (B)	Suplementación oral para bovinos de leche
Garrett <i>et al.</i> (2005a)	Micropartículas	B ₁ , C y K ₃	Elaboración de premix para raciones animales
Piepenbrink y Overton (2003), Hartweel <i>et al.</i> (2000)	Diferentes tipos de micropartículas	Colina	Suplementación oral para bovinos
Marchetti <i>et al.</i> (1995)	Micropartículas	Vitaminas E y C	Suplementación oral para bovinos
Marchetti <i>et al.</i> (1999)	Micropartículas	Vitaminas	Dietas de peces
Huntington <i>et al.</i> (2006), Xin <i>et al.</i> (2010), Taylor-Edwards <i>et al.</i> (2009)	Micropartículas y microcápsulas	Urea	Suplementación oral para bovinos
Mowat y Deelstra (1972), Mata <i>et al.</i> (1995), Wiese <i>et al.</i> (2003)	Microesferas y micropartículas	Metionina	Suplementación oral para corderos
Vandenberg <i>et al.</i> (2011)	micropartículas	Fitasa	Suplementación oral para trucha arcoíris
Collins <i>et al.</i> (2011)	Liposomas	Aceite de linaza	Suplementación oral para trucha arcoíris
Perfield <i>et al.</i> (2004)	Liposomas	Ácido linoleico conjugado	Suplementación oral para rumiantes
Soto <i>et al.</i> (2011)	Macrocápsulas	Probióticos	Suplementación oral para rumiantes
Yuan <i>et al.</i> (2013)	Liposomas	Hierro	Suplementación para roedores
Aplicaciones en medicina veterinaria			
Autor (es)	Tipo de micropartícula	Material activo	Efecto
Fattal <i>et al.</i> (1991)	Nanopartículas	Ampicilina	Disminuye infección en ratones por listeriosis y salmonelosis
Poirier <i>et al.</i> (2002)	Liposomas	Doxorrubicina	Tratamiento de sarcoma en gatos
Weiss <i>et al.</i> (1993)	Liposomas	Ribavirina	Tratamiento de peritonitis infecciosa felina
MacLeod and Prescott (1988)	Liposomas	Gentamicina	Tratamiento de mastitis en bovinos
Lynn <i>et al.</i> (2004)	Liposomas	Diclofenaco	Analgesia en bovinos
Boscan <i>et al.</i> (2010)	Microemulsión	Propofol	Anestesia en equinos
Klei <i>et al.</i> (1984)	Microemulsión	Ivermectina	Tratamiento de <i>Strongylus vulgaris</i> en equinos

Aplicaciones en vacunas			
Autor (es)	Tipo de micropartícula	Vía de administración	Enfermedad o agente/ especie
Greenwood <i>et al.</i> (2008)	Nanoperlas	Intradérmico	Fiebre aftosa/ ovinos
Vandammfe <i>et al.</i> (211)	Nanopartículas	Oral	Vacuna contra fimbrias de <i>E. coli</i> cerdos
Florindo <i>et al.</i> (2009)	Nanoesferas	Intranasal	Vacuna contra <i>Streptococcus equi</i> equinos
Cauchard <i>et al.</i> (2006)	Nanopartículas	IM	Vacuna contra <i>Rhodococcus equi</i> equinos
Hiszczynska <i>et al.</i> (2011)	Liposoma	IM	Vacuna contra <i>Toxoplasma gondii</i> equinos
Usui <i>et al.</i> (2003)	Liposoma	IM	Leucemia bovina/ ovina
Amorena <i>et al.</i> (1994)	Liposoma	IM	Mastitis estafilocócica/ ovinos
Zhang <i>et al.</i> (2010)	Nanoesferas	IM	Enfermedad de Newcastle ovinos
Yaguchi <i>et al.</i> (2009)	Liposoma	Intraocular	Colibacilosis aves de corral
Li <i>et al.</i> (2004)	Liposoma	Intraocular	Vacuna contra <i>Salmonella enteritidis</i> aves de corral
Barbour y Newman (1990)	Liposoma	Subcutánea	Vacuna contra <i>M. gallisepticum</i> gallinas de postura
Aplicaciones en reproducción			
Autor (es)	Tipo de micropartícula	Material activo	Uso
Ghidoni <i>et al.</i> (2008)	Micropartículas	Espermatozoides	Conservación de semen/ bovino y ovino
Weber <i>et al.</i> (2006)	Micropartículas	Espermatozoides	Aumento de fertilidad/hembras bovinas
Shah <i>et al.</i> (2010)	Micropartícula de alginato y Poli- L- lisina	Espermatozoides	Mantenimiento de viabilidad y motilidad roedores
Röpke <i>et al.</i> (2011)	Liposomas	Espermatozoides	Estabilidad espermática/bovinos
Kreeger <i>et al.</i> (2005)	Micropartículas	ovocitos	Mantenimiento y maduración ovocitaria roedores
Krentz <i>et al.</i> (1993)	Micropartículas	Embriones	Cultivo y obtención roedores

(Valenzuela *et al.* 2013)

El uso de la encapsulación representa una herramienta eficaz para mejorar la salud del animal y asegurar una adecuada calidad de los productos destinados al consumo humano. La encapsulación es una técnica utilizada en nutrición debido a que:

1. Protege el material núcleo de su degradación, oxidación o la degradación bacteriana durante su almacenamiento en alimentos.
2. Reduce la reacción con el medio ambiente durante el paso por el tubo gastrointestinal en animales no rumiantes y una especie de *bypass* ruminal en animales rumiante, elevando la biodisponibilidad de algunos activos.
3. Las características del activo pueden ser modificadas (líquido a sólido con la utilización de secado por aspersión) facilitando su incorporación en la dieta y suplementos, así como incrementar la aceptación, palatabilidad y consumo de alimentos concentrados para animales.
4. Se utiliza para controlar la liberación de una sustancia en un determinado sitio del tracto gastrointestinal (Betoret *et al.*, 2011; Nedovic *et al.*, 2011).

Dentro del término microencapsulación existen las microcápsulas, micropartículas y nanocápsulas (Islas, 2002). El término de microcápsula se refiere a partículas de tamaño de 1 μm hasta 5000 μm , mientras que en el término de nanocápsula encontramos partículas menores de 1 μm (Reyes, 2010).

Las microcápsulas se componen de un ingrediente o de la combinación de varios ingredientes como son: azúcares, gomas, proteínas, polisacáridos, lípidos o de polímero sintéticos, los cuales protegen el núcleo. Estas presentan diferentes estructuras (Fig. 2), como por ejemplo tenemos las que tienen forma esférica, otras de forma irregular, con multipared o diversos núcleos en una misma estructura o microcápsulas de tipo matricial (Islas 2002; Avila 2011).

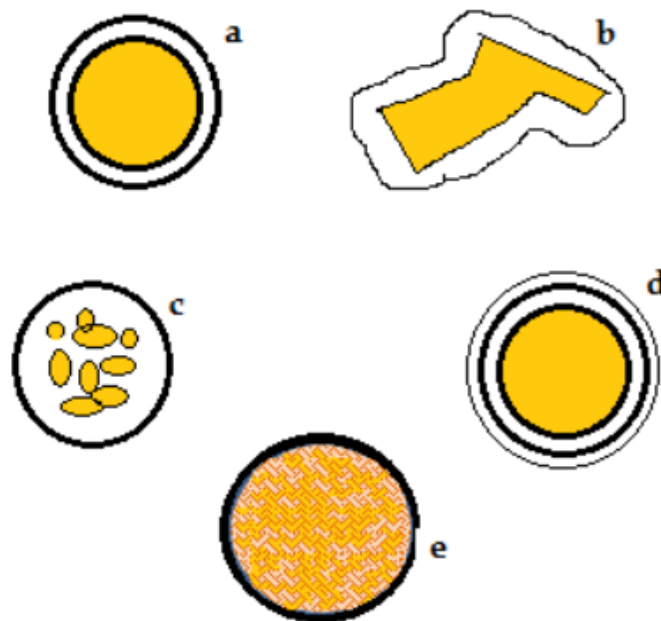


Figura 2. Diferentes estructuras de las microcápsulas.

a) forma esférica; b) forma irregular; c) forma multinúcleo; d) forma multipared y e) forma matricial (Avila, 2011).

Existen diversos métodos utilizados para la producción de microcápsulas, los cuales, pueden ser divididos en (Fernández *et al.*, 2005):

- Procesos físicos: secado por aspersion, extrusión y recubrimiento por aspersion.
- Procesos físico químicos: coacervación simple o compleja y atrapamiento de liposomas.
- Procesos químicos: polimerización interfacial e inclusión molecular.

La selección del proceso de encapsulación dependerá del tamaño de la partícula, las propiedades fisicoquímicas de encapsulante y la sustancia a encapsular, el mecanismo de liberación deseado y el costo.

2.3 Técnicas de microencapsulación

Las técnicas de encapsulación pueden ser divididas en dos grupos: químicos y mecánicos (Huertas, 2010; Villena *et al.*, 2009).

2.3.1 Procesos químicos

2.3.1.1 Coacervación

Consta de un soluto polimérico separado en forma de pequeñas gotas líquidas, que constituye el coacervado. La deposición de este coacervado alrededor de las partículas insolubles dispersas en un líquido forma capsulas incipientes, que por una gelificación forma las capsulas finales. Esta técnica puede ser simple o compleja (Fig. 3),(Guevara *et al.*, 2008) y ha sido utilizada para la producción de microcápsulas de alcohol polivinilo, gelatina-acacia y varios otros polímeros (Huertas, 2010). La coacervación se puede

iniciar por distintas formas: cambios de pH, temperatura o adición de una sal iónica (Fernández *et al.*, 2005).

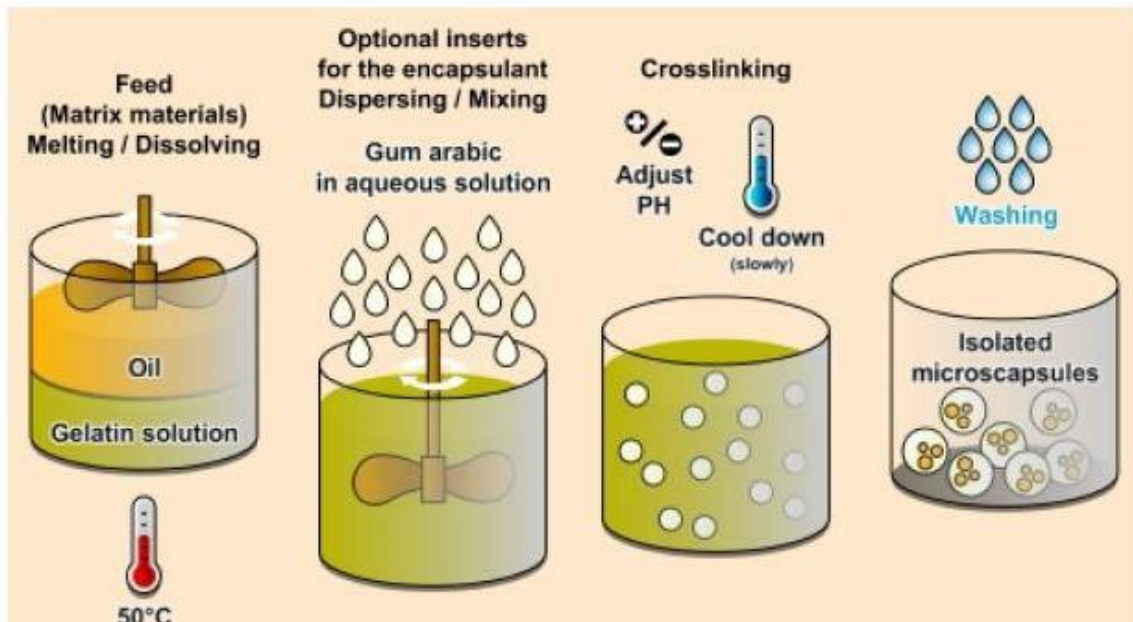


Figura 3. Formación de microcápsulas por coacervación compleja.

(Yumpu.com, 2014)

2.3.1.2 Co- cristalización

Es un proceso donde dos ingredientes son incorporados en un conglomerado poroso de microcristales de sacarosa formados por cristalización espontánea. La co-cristalización es una alternativa flexible y económica, por ser un procedimiento simple, numerosos productos pueden ser encapsulados como jugos de frutas, aceites esenciales, saborizantes, etc. Durante el proceso, el líquido saborizado es transformado en gránulos secos (Huertas, 2010).

2.3.1.3 Atrapamiento en liposomas

Son una única o multicapa de fosfolípidos conteniendo cualquier componente lipofílico (Fig. 4). Se describe como vesículas que se forman cuando películas de fosfolípidos son dispersadas en un medio acuoso, son selectivamente permeables a iones. Materiales hidrofóbicos e hidrofílicos pueden ser atrapados en liposomas que también pueden ser utilizados para la liberación de vacunas, enzimas y vitaminas. La liberación del principio activo se realiza por difusión a través de la bicapa, por destrucción de la vesícula, por medio de una concentración crítica de iones de calcio o por un cambio de pH (Huertas, 2010). Existen tres tipos de liposomas: multilamelar, vesículas de un compartimiento y macrovesículas. La sonicación forma un solo compartimiento de vesículas, mientras que las macrovesículas se forman por inyección de soluciones de lípido en un buffer de fosfatos (Fernández *et al.*, 2005).

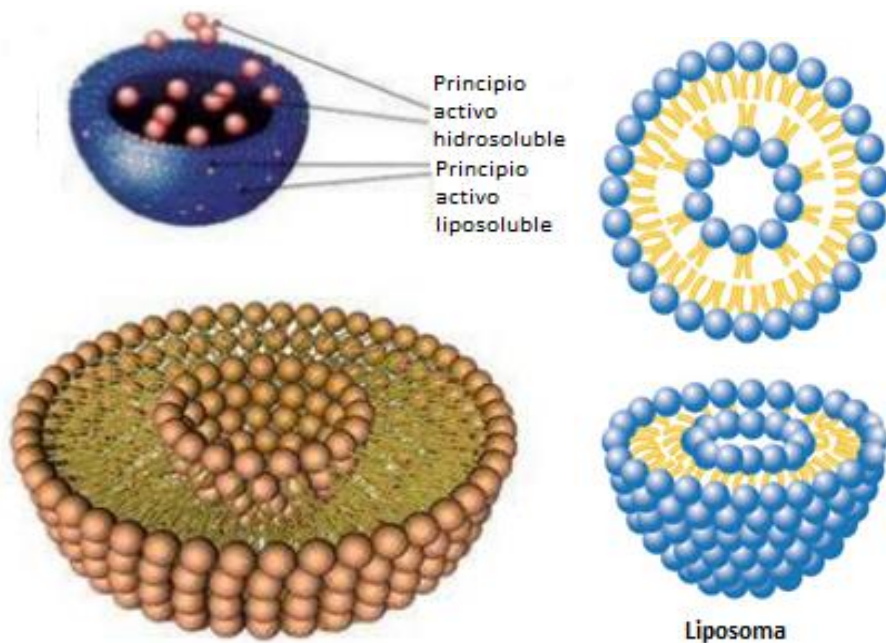


Figura 4. Atrapamiento en liposoma.

(lidiaconlaquimica.wordpress.com, 2015)

2.3.1.4 Inclusión molecular

Esta técnica es definida como el resultado de interacciones entre componentes en los cuales una pequeña molécula se ajusta dentro de otra y es rodeada por la forma circular de la otra molécula que es el agente encapsulante (Fig. 5). A través de este proceso se pueden proteger sabores y otros ingredientes sensibles al calor que son adicionados en alimentos (Huertas, 2010). La inclusión molecular utiliza beta-ciclodextrinas para el atrapamiento de moléculas, estas ciclodextrinas tienen un centro hidrofóbico mientras que la superficie exterior es hidrofílica (Fernández *et al.*, 2005).

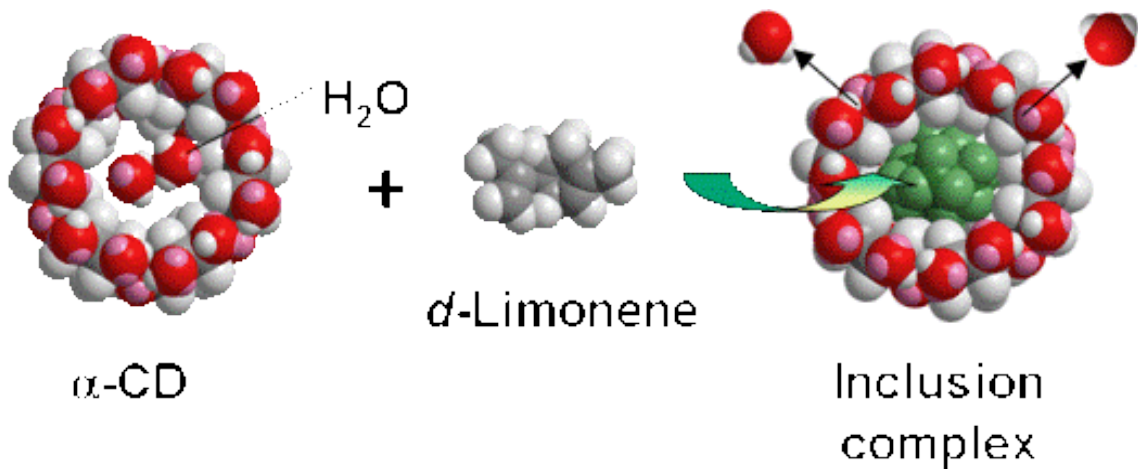


Figura 5. Inclusión molecular.

(Kagawa University, Food Engineering Lab.)

2.3.2 Procesos mecánicos

2.3.2.1 Secado por aspersión

El secado por aspersión es un método muy utilizado debido a que es un método económico y efectivo en la protección de los materiales (Fernández *et al.*, 2005), es un método capaz de transformar una disolución, una emulsión, una suspensión o una dispersión líquida en un producto seco y estable. Esencialmente consta de tres etapas (Yepez, 2013):

1. El líquido (ingrediente activo, vehículo y encapsulante) se introduce en el equipo por medio de una bomba y se atomiza.
2. Eliminación del disolvente dentro de una corriente de aire caliente, provocando que las partículas atomizadas se sequen y atrapen la molécula del principio activo.
3. Las partículas son depositadas en vasos o recipientes cerrados (Fig. 6).

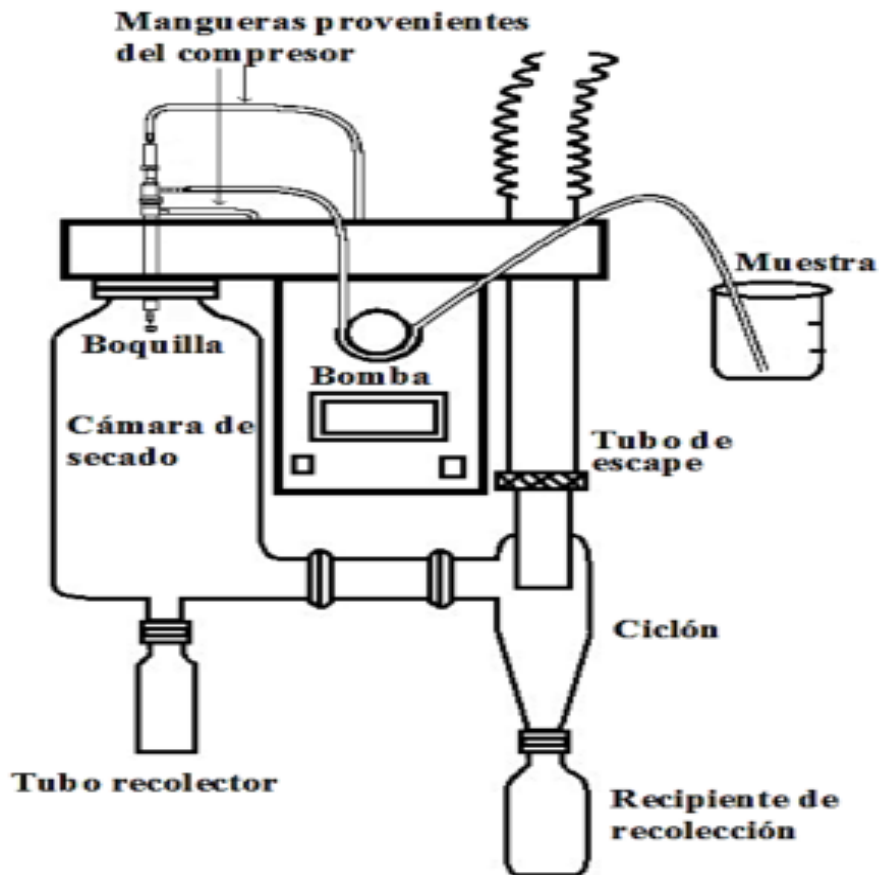


Figura 6. Esquema del equipo de Spray- dryer.

(Yepez, 2013).

Las principales variables del proceso de *spray drying* son:

1. El caudal del líquido de entrada, es regulado por una bomba peristáltica.
2. El caudal de aire de atomización suministrado por un compresor. Este caudal afecta a la atomización.
3. Temperatura y humedad del aire de entrada al cilindro de atomización.

La influencia de estas variables afecta la humedad del producto, el rendimiento de producción, la temperatura de salida y el tamaño de partícula (Yepez, 2013). Una variante del secado por aspersión consiste en enfriamiento o congelamiento, donde el

material a encapsular se mezcla con el transportador y es atomizado por medio de aire frío. Las microcápsulas son producidas por nebulización de la emulsión que contiene el material de recubrimiento y la sustancia activa (Castañeta *et al.*, 2011)

2.3.2.2 Aspersión por enfriamiento o congelamiento

La aspersión por enfriamiento y congelamiento es una variante del secado por aspersión, donde el material a encapsular es mezclado con el acarreador y es atomizado por medio de aire frío (Fernández *et al.*, 2005). Las microcápsulas son producidas por nebulización de la emulsión o suspensión que contiene el material pared y la sustancia activa puede ser sólida o líquida. En la aspersión por congelamiento, el material de cubierta es derretido y atomizado a través de una boquilla de neumático en un vaso, generalmente este contiene un baño de hielo de dióxido de carbono (CO₂), (temperatura -50 ° C) en una cama fluidizada derretida. Así, las gotas se adhieren sobre las partículas y forman una película de cubierta solidificada (Huertas, 2010). Las coberturas usadas por lo general son aceites vegetales en el caso de aspersión por enfriamiento o aceite vegetal hidrogenado en la aspersión por congelamiento (Fernández *et al.*, 2005).

2.3.2.3 Extrusión

Es la técnica más estudiada y antigua para producir cápsulas debido a su bajo costo, el método de extrusión consiste en producir pequeñas gotas de material encapsulado, donde la solución pasa a través de una boquilla en los dispositivos generadores de goteo (Fig. 7). El tamaño de las cápsulas dependerá del diámetro de salida de la solución (Pérez-Leonard *et al.*, 2013). Una de las desventajas de la técnica es la baja capacidad de producción y el gran tamaño de las partículas que se obtienen (De Araújo *et al.*, 2015; Pasin *et al.*, 2012).

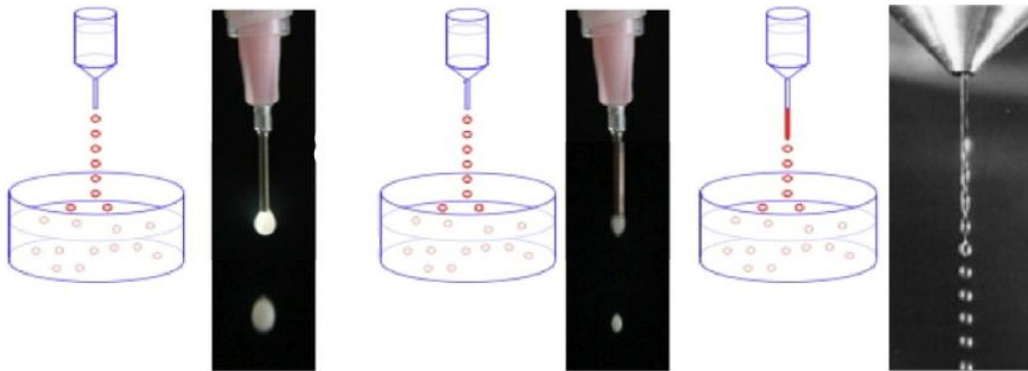


Figura 7. Extrusión.

(Yumpu.com, 2014).

2.4 Materiales de encapsulación

Anteriormente los materiales de encapsulación se consideraban no viables, sin embargo ahora son posibles; existe una amplia gama de materiales para cobertura que pueden ser utilizados para encapsular ingredientes, donde tenemos ceras, maltodextrinas, almidones y gomas (Cuadro 2) (Avila, 2011).

Cuadro 2 Materiales de encapsulación.

Tipo de material de pared	Material específico
Gomas	Goma arábica, goma xantana, alginato de calcio, carragenina.
Carbohidratos	Almidón modificado, jarabe de maíz, dextrinas, maltodextrinas, pectinas, quitosano, sacarosa, inulina.
Lípidos	Ceras, parafinas, ácido esteárico, monoglicéridos, diglicéridos, aceites, grasas.
Proteínas	Gluten, caseína, gnetina, albumina, colágeno.

(Avila, 2011)

La elección del material para cobertura es de suma importancia para mejorar la eficiencia de la encapsulación y estabilidad de las microcápsulas. Los criterios de selección del material de pared se basan principalmente en las propiedades fisicoquímicas como son: solubilidad, peso molecular, formación de película, propiedades emulsificantes o el tamaño de partícula (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Pérez-Leonard *et al.*, 2013).

2.4.1 Alginato

Los alginatos son sales del ácido alginico que pueden ser formadas con Na, K, Mg, Ca, entre otros, formando sales con diferentes grados de solubilidad en agua, lo cual confiere diversos grados de viscosidad. Este polímero tiene numerosas aplicaciones en las industrias alimentarias y farmacéuticas, su aplicación depende de cuatro propiedades principales, 1) su habilidad como espesante al disolverse en agua, 2) capacidad de retener agua, 3) habilidad de formar un gel a partir reacciones químicas de intercambio iónico y 4) propiedad de formar películas (Rhein-Knudsen *et al.*, 2017; Avendaño-Romero *et al.*, 2013). El alginato se puede extraer de algas marrones como *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria hyperborean*. El alginato es un polisacárido compuesto por ácido β - D-manurónico (M) y ácido α -L-gulurónico (G) unidos por enlaces glucosídicos en 1-4 (Ben Messaoud *et al.*, 2016; Castilhos *et al.*, 2017) (Fig.8). Los cuales se agrupan en secciones constituyendo homopolímeros tipo bloques G (-GGG-), bloques M (-MMM-) o heteropolímeros en donde los bloques M y G se alternan (-MGMG-), dependiendo de la fuente de algas, temporada de cosecha y ubicación geográfica de la fuente de algas. El alginato forma geles en presencia de iones de calcio, los cuales se unen principalmente a las cadenas de bloques GG del alginato formando una red de gel llamada "caja de huevo" (Rhein-Knudsen *et al.* 2017; Avendaño- Romero *et al.*, 2013) (Fig. 9).

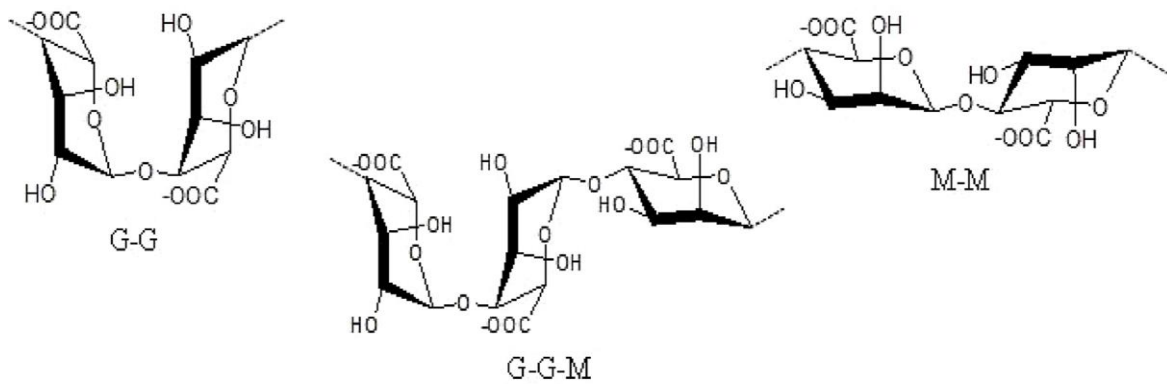


Figura 8. Estructura química del alginato.

β- D-manurónico (M) y ácido α-L-gulurónico (G) (Castilhos *et al.*, 2017).

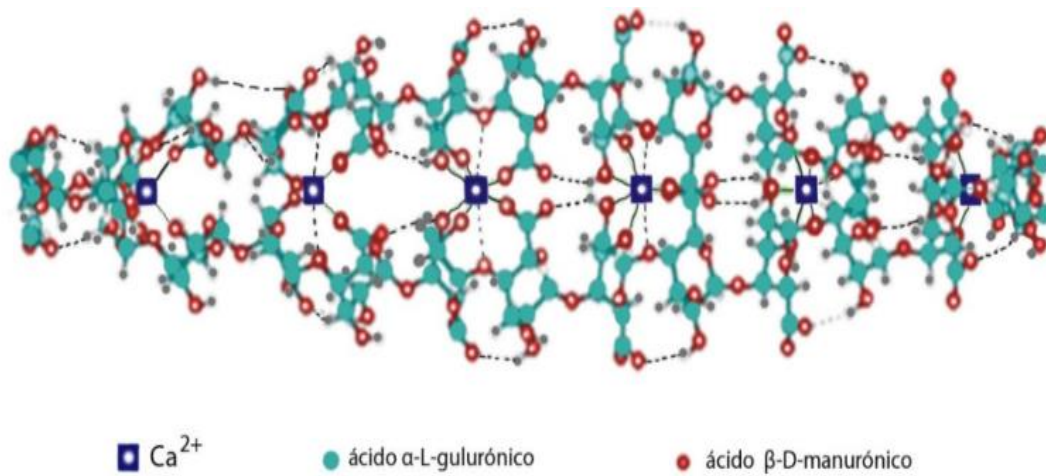


Figura 9. Modelo de caja de huevo, que describe la estructura del alginato.

(Avendaño-Romero *et al.*, 2013).

El alginato tiene varios usos en la industria alimentaria, como agente estabilizador es usado en la fabricación de helados, reduciendo la formación de cristales de hielo durante la congelación, como espesante es útil en salsas, jarabes y rellenos de pasteles, es usado en mezclas agua-aceite en la elaboración de mayonesa y aderezos por su capacidad emulgente. El alginato permite producir geles independientes de la temperatura y proteger compuestos encapsulados de factores adversos como el calor o la humedad, mejorando la estabilidad y biodisponibilidad. En la microencapsulación se ha empleado para proteger: vitaminas, minerales, ácidos grasos, microorganismos probióticos, proteínas, aminoácidos, fibras y enzimas. La microencapsulación ha permitido inmovilizar bacterias probióticas en una matriz de alginato con la finalidad de proteger y mejorar la biodisponibilidad de los microorganismos en los productos alimentarios y el tracto intestinal (Cuadro 3) (Avendaño-Romero *et al.* 2013).

El polímero se ha utilizado para la encapsulación de células (islotos pancreáticos, células recombinantes) y se ha elaborado en diversas formas para la regeneración de tejido neural, incluyendo tubos, esponjas e hidrogeles liofilizados (Lin *et al.*, 2017).

Cuadro 3 Aplicación de alginato para la microencapsulación de probióticos agregados a alimentos.

Bacterias	Matriz	Aplicación en alimentos
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Alginato	Leche, queso feta
<i>Bifidobacterium lactis</i>		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Alginato	Queso kasar y blanco
<i>Bifidobacterium bifidum</i>		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Alginato	Yogur
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Alginato/ pectina/ quitosano	Leche fermentada
<i>Bifidobacterium lactis</i>		
<i>Lactobacillus casei</i>	Alginato	Helados
<i>Bifidobacterium lactis</i>		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Alginato	Postres congelados
<i>Bifidobacterium</i>		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Alginato /almidón	Yogur
<i>Lactobacillus acidophilus</i>		

(Avendaño-Romero *et al.*, 2013)

2.4.2 Goma laca

La goma laca es un polímero natural, no tóxico que se obtiene de la secreción resinosa de la hembra *Kerria laca*, insecto parásito de los árboles, el cual produce principalmente cera (6-7%), resina dura soluble en etanol (70-80%) y (4-8%) de colorantes solubles en agua (Lu *et al.*, 2014). La resina se compone principalmente de una mezcla de ácidos alifáticos y alicíclicos (Morales *et al.*, 2017a; Limmatvapirat *et al.*, 2004) (Fig. 10). La fracción alifática contiene ácido aleurítico como componente principal mientras que la fracción alicíclica consiste en ácido sheloico. (Labuschagne *et al.*, 2016).

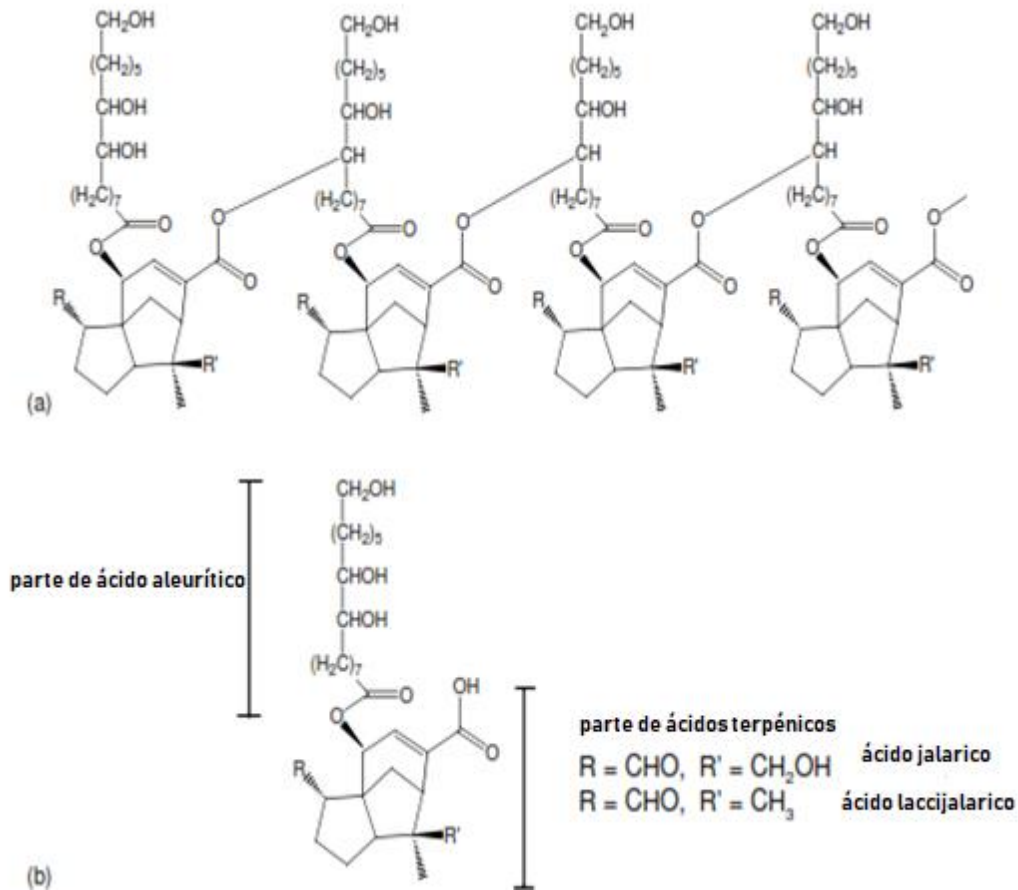


Figura 10. Estructura química de la goma laca.

Poliésteres (a), ésteres simples (b) (Limmatvapirat *et al.*, 2004).

La goma laca no es soluble en agua, sin embargo puede prepararse cuando el pH es mayor de 7 (Morales *et al.*, 2017a). Debido a sus excelentes propiedades de formación de película y protección, no toxicidad y biodegradabilidad, es usada como sellantes, material aislante y material de recubrimiento en la industria alimentaria y farmacéutica. Debido a estas propiedades, la goma laca ha adquirido un gran interés para desarrollar varios tipos de cápsulas tales como microesferas de goma de calcio preparadas por emulsión- precipitación, macrocápsulas de pectinato y microcápsulas rellenas de líquido recubiertas por extrusión, secado por aspersión y coprecipitación (Ben Messaoud *et al.*, 2016). Se ha utilizado como protección contra la humedad en los fármacos, administración controlada de los fármacos y recubrimiento entérico de los fármacos (Soradech *et al.*, 2012).

2.5 Caracterización de microcápsulas

2.5.1 Tamaño de microcápsula

La teoría de Stokes- Einstein es la base para medir el tamaño de partícula utilizando la espectrofotometría de correlación de fotones. De acuerdo a esta teoría el tipo de movimiento o la velocidad de las partículas, dependerá de la viscosidad, temperatura y tamaño molecular del medio donde se encuentran suspendidas. La interacción de las partículas con el medio, provocarán un movimiento irregular y aleatorio, este movimiento se conoce como movimiento Browniano (Romero, 2008).

Las técnicas de dispersión de luz son un punto de apoyo para determinar el tamaño de partícula y su distribución. La medición del tamaño de partícula utilizando la espectrofotometría de correlación de fotones requiere diluir las dispersiones de partículas

menores a 6 μm de diámetro. La espectrofotometría de correlación de fotones mide la velocidad de una partícula en movimiento y correlaciona esta velocidad con su tamaño (Williams y Vaugh, 2007).

2.5.2 Morfología Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

La morfología y tamaño de partícula se evalúan con Microscopía Electrónica de Barrido, este equipo permite la observación y caracterización de materiales en una resolución de 3 nm, utiliza electrones secundarios en lugar de fotones para formar imágenes de objetos diminutos. El microscopio electrónico funciona con un haz de electrones generados por un cañón electrónico, los electrones son acelerados a un alto voltaje y focalizados por medio de lentes magnéticas. El microscopio electrónico puede lograr una resolución mucho mayor que un microscopio óptico, debido a que la longitud de onda de los electrones es mucho más corta que la luz (Stefanaki, 2008).

El microscopio electrónico de barrido es el mejor método adaptado al estudio de la morfología de las superficies. Las lentes objetivas del MEB generan una imagen desmagnificada y un haz de electrones que se barre sobre la superficie de una muestra conductora de electricidad (Renau y Faura, 1994).

El MEB de alto vacío requiere que la muestra esté seca y sea conductora. Para hacer que la muestra sea conductora, se puede cubrir con oro o paladio, el cual se ioniza en un ionizador de metales bajo condiciones de alto vacío (Williams y Vaugh, 2007).

2.5.3 Índice de polidispersibilidad

El índice de polidispersidad (del inglés polydispersity index, PDI) es una medida de la homogeneidad de las partículas y oscila entre 0 y 1. Cuanto más se acerque a cero la polidispersidad, esta es más homogéneas serán las partículas de la suspensión (Romero, 2008). El índice de polidispersidad es un parámetro obtenido de manera simultánea con el tamaño de partícula. Provee información sobre la muestra: valores cercanos a 0 indican que la muestra es monodispersa así como valores cercanos a la unidad indican que la muestra presenta gran variedad de tamaños (Lancheros *et al.*, 2014).

3 JUSTIFICACIÓN

Está demostrado que la infusión de pectina antagoniza la absorción del β -caroteno en el tracto digestivo (Cruz-Monterrosa *et al.*, 2015). Por tal motivo, la microencapsulación de pectina con combinaciones de goma laca y alginato de sodio, la protegerá de los microorganismos del rumen, disociándose a pH menor de 5 y se liberará en el intestino de los rumiantes para antagonizar los β -carotenos con la unión de pectina.

4 HIPÓTESIS

La combinación de goma laca y alginato de sodio protegerá a la pectina de la degradación ruminal y se liberará en el intestino por la acción del bajo pH en el abomaso para actuar como antagonista en la absorción de los β -carotenos a nivel intestinal.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Diseñar y producción de microencapsulados de pectina que resistan la degradación a pH en el intervalo de 6.0 a 7.0 (simulando las condiciones del rumen) y sean degradados a pH de 3.0 a 4.0 (simulando el intestino)

5.2 Objetivos particulares

1. Diseñar y producción de y caracterizar microcápsulas elaboradas con pectina.
2. Evaluar la resistencia *in vitro* de las microcápsulas de pectina a pH similar al fluido ruminal.
3. Evaluar la degradabilidad *in vitro* de las microcápsulas de pectina con pH similar al intestino.

6 MATERIAL Y METODOS

6.1 Localización

El estudio se realizó en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ubicado en el municipio de Texcoco, Estado de México. Las microcápsulas se elaboraron en el Módulo de Nanotecnología y se identificaron en el laboratorio de Nutrición Animal del Postgrado de Ganadería, en la Unidad de Microscopia Electrónica (UME) y en el IPICYT.

6.2 Microcápsulas

6.2.1 Materiales

Se utilizó pectina cítrica (con 69% de grado de esterificación, Cargill®) como el material a encapsular. Agentes encapsulantes: alginato de sodio (AS: $C_6H_7O_6Na$. Sigma®) y goma laca (GL: CEDROSA). Con la experiencia de pruebas preliminares, se plantearon los siguientes tratamientos:

Grupo 1. La GL se incluyó en la mezcla de preparación y en la cubierta de las microcápsulas:

Tratamiento 1 (T1): Se mezclaron 8 g de pectina + 5.2 de AS + 2 g de GL (disuelta en 30 mL de alcohol etílico) en 400 mL de agua desionizada. Una vez formadas las microcápsulas, se cubrieron con una capa de GL por *inmersión*.

Tratamiento 2 (T2): Microcápsulas formadas con los mismos ingredientes del tratamiento 1, fueron cubiertas con GL por *aspersión*.

Grupo 2. No se incluyó la GL en la mezcla de preparación. Solo se usó GL en la cubierta de las microcápsulas:

Tratamiento 3 (T3): se mezclaron 8 g de pectina + 5.2 de AS en 400 mL de agua desionizada. Se formaron las microcápsulas y se cubrieron con una capa de GL por *inmersión*

Tratamiento 4 (T4): Microcápsulas formadas con los mismos ingredientes del tratamiento 3, fueron cubiertas con GL por *aspersión*.

Grupo 3. Tratamientos de referencia

Tratamiento 5: Testigo. Incluyó 8 g de pectina sin encapsular en 400 mL de agua desionizada.

Tratamiento 6. Blanco. Incluyó 400 mL de agua desionizada.

6.2.2 Obtención de microcápsulas de pectina

Las microcápsulas se prepararon con método de extrusión, utilizando un encapsulador B- 390 BUCHI, a frecuencia de 810 Hz, con 28.3 °C y presión de 677 a 718 mbar. Las microcápsulas se captaron en una solución de CaCl₂, secándose a temperatura ambiente (24- 27 °C). La capa de GL aplicada después de formarse las microcápsulas se realizó con un atomizador (250 ml) con 4 aspersiones continuas (0.5 ml por aspersion en 8g de microcápsulas), homogenizando constantemente la muestra. Mientras en los tratamientos con GL por inmersión, se introdujeron 8 g de microcápsulas en 30 mL de la solución (alcohol y GL) por 5 minutos.

Alginato de sodio



Pectina

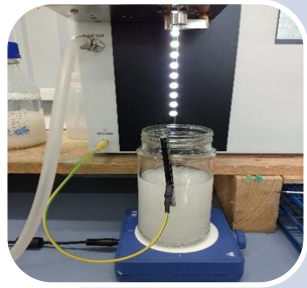


Agua deionizada



Solución con goma laca

Microencapsulador Buchi-390



Cloruro de calcio



Microcápsulas de pectina húmedas



Microcápsulas de pectina secas



Microcápsulas de pectina secas



Aspersión de goma laca



Microcápsulas de pectina secas con aspersión de goma laca



Microcápsulas de pectina
secas



Baño con goma laca



Microcápsulas de pectina
secas con baño de goma
laca

6.3 Caracterización de microcápsulas

6.3.1 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

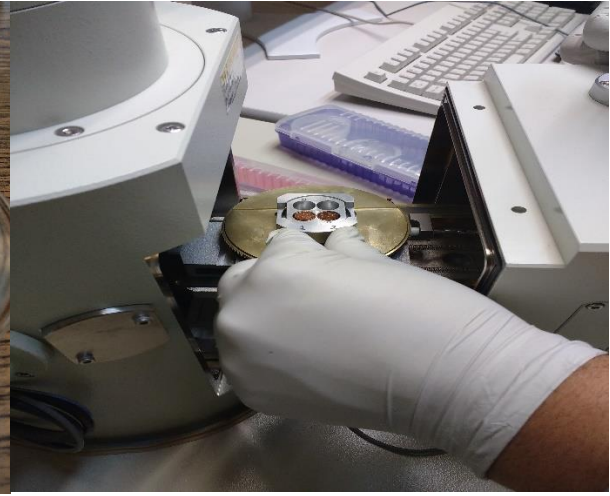
La morfología de las microcápsulas se evaluó con un microscopio electrónico de barrido de alto vacío (JSM 6390, JEOL Japon-) a 10 Kev en la Unidad de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados y en un Microscopio Electrónico ESEM FEI-QUANTA 200 (Fei- Termolab, USA) operado en modo de bajo vacío y electrones secundarios+electrones retrodispersos a 20 keV. Las microcápsulas se colocaron en el porta-muestras de latón con una cinta conductiva doble adhesiva de carbón y para el caso del microscopio jsm 6390 las microparticulas se recubrieron con oro/paladio en una ionizadora de metales (Ion Sputter JFC-1100).



Porta muestras de laton



Microcápsulas de pectina
con baño de oro



Colocación de
microcápsulas de pectina en
microscopio electrónico de
barrido

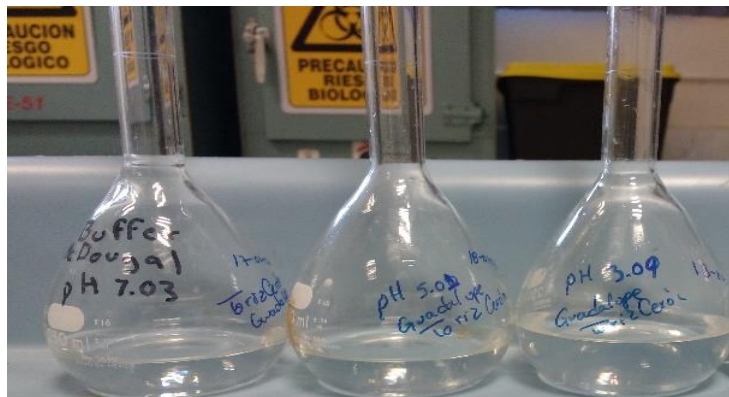


Microscopio electrónico de
barrido

7 DISOLUCIÓN DE MICROCÁPSULAS

7.1 Preparación de soluciones búfer

- Se disolvió NaHCO_3 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl , NaCl y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 2 L de agua destilada para preparar la saliva McDougall y se ajustó el pH a 7.0 y 5.0 con ácido acético.
- Para el búfer del pH 3.0 se mezclaron 10.211 g de talato ácido de potasio en 200 mL de agua y 0.614 mL de HCl, de los cuales se tomaron 50 mL del talato ácido de potasio y 20.3 mL de HCl para aforar a 200 mL.



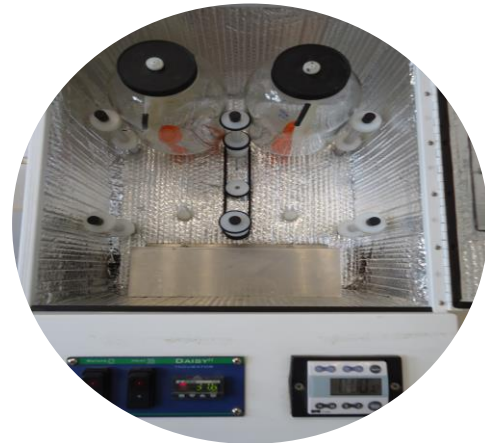
Búfer pH 7, pH 5 y pH 3.

7.2 Prueba de disolución a diferente pH y eficiencia de encapsulación de la pectina

Se pesaron 0.5 g de las muestras de microcápsulas y se agregaron 25 mL de cada búfer. Los tubos se colocaron en el digestor Daisy (ANKOM. Technology. Fairport. NY-USA) a temperatura de 39°C (simulando la del rumen) con agitación circular constante.



Microcápsulas de pectina



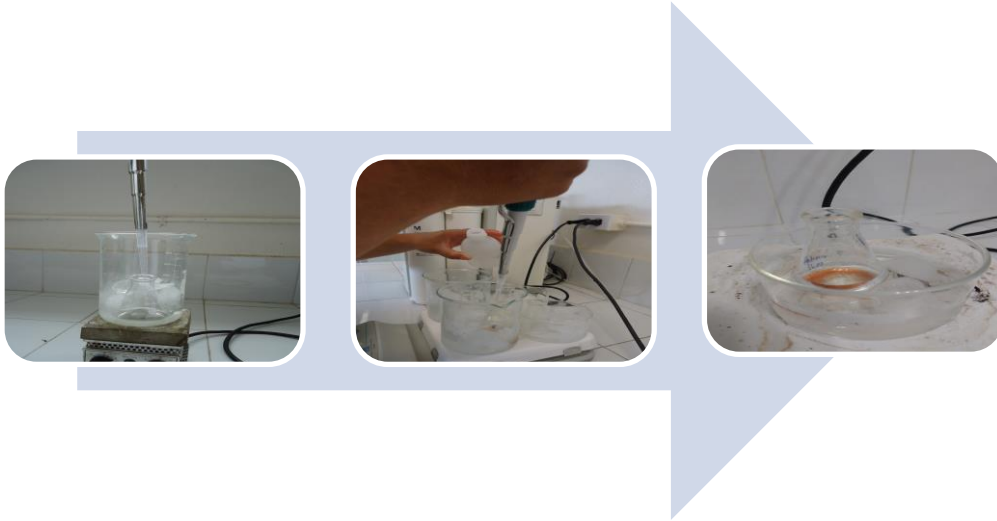
Digestor Daisy

Se tomó una alícuota de 250 μL a los 15 min y a la hora y se colocó en baño de hielo en una placa de agitación magnética para realizar una digestión ácida.



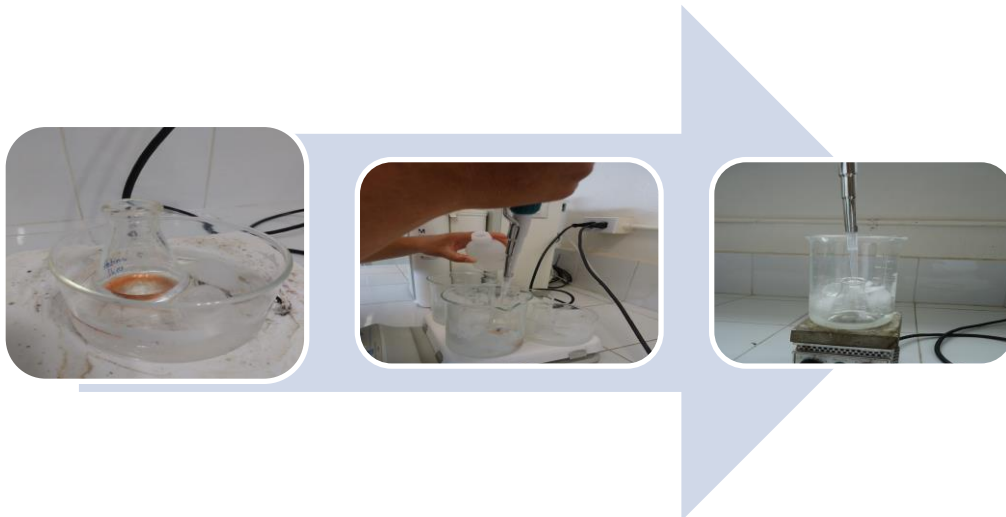
Alícuota de las microcápsulas de pectina

A cada alícuota se le añadió 1 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) y se mantuvo en agitación magnética por 10 min, esta operación se repitió una vez.



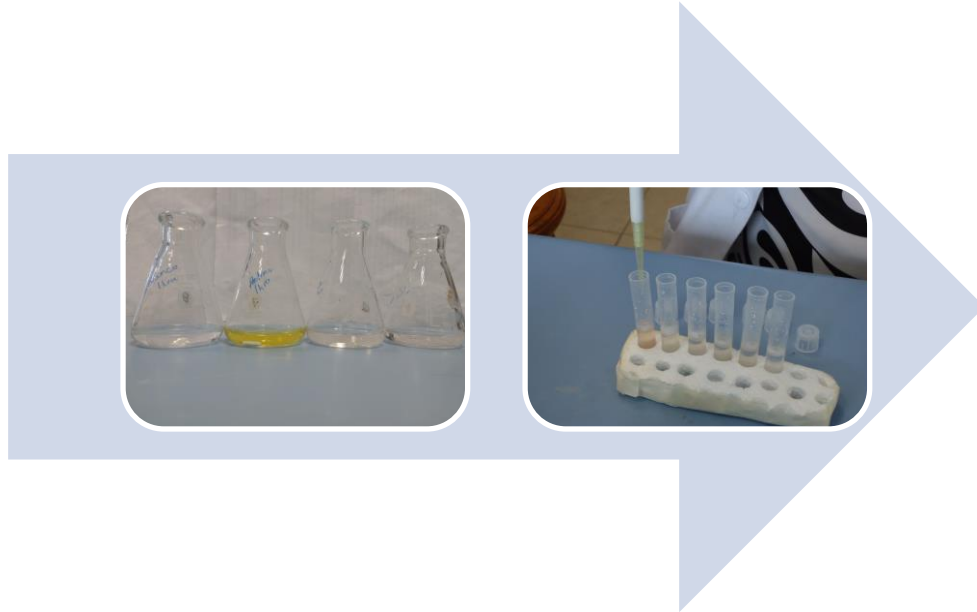
Ácido sulfúrico

Se agregaron 500 μL de agua destilada, se mantuvo en agitación 10 min y se repitió la adición de 500 μL de agua destilada, ahora con agitación durante 20 min. Finalmente se añadieron 7 mL de agua destilada, se agitó y se enfrió en hielo.



Agua destilada

A partir de la muestra digerida se tomó una alícuota de 0.1mL de cada tubo, se colocaron en baño de hielo y se les añadieron 2 mL de una solución de 0.5% de borato de sodio en H₂SO₄ concentrado.



Muestra digerida

Muestra digerida con borato de sodio

La mezcla se agitó en vórtex y se colocó en baño de agua hirviendo por 5 min. Una vez pasado el tiempo de ebullición, los tubos se enfriaron en hielo, se agregaron 40 μ L de m-fenifenol (a concentración del 0.15% en hidróxido de sodio al 0.5%). Se agitaron en vórtex y se reposaron por 15 min a temperatura ambiente (24- 27 °C).



m- fenilfenol

Pasado el tiempo de reposo se agitaron y se registró la absorbancia de la muestra a 520 nm en un espectrofotómetro (Cary UV-Vis 1-E), calculando la concentración a partir de una curva de calibración de 0 a 40 μg de ácido D-galacturónico (Sigma) (Rayah y Lavaritch, 1997).



Lectura de absorbancia de la muestra

Para determinar la cantidad de pectina liberada en los distintos pH, se determinó el porcentaje de ácidos urónicos de acuerdo al siguiente cálculo:

$$\% \text{ ácidos urónicos} = \left(\frac{(\mu\text{g})(\text{FD})}{\mu\text{g muestra}} \right) * 100$$

Donde:

μg = valor instrumento de la concentración de ácido D-galacturónico en μg

FD = Factor de disolución = vol. total (10 mL) / vol. de la alícuota (0.1 mL) = 100

$\mu\text{g muestra}$ = peso de la muestra en μg = 5000

8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y DISEÑO EXPERIMENTAL

La caracterización microscópica de las microcápsulas, se describieron cualitativamente. Liberación de ac. D-galacturónico *in vitro* a diferentes soluciones de pH: Se realizaron 6 repeticiones por cada tratamiento en dos corridas a diferentes tiempos. Los valores obtenidos se ajustaron con el tratamiento-blanco de referencia. El porcentaje de liberación de la pectina (PLP) de cada tratamiento se cuantificó con la cantidad total de ácido D-galacturónico liberado, usando la siguiente formula:

$$PLP = \frac{\text{cantidad de D – galacturónico liberado de pectina microencapsulada}}{\text{cantidad de D – galacturónico liberado de pectina no encapsulada}} \times 100$$

Los PLP de los tratamientos 1 a 4 fueron analizados con un diseño completamente al azar considerando los factores de pH (3, 5 y 7) entre cada uno de los tratamientos. El modelo estadístico fue el siguiente:

Modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + T_i(pH_j) + T_i \times pH_j + \epsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Variable de respuesta en PLP.

μ = Media general.

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento.

$T_i(pH_j)$ = Efecto del j-ésimo pH dentro del i-ésimo tratamiento.

$T_i \times pH_j$ = Interacción i-ésimo tratamiento con j-ésimo pH.

δ_{jj} = Error aleatorio

La comparación de las medias estadísticas se realizó con la prueba de Tukey utilizando el paquete estadístico IBM-SPSS ver. 21.

9 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Microcápsulas de pectina

La evaluación de la composición química de las micropartículas y la evaluación del contenido de fármaco pueden llevarse a cabo usando espectroscopia de energía dispersa. Las partículas cubiertas pueden observarse en el MEB en voltajes de 15- 20 Kv para obtener grandes aumentos (Romero, 2008).

La figura 11 muestra la morfología de las microcápsulas de pectina producidas, estas se cubrieron con una capa de goma laca, su forma fue irregular con una textura rugosa y porosa en la superficie. Los resultados referentes a la morfología fueron similares a los reportados por (Silva *et al.*, 2018), quienes microencapsularon *Lactobacillus acidophilus* (LA3) con alginato de sodio y GL como polímero, mediante la técnicas de extrusión y co-extrusión.

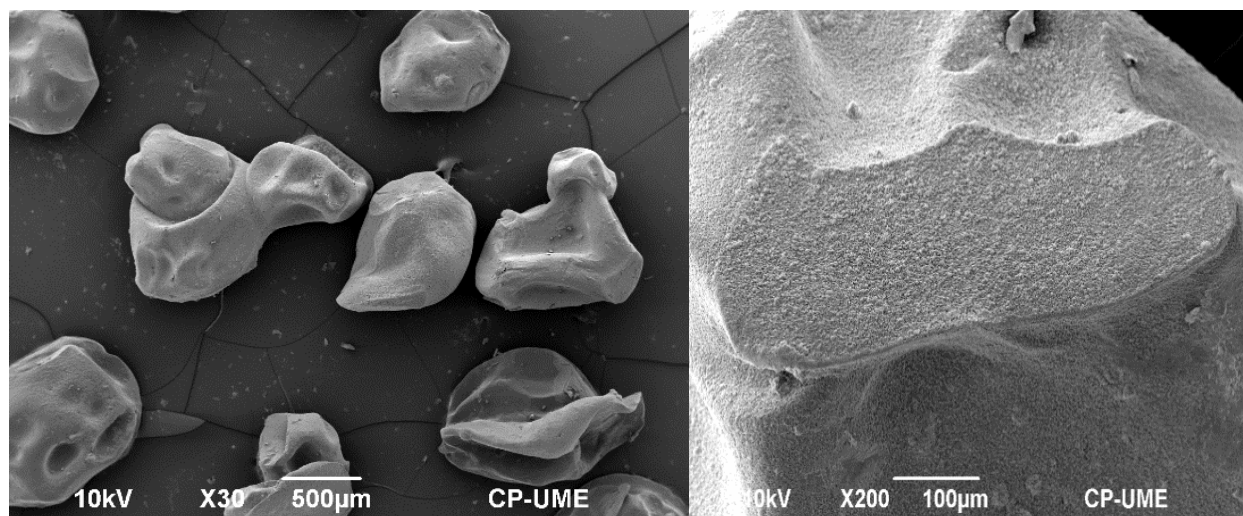


Figura 11. Micrografía (MEB) de microcápsulas de pectina.

Las micrografías de las Figuras 12 a 15 muestran microcápsulas de forma irregular, con diferente textura en la superficie de acuerdo al tratamiento que recibieron.

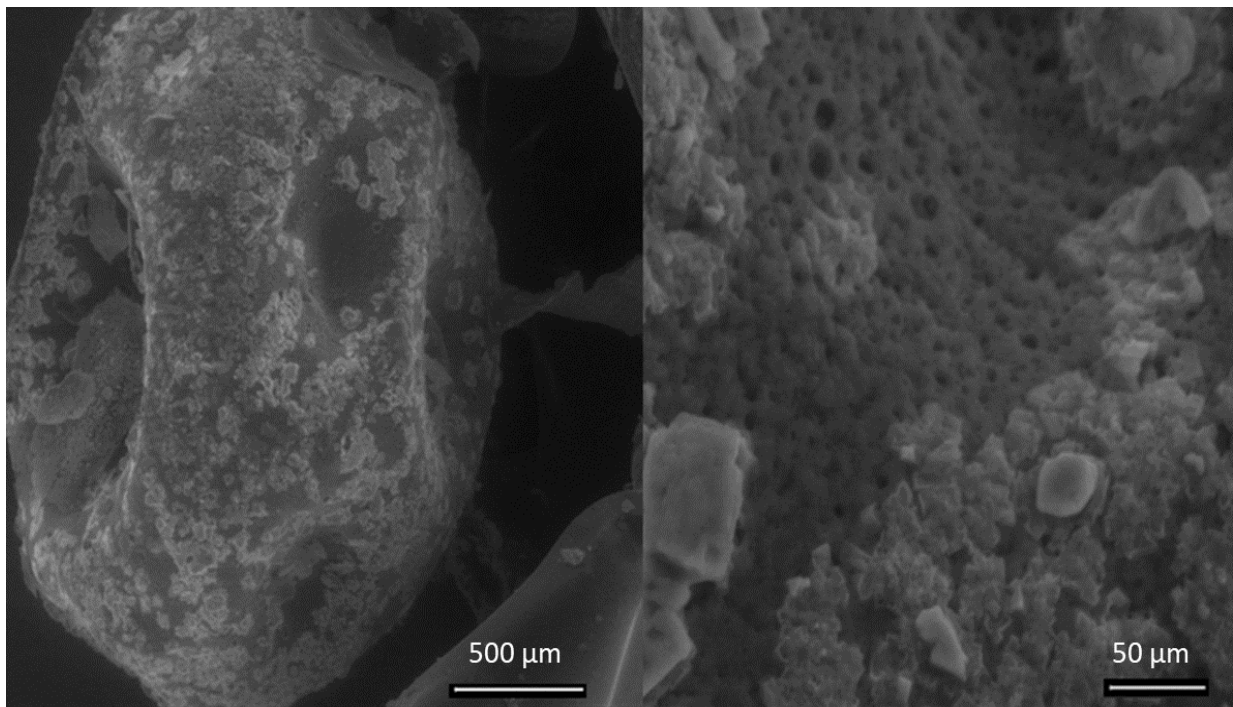


Figura 12. Micrografía (MEB) de microcápsulas de pectina elaboradas con tratamiento uno: pectina+ alginato de sodio+ goma laca con aspersion de goma laca.

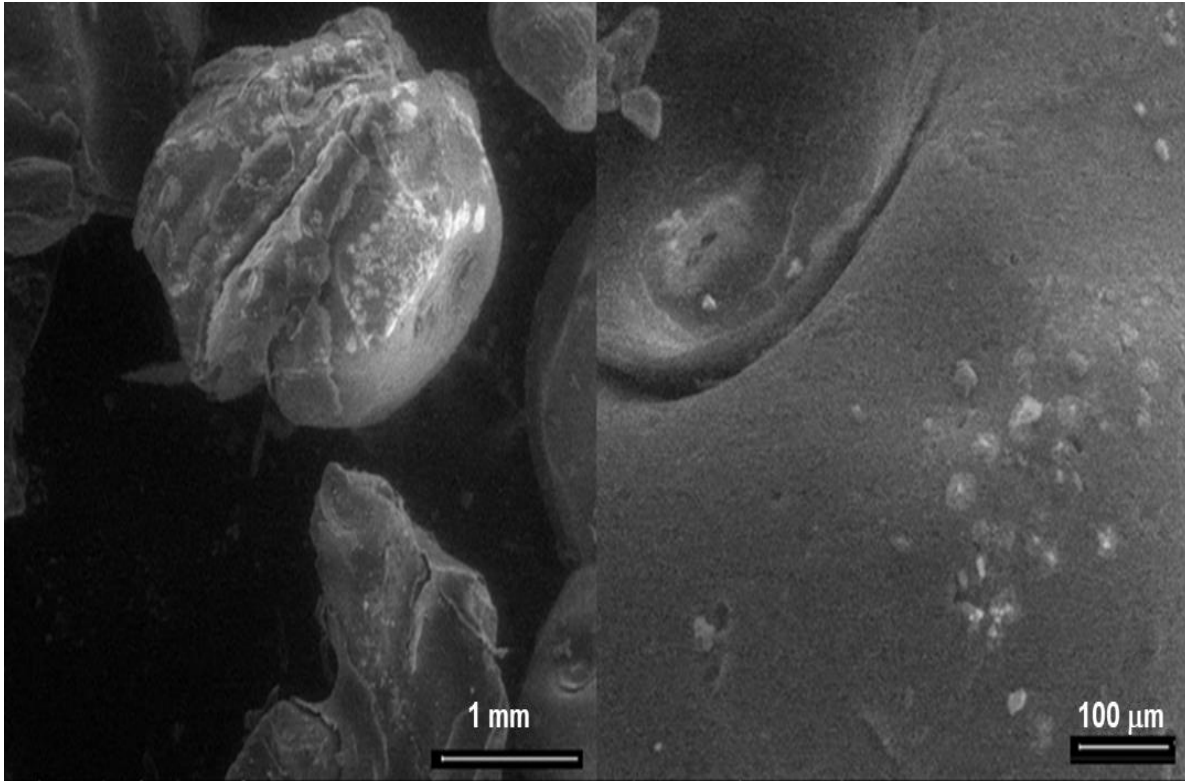


Figura 13. Micrografía (MEB) de microcápsulas de pectina elaboradas con el tratamiento dos: pectina+ alginato de sodio+ goma laca con baño de goma laca.

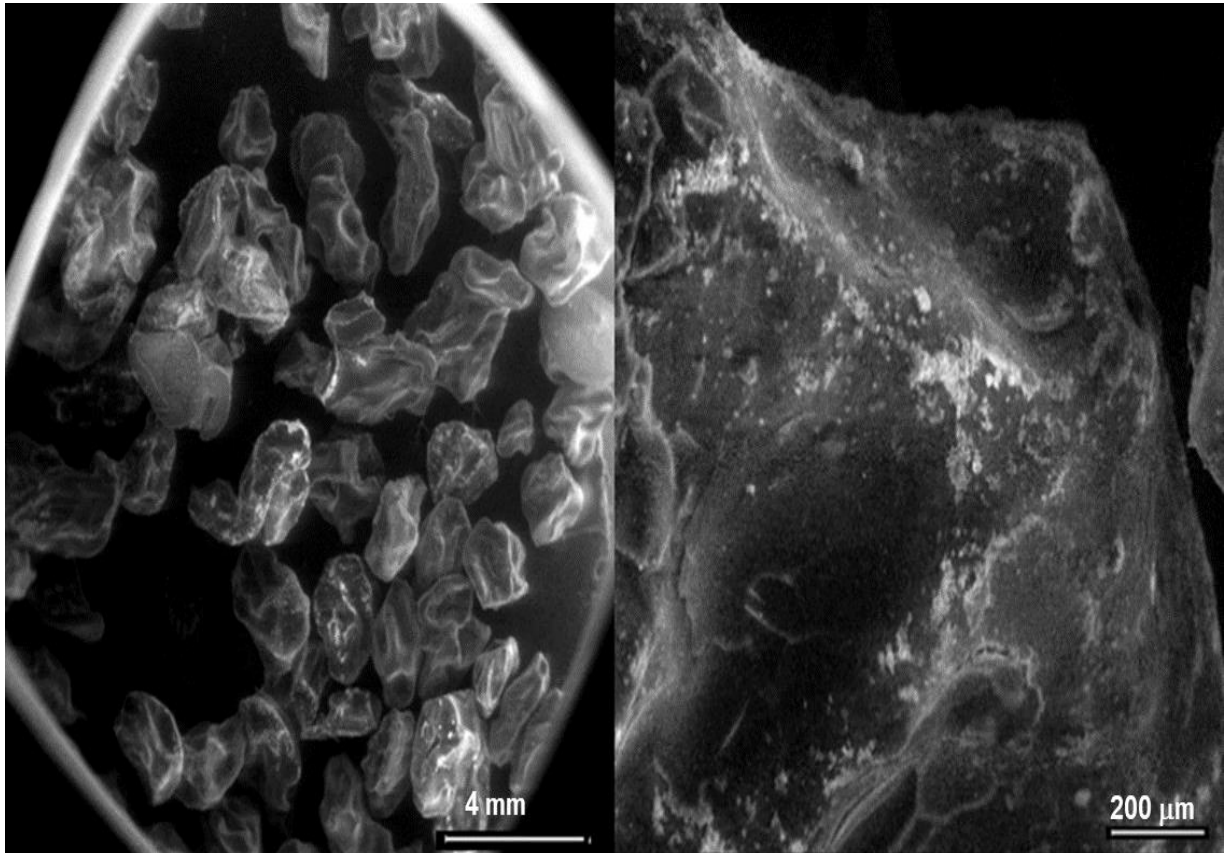


Figura 14. Micrografía (MEB) de microcápsulas d pectina elaboradas con el tratamiento tres: pectina+ alginato de sodio con aspersion de goma laca.

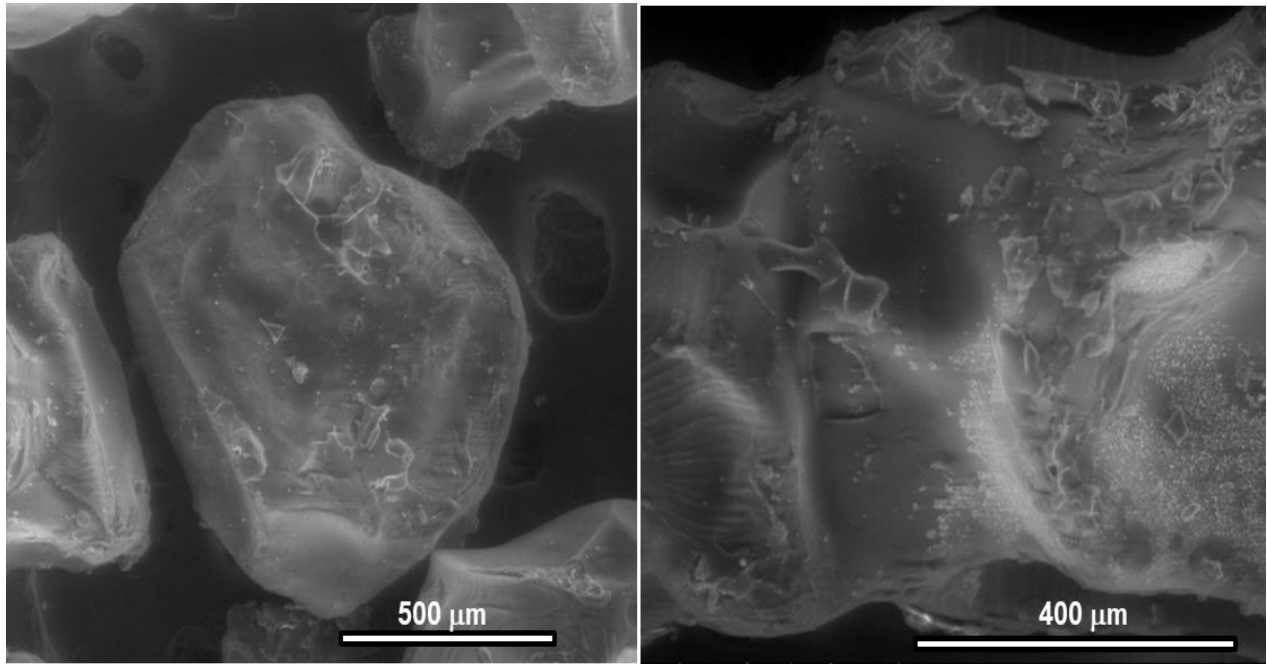


Figura 15. Micrografía (MEB) de microcápsulas de pectina elaboradas con el tratamiento cuatro: pectina+ alginato de sodio con baño de goma laca.

La morfología para las microcápsulas recubiertas con alginato y GL en los cuatro tratamientos presentaron formas irregulares, rugosas y porosas, con tamaños de 600 a 1000 μm , similares a lo reportado por (Silva *et al.*, 2018). La morfología resultante de las microcápsulas se atribuye principalmente a las condiciones del proceso de encapsulación, captación y secado de las mismas. Según (Srnidel, 2008) se forman microcápsulas más esféricas captándolas en una solución de cloruro de calcio con temperatura elevada, también menciona que la técnica de secado podría influir en el tamaño y forma. Las microcápsulas secadas por lecho-fluidizado presentan forma esférica y estructura rígida, mientras las microcápsulas secadas por liofilización y en el medio ambiente tenían una forma casi redonda con estructura muy frágil (Silva *et al.*, 2016).

9.2 Estudios de liberación de pectina en función del pH

Hubo interacción estadística entre el pH y los tratamientos ($P < 0.001$). El pH de 3, independientemente del tipo de tratamiento, mejoró el PLP en 50% (pH = 3: 32.14 vs. pH=5: 16.43 y pH=7: 10.86%). La Tabla 1 muestra los PLP en cada tratamiento asociado al pH. Únicamente el T3 a pH 3 presentó el valor más alto de PLP ($P < 0.001$), indicado como aceptable.

Cuadro 4 Porcentaje de liberación de Pectina como ácido D-galacturónico en cuatro preparaciones de microcápsulas.

Tratamientos	pH	Liberación	D.E	Significancia	P =
1	3	9.85	0.06	3 vs. 5	0.001
	5	14.47	0.70	3 vs. 7	0.846
	7	9.39	1.89	5 vs. 7	0.000
2	3	20.85	0.04	3 vs. 5	0.044
	5	16.42	3.76	3 vs. 7	0.024
	7	15.81	0.30	5 vs. 7	0.919
3	3	76.30	15.52	3 vs. 5	0.000
	5	25.88	3.06	3 vs. 7	0.000
	7	10.93	1.91	5 vs. 7	0.108
4	3	21.57	0.063	3 vs. 5	0.000
	5	8.96	0.125	3 vs. 7	0.000
	7	7.30	0.204	5 vs. 7	0.000

T1: Microcápsulas cubierta con goma laca (GL) por inmersión e incluida en la matriz.

Preparación: 8 g de pectina + 5.2 de AS + 2 g de GL (disuelta en 30 mL de alcohol etílico) en 400 mL de agua deionizada. Una vez formadas las microcápsulas, se cubrieron con

una capa de GL por *inmersión*. **T2:** Microcápsulas cubiertas con GL por *aspersión e incluida en la matriz*. Preparación: Formadas con los mismos ingredientes de T1. **T3:**

Microcápsulas cubierta con GL por inmersión sin incluirla en la matriz. Preparación: se mezclaron 8 g de pectina + 5.2 de AS en 400 mL de agua deionizada. Se formaron las microcápsulas y se cubrieron con una capa de GL por *inmersión*. **T4:** Microcápsulas

cubierta con GL por *aspersión* sin incluirla en la matriz. Preparación: Microcápsulas formadas con los mismos ingredientes de T3, fueron cubiertas con GL por *aspersión*.

D.E. = Desviación estándar

La liberación del ac. D-galacturónico fue mayor a un pH 3.0 en los T2, T3 y T4 ($P < 0.05$), contrariamente el T1 presentó la mayor liberación de ac. D-galacturónico con pH 5.0 ($P < .001$). En general, los resultados indican que la máxima liberación de pectina de las microcápsulas fue a pH 3.0, indicando que los aglutinados y el proceso de encapsulación influyen notoriamente en la liberación de la pectina. Teóricamente la GL es soluble en soluciones alcalinas, pero resiste al agua, y por ser un compuesto moldeable bajo condiciones de presión, temperatura y disolución en solventes orgánicos volátiles se ha utilizado para elaborar recubrimientos con dureza y durabilidad (Del Piano et al., 2011; Farag y Leopold 2011). Se han encapsulado *Lactobacillus reuteri* (Schell y Beermann 2014) y *Lactobacillus paracasei*, (Silva et al. 2016) utilizando suero de leche en polvo y alginato de sodio, ambos combinados con GL; los resultados de sobrevivencia del probiótico con condiciones de pH 2 mejoró la sobrevivencia en 77%. Los resultados están relacionados a la característica resinosa de la GL indicando que microcápsulas con alginato y GL pueden ser usadas como un sistema de encapsulación para liberar un compuesto lipofílico a nivel intestinal. También se han desarrollado microcápsulas de teofilina de liberación sostenida recubiertas con GL (Farag y Leopold 2011) las cuales fueron probadas a un pH 1.2, encontrando que ninguna de las formulaciones mostró liberación de más del 4% de la dosis dentro de 120 min, confirmando resistencia gástrica. En el caso de rumiantes se han preparado microcápsulas con secado por pulverización usando almidón poroso como material núcleo, y una triple recubierta de Eudragit E100 y GL. El rendimiento fue de aproximadamente 48% y diámetro de 20-30 μm de partícula. Las microcápsulas tuvieron estabilidad a la solución neutra del pH ruminal (pH 6,5). Además, cuando se incubaron microcápsulas en presencia de microorganismos ruminales, La eficacia de la liberación de estas microcápsulas fue de 85% en solo 30

minutos en pH 3.0 (ambiente abomasal) (Tetsuro et al., 1999; Tetsuro et al., 2000). En nuestro estudio el procedimiento de extrusión es más sencillo que los publicados y el idóneo fue el T3, donde solamente se incluyó la GL con cubierta por inmersión. Como es sabido la GL contiene polímeros que ocasionan incremento en la porosidad, existiendo asociación entre el tamaño y la porosidad (simulando la estructura de las zarzamoras) (Rhys y Frank 2015). Por lo tanto, hace suponer que las morfología de las microcapsulas cuando se incluyó la GL en la matriz, las hizo porosas, motivo por la cual fue la baja liberación del ácido D-galacturónico. Mientras que el revestimiento de las microcápsulas con GL proporcionó mejor protección a pH alcalino, liberándose adecuadamente a pH ácido, como el encontrado en el ambiente duodenal (Stummer et al. 2010).

10 CONCLUSIONES

El método de extrusión resultó una alternativa viable para elaborar microcápsulas de pectina debido a que es un proceso flexible y de buena calidad. Las microcápsulas producidas por este método tuvieron formas irregulares, rugosas y porosas, con diferente textura en la superficie de acuerdo al tratamiento que recibieron. Se prepararon satisfactoriamente microcápsulas de pectina con la metodología empleada, capaces de resistir pH de 6.5 a 7. La mayor liberación de pectina de las microcápsulas, se presentó a pH de 3. El tratamiento utilizado influyó en la liberación de pectina. Al usar una doble capa de goma laca, se presentó menos liberación de pectina a pH de 7 en 60 min.

11 LITERATURA CITADA

“Kagawa University, Food Engineering Lab.” Consultado el 17 de junio de 2017.

<http://www.ag.kagawa-u.ac.jp/foodeng.yoshii/ereseach%20theme.html>.

“Los glicerolípidos”. 2015. Lidia con la Química (blog). el 3 de julio de 2015.

<https://lidiakonlaquimica.wordpress.com/2015/07/03/los-glicerolipidos/>.

Amorena, B.; Baselga, R. y Albizu, I. 1994. “Use of liposome-immunopotentiated exopolysaccharide as a component of an ovine mastitis staphylococcal vaccine”.
Vaccine 12(3): 243-249.

Avendaño, G.C., López, A. y Palou E. 2013. “Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos”. Departamento de Ingeniería Química, alimentos y Ambiental, Universidad de las Américas Puebla. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos 7-1: 87- 96.

Avila, S. V. 2011. “Efecto del agente encapsulante en la viabilidad de un microorganismo probiótico (Lactobacillus rhamnosus B442)”. Tesis de Maestría para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional.

Badui, S. y Valdés, S.E. 2010. “Química de los alimentos”. Pearson Educación. 92-97.

Barbour, E. y Newman, J. 1990. “Preliminary data on efficacy of Mycoplasma gallisepticum vaccines containing different adjuvants in laying hens”. Veterinary Immunology and Immunopathology. 26(2): 115-123.

Barrón, S., Mora, O., Castaño, V., y Shimada, A. 2006. “Yellow pigmentation of adipose tissue of pasture-fed tropical cattle as related to its carotenoid concentration and fatty-acid profile.” Técnica Pecuaria en México 44 (2).

- Ben -Messaoud, G., Sánchez, L., Probst, L., Jeandel, C., Arab-Tehrany, A. y Desobry, S. 2016. "Physico-Chemical Properties of Alginate/Shellac Aqueous-Core Capsules: Influence of Membrane Architecture on Riboflavin Release". *Carbohydrate Polymers* 144: 428–37.
- Betoret, E., N. Betoret, D. Vidal, y P. Fito. 2011. "Functional Foods Development: Trends and Technologies". *Trends in Food Science & Technology* 22 (9): 498–508.
- Bontempo, V.; Baldi, A.; Cheli, F.; Fantuz, F.; Politis, I.; Carli, S. y Dell'Orto, V. 2000. "Kinetic behavior of three preparations of alpha-tocopherol after oral administration to postpubertal heifers". *American Journal of Veterinary Research*. 61(5): 589-593.
- Brenes, A. 2014. "Los carotenoides dietéticos en el organismo animal". *Nutrición Animal Tropical* 8 (1): 21- 29.
- Brown, E.D., Micozzi, M.S., Craft, N.E., Bieri, J.G., Beecher, G., Edwards, B.K., Rose, A., Taylor, P.R. y Smith, J.C.1992. "Plasma carotenoids in normal men after a single ingestion of vegetables or purified B-carotene". *The American Journal of Clinical Nutrition*. 49: 1258-65
- Castañeta, H., Gemio, R., Yapu, W. y Nogales, J. 2011. "Microencapsulación, un método para la conservación de propiedades fisicoquímicas y biológicas de sustancias químicas". *Revista Boliviana de Química* 28 (2): 135–140.
- Castilhos, D.B., Sampaio, M.F.M., da Silva, C., Riegel-Vidotti, C., Grassi, T. y Silva, J.G. 2017. "Physical-Chemical Characteristics and Potential Use of a Novel Alginate/Zein Hydrogel as the Sorption Phase for Polar Organic Compounds". *Carbohydrate Polymers* 174: 507–16.

- Cauchard, J.; Taouji, S.; Sevin, C.; Duquesne, F.; Bernabe, M.; Laugier, C. y Ballet, J. 2006. "Immunogenicity of synthetic *Rhodococcus equi* virulence associated protein peptides in neonate foals". *International Journal of Medical Microbiology*. 296(6): 389-396.
- Collins, S.; Shandb, P. y Drewa, M. 2011. "Stabilization of linseed oil with vitamin E, butylated hydroxytoluene and lipid encapsulation affects fillet lipid composition and sensory characteristics when fed to rainbow trout". *Animal Feed Science and Technology*. 170(1-2): 53-62.
- Cruz-Monterrosa, R.G., J.E. Ramirez-Bribiesca, M.I. Guerrero-Legarreta, y R.A. Zinn. 2015. "Influence of Pectin on Intestinal Digestion of Chromogens in Steers". *Animal Feed Science and Technology*. 207: 274–77.
- Cubillos, C.; De la Torre, B.; Jakab, A.; Clementi, G.; Borrás, E.; Barcena, J.; Andreu, D.; Sobrino, F. y Blanco, E. 2008. "Enhanced mucosal immunoglobulin A response and solid protection against foot-and-mouth disease virus challenge induced by a novel dendrimeric peptide". *Journal of Virology*. 82(14): 7223-7230.
- De Araújo, N., Gutiérrez, L.A., Ruiz, O.S. y Montoya, O.I. 2015. "Técnicas para la Microencapsulación de Probióticos y el Impacto en su funcionalidad: Una Revisión". *Alimentos Hoy*. 23 (36): 112–126.
- Del Piano, M., Carmagnola, S., Ballarè, M., Sartori, M., Orsello, M., Balzarini, M, Pagliarulo, M., Tali, R., Anderloni, A., Strozzi, G.P., Mogna, L., Sforza, F. y Capurso, L. (2011). "Is Microencapsulation the Future of Probiotic Preparations? The Increased Efficacy of Gastro-Protected Probiotics". *Gut Microbes*. 2 (2): 120–23.

- Desai, K., y Jin, H. 2005. "Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients". *Drying Technology*. 23 (7): 1361–94.
- Erdman, W.J., C.G. Fahey y W.C. Broich. 1986. "Effects of purified dietary fiber sources on B-carotene utilization by the chick". *The Journal of Nutrition*. 116 (12): 2415-23.
- Farag, Y. y Leopold, C.S. 2011. "Development of Shellac-Coated Sustained Release Pellet Formulations". *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 42 (4): 400–405.
- Fattal, E.; Rojas, J.; Youssef, M.; Couvreur, P. y Andremont, A. 1991. "Liposomeentrapped ampicillin in the treatment of experimental murine listeriosis and salmonellosis". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 35(4): 770-772.
- Favaro-Trindade, C.S., Santana, A.S., Monterrey-Quintero, E.S., Trindade, M.A. y Netto, F.M. 2010. "The Use of Spray Drying Technology to Reduce Bitter Taste of Casein Hydrolysate". *Food Hydrocolloids* 24 (4): 336–40.
- Fernández, J., Salazar, J. A., Montoya, L., Jiménez, J. y Márquez, M. 2005. "Biotecnológicas de la microencapsulación". *Avance y perspectiva* 21: 24- 30.
- Florindo, H.; Pandit, S.; Goncalves, L.; Videira, M.; Alpar, O. y Almeida, A. 2009. "Antibody and cytokine-associated immune responses to *S. equi* antigens entrapped in PLA nanospheres". *Biomaterials*. 30(28): 5161-5169.
- Garrett, J.; Putnam, D.; Hill, T.; Aldrich, J. y Schlotterbeck, R. 2005. "Effect of level of encapsulated vitamin C in starters fed to Holstein calves". *Journal Dairy Science*. 88(1): 56-62.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A. y Saurel, R. 2007. "Applications of Spray-Drying in Microencapsulation of Food Ingredients: An Overview". *Food Research International*. 40 (9): 1107–21.

- Ghidoni, I.; Chlapanidas, T.; Bucco, M.; Crovato, F.; Marazzi, M.; Vigo, D.; Torre, M. y Faustini, M. 2008. "Alginate cell encapsulation: new advances in reproduction and cartilage regenerative medicine". *Cytotechnology*. 58(1), 49-56.
- Greenwood, D.; Dynon, K.; Kalkanidis, M.; Xiang, S., Plebanski, M. y Scheerlinck, J. 2008. "Vaccination against foot-and-mouth disease virus using peptides conjugated to nano-beads". *Vaccine*. 26(22): 2706-2713.
- Guevara, N.A. y Jiménez- Munguía, T. 2008. "Encapsulación: técnicas y aplicaciones en la industria alimentaria". Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Universidad de las Américas. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 2: 36-49.
- Hartwell, J.; Cecava, M. y Donkin, S. 2000. "Impact of dietary rumen undegradable protein and rumen protected-choline on intake, prepartum liver triacylglyceride, plasma metabolites and milk production transition dairy cows". *Journal Dairy Science*. 83(12): 2907-2917.
- Hiszczynska-Sawicka, E.; Oledzka, G.; Holec-Gasior, L.; Li, H.; Xu, J.; Sedcole, R.; Kur, J.; Bickerstaffe, R. y Stankiewicz, M. 2011. "Evaluation of immune responses in sheep induced by DNA immunization with genes encoding GRA1, GRA4, GRA6 and GRA7 antigens of *Toxoplasma gondii*". *Veterinary Parasitology*. 177(3-4); 281-289.
- Huertas, R. 2010. "Revisión: Microencapsulación de Alimentos." *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. 63 (2): 5669–5684.
- Huntington, G.; Harmon, D.; Kristensen, N.; Hanson, K. y Spears, J. 2006. "Effects of a slow-release urea source on absorption of ammonia and endogenous production of urea by cattle". *Animal Feed Science and Technology*. 130(3-4): 225-241.

- Islas, Ruth Pedroza. 2002. "Alimentos Microencapsulados: Particularidades de los Procesos para la Microencapsulación de Alimentos para Larvas de Especies Acuícolas". Consultado el 14 de junio de 2017. <http://nutricionacuicola.uanl.mx/numeros/6/A26.pdf>.
- Klei, T.; Torbert, B.; Chapman, M. y Turk, M. 1984. "Efficacy of ivermectin in injectable and oral paste formulations against eightweek-old *Strongylus vulgaris* larvae in ponies". *American Journal of Veterinary Research*. 45(1): 183-185.
- Kreeger, P.; Fernández, N.; Woodruff, T. y Shea, L. 2005. "Regulation of mouse follicle development by follicle-stimulating hormone in a three-dimensional in vitro culture system is dependent on follicle stage and dose". *Biology of Reproduction*. 73(5): 942-50.
- Krentz, K.; Nebel, R.; Canseco, R. y McGilliard, M. 1993. "In vitro and in vivo development of mouse morulae encapsulated in 2% sodium alginate or 0.1% poly-L-lysine". *Theriogenology*. 39(3): 655-667.
- Labuschagne, P.W., Naicker, B. y Kalombo, L. 2016. "Micronization, Characterization and in-Vitro Dissolution of Shellac from PGSS Supercritical CO₂ Technique". *International Journal of Pharmaceutics*. 499 (1-2): 205-16.
- Lancheros, R.J; Beleño, J. A.; Guerrero, C.A. y Godoy- Silva, R.D. 2014. "Producción de nanoparticulas de PGLA por el método de emulsion y evaporación para encapsular N-Acetilcisteina (NAC)". *Universitas Scientiarum*. 19 (2): 162-168.
- Li, W.; Watarai, S.; Iwasaki, T. y Kodama, H. 2004. "Suppression of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis excretion by intraocular vaccination with fimbriae proteins incorporated in liposomes". *Developmental & Comparative Immunology*. 28(1): 29-38.

- Limmatvapirat, S., Limmatvapirat, C., Luangtana-anan, M., Nunthanid, J., Oguchi, T., Tozuka, Y., Yamamoto, K. y Puttipipatkachorn, S. 2004. "Modification of Physicochemical and Mechanical Properties of Shellac by Partial Hydrolysis". *International Journal of Pharmaceutics*. 278 (1): 41–49.
- Lin, Sharon Chien-Yu, Yiwei Wang, David F. Wertheim, y Allan G.A. Coombes. 2017. "Production and in Vitro Evaluation of Macroporous, Cell-Encapsulating Alginate Fibres for Nerve Repair". *Materials Science and Engineering: C* 73: 653–64.
- Lu, J., Wang, H., Huang, J., Li, G., Wang, Q., Wei Xu, Yu Chen, Ke Zhang, y Jinhui Wang. 2014. "Sesquiterpene Acids from Shellac and Their Bioactivities Evaluation". *Fitoterapia* 97: 64–70.
- Lynn, R.; Hepler, D.; Kelch, W.; Bertone, J.; Smith, B. y Vatisstas, N. 2004. "Double blinded placebo-controlled clinical field trial to evaluate the safety and efficacy of topically applied 1% diclofenac liposomal cream for the relief of lameness in horses". *Veterinary Therapeutics*. 5(2): 128-138.
- MaCleod, D. y Prescott, J. 1988. "The use of liposomally-entrapped gentamicin in the treatment of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis". *Canadian Journal Veterinary Research*. 52(4): 445-450.
- Marchetti, M., Tossani, N. y Marchetti, S. 1995. "Vitamin degradation in premix as a function of the kind of trace-mineral present". *Zootecnia e Nutrizione Animale*. 21(2): 67-73.
- Marchetti, M.; Tossani, N.; Marchetti, S. y Bauce, G. 1999. "Stability of crystalline and coated vitamins during manufacture and storage of fish feeds". *Aquaculture Nutrition*. 5(2): 115-120.

- Mata, G.; Masters, D.; Buscall, D.; Street, K. y Schlink, A. 1995. "Responses in wool growth, liveweight, glutathione and amino acids, in Merino wethers fed increasing amounts of methionine protected from degradation in the rumen". *Australian Journal of Agricultural*. 46(6): 1189-1204.
- Morales, E., Rubilar, M., Burgos-Díaz, C., Acevedo, F., Penning, M. y Shene, C. 2017a. "Alginate/Shellac Beads Developed by External Gelation as a Highly Efficient Model System for Oil Encapsulation with Intestinal Delivery". *Food Hydrocolloids* 70: 321–28.
- Mosquera, M. I., Pérez, A. y Hornero, D. 2005. "Pigmentos carotenoides en frutas y vegetales; mucho más que simples 'colorantes' naturales". *Agro CSIC*, 3–7.
- Mowat, D. y Deelstra, K. 1972. "Encapsulated methionine supplement for growing finishing lambs". *Journal of Animal Science*. 34(2): 332-335.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S. y Bugarski, B. 2011. "An Overview of Encapsulation Technologies for Food Applications". *Procedia Food Science*. 1: 1806–15.
- Parker, R. (1996). "Absorption, metabolism and transport of carotenoids". *The FASEB Journal*. 10(5): 542-551.
- Pasin, B.L., González, C. y Maestro, A. 2012. "Historial de Publicaciones". *Revista venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 3 (1): 130–151.
- Pérez-Leonard, H., Bueno-García, G., Brizuela-Herrada, M., Tortoló-Cabañas, K. y Gastón-Peña, C. 2013. "Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos". *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*. 47 (1): 14–25.

- Perfield, J.; Lock, A.; Pfeiffer, A. y Bauman, D. 2004. "Effects of amideprotected and lipid-encapsulated conjugated linoleic acid supplements on milk fat synthesis". *Journal of Dairy Science*. 87(9): 3010-3016.
- Piepenbrink, M. y Overton, T. 2003. "Liver metabolism and production of cows fed increasing amounts of rumen-protected choline during the periparturient Period". *Journal of Dairy Science*. 86(5): 1722-1733.
- Poirier, V.; Thamm, D.; Kurzman, I.; Jeglum, K.; Chun, R.; Obradovich, J.; O'Brien, M.; Fred, R.; Phillips, B. y Vail, D. 2002. "Liposome encapsulated doxorubicin (Doxil) and doxorubicin in the treatment of vaccine-associated sarcoma in cats". *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 16(6): 726-731.
- Rayah, A. y Labavitch, J. 1977. "A simplified method for accurate determination of cell wall uronide content". *Journal of Food Biochemistry*. 361-365.
- Renau-Piqueras, J., y Faura, M. 1994. "Principios básicos del microscopio electrónico de barrido".
- Reyes, Luis Alberto. 2010. "Optimización y caracterización de la microencapsulación de la proteasa hemisférica refinada". Tesis de Maestría para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Bioprocesos. Instituto Politécnico Nacional.
- Rhein-Knudsen, N., Tutor, M., Ajallouei, F. y Meyer, A.S. 2017. "Characterization of Alginates from Ghanaian Brown Seaweeds: *Sargassum* Spp. and *Padina* Spp." *Food Hydrocolloids*. 71: 236-44.
- Rhys J. y Frank. B. (2015). "Review on shell materials used in the encapsulation of phase change materials for high temperature thermal energy storage". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 48: 79-87.

- Romero, Atmir. 2008. " Diseño y evaluación de nanopartículas de selenito de sodio para su uso en rumiantes". Tesis de Maestria para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.
- Röpke, T.; Oldenhof, H.; Leiding, C.; Sieme, H.; Bollwein, H. y Wolkers, W. 2011. "Liposomes for cryopreservation of bovinesperm". *Theriogenology*. 76(8): 1465-1472.
- Sacadura, F.; Robinson, P.; Evans, E. y Lordelo, M. 2008. "Effects of a ruminally protected B-vitamin supplement on milk yield and composition of lactating dairy cows". *Animal Feed Science and Technology*. 144: 111-124.
- Schell, D. y Beermann, C. 2014. "Fluidized Bed Microencapsulation of *Lactobacillus Reuteri* with Sweet Whey and Shellac for Improved Acid Resistance and in-Vitro Gastro-Intestinal Survival". *Food Research International* 62: 308–14.
- Shah, S.; Nagano, M.; Yamashita, Y. y Hishinuma, M. 2010. "Microencapsulation of canine sperm and its preservation at 4°C". *Theriogenology*. 73(5): 560-567.
- Silva, M.P., Tulini, F.L, Ribas, M.M, Pennin, M., Fávaro-Trindade, C.S y Poncelet, D. 2016. "Microcapsules Loaded with the Probiotic *Lactobacillus Paracasei* BGP-1 Produced by Co-Extrusion Technology Using Alginate/Shellac as Wall Material: Characterization and Evaluation of Drying Processes". *Food Research International*. 89: 582–90.
- Silva, M.P., Tulini, F.L., Martins, E., Penning, M., Fávaro-Trindade, C.S y Poncelet, D. 2018. "Comparison of Extrusion and Co-Extrusion Encapsulation Techniques to Protect *Lactobacillus Acidophilus* LA3 in Simulated Gastrointestinal Fluids". *LWT*. 89: 392–99.

- Smrdel, Polona. 2008. "The Influence of Selected Parameters on the Size and Shape of Alginate Beads Prepared by Ionotropic Gelation". *Scientia Pharmaceutica* .76 (1): 77–89.
- Soradech, S., Nunthanid, J., Limmatvapirat, S. y Luangtana-anan, M. 2012. "An Approach for the Enhancement of the Mechanical Properties and Film Coating Efficiency of Shellac by the Formation of Composite Films Based on Shellac and Gelatin". *Journal of Food Engineering*.108 (1): 94–102.
- Soto, L.; Frizzo, L.; Bertozzi, E.; Diaz, A.; Martí, L.; Dalla Santina, R.; Sequeira, G. y Rosmini, M. 2009. "Milk evaluation as growth and cold preservation medium of a probiotic inoculum for young calves". *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 8(7): 1353-1360.
- Stefanaki, Eleni-Chrysanthi. 2008. "Electron microscopy: the basics". *Physics of advanced materials winter school*. 1–11.
- Stummer, S.; Salar- Behzadi, S. y Unger, F. 2010. "Aplication of shellac for the development of probiotic formulations". *Food Research International*. 43(5): 1312-1320.
- Taylor-Edwards, C.; Hibbard, G.; Kitts, S.; McLeod, K.; Axe, D.; Vanzant, E.; Kristensen, N. y Harmon, D. 2009. "Effects of slow-release urea on ruminal digesta characteristics and growth performance in beef steers". *Journal Animal Science*. 87(1): 200-208.
- Tetsuro, Y., Takahashi, H. y Matsumoto, K. (2000). "Microencapsulation of L-lysine for improving the balance of amino acids in ruminants". *Journal-Faculty of Agriculture Kyushu University* 44: 359-366.

- Tetsuro, Y., Takahashi, H. y Matsumoto, K. 1999. "Microencapsulation of L-lysine for improving the balance of amino acids in ruminants". *Journal-Faculty Of Agriculture Kyushu University*. 44 (3/4): 359–366.
- Theuwissen, Elke, y Ronald P. Mensink. 2008. "Water-Soluble Dietary Fibers and Cardiovascular Disease". *Physiology & Behavior*. 94 (2): 285–92.
- Tsai, Alan C., Joel Elias, James J. Kelley, Ray-Shiang C. Lin, y John RK Robson. 1976. "Influence of certain dietary fibers on serum and tissue cholesterol levels in rats". *Journal of Nutrition*. 106: 118–123.
- Usui, T.; Konnai, S.; Tajima, S.; Watarai, S.; Aida, Y.; Ohashi, K. y Onuma, M. 2003. "Protective effects of vaccination with bovine leukemia virus (BLV) Tax DNA against BLV infection in sheep". *Journal of Veterinary Medical Science*. 65(11): 1201-1205.
- Valenzuela, C., Hernández, V., Rodríguez, F. y Carrillo, R. 2013. "Tecnología de encapsulación y su aplicación en ciencias veterinarias". *Avances en Ciencias Veterinarias* 28 (2): 58.
- Vandamme, K.; Melkebeek, V.; Cox, E.; Remon, J. y Vervaet, C. 2011. "Adjuvant effect of Gantrez®AN nanoparticles during oral vaccination of piglets against enterotoxigenic *Escherichia coli*". *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 139(2-4): 148-155.
- Vandenberg, G.; Scott, S.; Sarker, P.; Dallaire, V. y De la Noüe, J. 2011. "Encapsulation of microbial phytase: Effects on phosphorus bioavailability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)". *Animal Feed Science and Technology*. 169(3-4): 230-243.

- Villena, M.J., Morales, M.E., Gallardo, V. y Ruiz, M.A. 2009. "Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos". *Ars Pharmaceutica* .50 (1): 43–50.
- Wang, M.; Xu, Z.; Li, W. y Jiang, Z. 2009. "Effect of chromium nanocomposite supplementation on growth hormone pulsatile secretion and mRNA expression in finishing pigs". *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 93(4): 520-525.
- Wang, C.; Wang, M.; Ye, S.; Tao, W. y Du, Y. 2011. "Effects of copper-loaded chitosan nanoparticles on growth and immunity in broilers". *Poultry Science*. 90(10): 2223-2228.
- Weber, W.; Rimann, M.; Schafroth, T.; Witschi, U. y Fussenegger, M. 2006. "Design of high-throughput-compatible protocols for microencapsulation, cryopreservation and release of bovine spermatozoa". *Journal of Biotechnology*. 123(2): 155-163.
- Weiss, R.; Cox, N. y Martinez, M. 1993. "Evaluation of free or liposome encapsulated ribavirin for antiviral therapy of experimentally induced feline infectious peritonitis". *Research in Veterinary Science*. 55(2): 162-172.
- Wiese, S.; White, C.; Masters, D.; Milton, J. y Davidson, R. 2003. "The growth performance and carcass attributes of Merino and Poll Dorset x Merino lambs fed rumen-protected methionine (Smartamine-M)". *Australian Journal of Agricultural Research*. 54(5): 507-513.
- Xin, H.; Schaefer, D.; Liu, Q.; Axe, D. y Meng, Q. 2010. "Effects of polyurethane coated urea supplement on in vitro ruminal fermentation, ammonia release dynamics and lactating performance of Holstein dairy cows fed a steamflaked corn based diet". *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 23(4): 491-500.

- Yaguchi, K.; Ohgitani, T.; Noro, T.; Kaneshige, T. y Shimizu, Y. 2009. "Vaccination of chickens with liposomal inactivated avian pathogenic Escherichia coli (APEC) vaccine by eye drop or coarse spray administration". *Avian Diseases*. 53(2): 245-249.
- Yepez, José Luis. 2013. "Desarrollo de microencapsulados por SPRAY DRYING a partir de frutos de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth)". Tesis de Maestría para obtener el título de Maestría en Ciencias-Química. Universidad Nacional de Colombia.
- Yuan, L.; Geng, L.; Ge, L.; Yu, P.; Duan, X.; Chen, J. y Chang, Y. 2013. "Effect of iron liposomes on anemia of inflammation". *International Journal of Pharmaceutics*. 454(1): 82-89.
- Yumpu.com, 2014. "Coacervación compleja". Consultado el 16 de junio de 2017. <https://www.yumpu.com/es/document/view/14353938/microencapsulacion/15>.
- Zhang, W.; Yin, Z.; Liu, N.; Yang, T.; Wang, J.; Bu, Z. y Wu, D. 2010. "DNA chitosan nanoparticles improve DNA vaccine-elicited immunity against Newcastle disease virus through shuttling chicken interleukin-2 gene". *Journal of Microencapsulation*. 27(8): 693-702.