

Revisión de literatura en métodos de fabricación y caracterización de micro/nanopartículas para encapsulación de compuestos bioactivos usando quitosano como material encapsulante

Edwin David Valenzuela De León

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Noviembre, 2020

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Revisión de literatura en métodos de fabricación y caracterización de micro/nanopartículas para encapsulación de compuestos bioactivos usando quitosano como material encapsulante

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por:

Edwin David Valenzuela De León

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2020

Revisión de literatura en métodos de fabricación y caracterización de micro/nanopartículas para encapsulación de compuestos bioactivos usando quitosano como material

Edwin David Valenzuela De León

Resumen. La encapsulación es un proceso que involucra la incorporación de componentes de los alimentos, enzimas, compuestos bioactivos, vitaminas u otros materiales en pequeñas cápsulas. Las sustancias encapsuladas tienen protección contra los efectos ambientales adversos que tengan lugar durante el procesamiento o almacenamiento de estos (Temperatura, pH, luz, oxígeno, iones metálicos, enzimas, y exposición a la humedad). En esta revisión de literatura se definen algunos métodos, tales como nanoprecipitación, coacervación, deposición capa por capa y secado por aspersión, los cuales, son usados para formar dichas cápsulas usando el quitosano como el material de recubrimiento. De la misma forma, se definen algunos métodos para su caracterización física en aspectos como: tamaño de partícula, distribución de tamaño de partícula, forma de la partícula, estabilidad térmica y estabilidad coloidal. Para lograr la formación de las cápsulas a partir del quitosano, se requiere un material reticulante (anión), encargado de la formación de la red de moléculas que posteriormente formará parte de la cápsula. Se describen tres materiales reticulantes comúnmente usados para la formación de las cápsulas de quitosano, los cuales, son tripolifosfato de sodio, alginato de sodio y glutaraldehído. La técnica de encapsulación constituye una oportunidad para el desarrollo de una línea de investigación en Zamorano para el aprovechamiento de residuos mediante la extracción y posterior encapsulación de compuestos bioactivos presentes en cascaras, semillas, hojas y otros residuos derivados de la producción de alimentos.

Palabras clave: Aspersión, coacervación, coloidal, nanoprecipitación, reticulación, tripolifosfato.

Abstract. Encapsulation is a process that involves incorporating food components, enzymes, bioactive compounds, vitamins, or other materials into small capsules. Encapsulated substances are protected against adverse environmental effects that occur during processing or storage (Temperature, pH, light, oxygen, metal ions, enzymes, and exposure to moisture). In this literature review some methods were defined, such as nanoprecipitation, coacervation, layer-by-layer deposition, spray drying, and others, which are used to form those capsules, using chitosan as the coating material. In the same way, some methods were defined for its physical characterization in aspects such as particle size, particle size distribution, particle shape, thermal stability, and colloidal stability. To achieve the formation of capsules from chitosan, a crosslinking material (anion) is required, responsible for the formation of the network of molecules that will later form part of the capsule. In this literature review, three crosslinking materials commonly used for the formation of chitosan capsules are described, which are sodium tripolyphosphate, sodium alginate, and glutaraldehyde. The encapsulation techniques are an opportunity for the development of a line of research in Zamorano for the use of waste through the extraction and subsequent encapsulation of bioactive compounds present in peels, seeds, leaves, and other wastes derived from food production.

Key Words: Coacervation, colloidal, cross-linking, nanoprecipitation, spray, tripolyphosphate.

ÍNDICE GENERAL

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Índice General.....	iv
Índice de Cuadros y Figuras.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	5
4. CONCLUSIONES.....	49
5. RECOMENDACIONES.....	50
6. LITERATURA CITADA.....	51

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Comportamiento de la estabilidad coloidal en base al potencial zeta	36
2. Resumen de la técnica de nanoprecipitación empleada para la fabricación de partículas de quitosano y la encapsulación de compuestos bioactivos.....	44
3. Resumen de la técnica de coacervación compleja empleada para la fabricación de partículas de quitosano y la encapsulación de compuestos bioactivos.....	45
4. Resumen de la técnica de ensamblaje capa por capa empleada para la fabricación de partículas de quitosano y la encapsulación de compuestos bioactivos.....	46

Figuras	Página
1. Estructura química de la quitina (izquierda) y quitosano (derecha).....	5
2. Estructura conformacional del quitosano.....	6
3. Proceso de desacetilación de la quitina.....	7
4. Formación del complejo quitosano-tripolifosfato por reticulación ionotrópica.....	10
5. Estructura del complejo de quitosano-TPP reticulado.....	11
6. Esquema de formación de partículas de quitosano con STPP para encapsular linalool.....	11
7. Curva de liberación de la ASB encapsulado en nanocápsulas de quitosano/ tripolifosfato, en una solución de buffer fosfato salino.....	12
8. Estructura y esquema de la interacción quitosano-alginato.....	12
9. Esquema de preparación de nanopartículas de quitosano/alginato para encapsular insulina	13
10. Estructura cristalina (izquierda) y estructura amorfa (derecha) del silicio.....	14
11. Quitosano químicamente gelificado (reticulado) con glutaraldehído.....	15
12. Esquema del proceso de encapsulación de oleorresina de jengibre por medio del método de emulsión.....	15
13. Formación de nanopartículas mediante nanoprecipitación.....	17
14. Proceso de formación del coacervado.....	18
15. Proceso de formación de un coacervado complejo a partir de un polímero polianiónico y un polímero policatiónico.....	19
16. Potencial zeta de quitosano (▲) y alginato de sodio (●).....	20
17. Proceso de formación de partículas huecas por ensamblaje capa por capa.....	21
18. Diferentes métodos de formación de partículas basado en la técnica de ensamblaje capa por capa.....	22
19. (a) Esquema de formación de partículas de seis capas de dos polímeros usando microfluidos (b) y el recorrido de la partícula en los canales.....	23
20. Proceso de formación de nanopartículas multicapa por el método electroforético.....	24

Figuras	Página
21. Representación esquemática del sistema matriz, preparación de micropartículas núcleo pared mediante secado por aspersión boquilla de dos fluidos y boquilla de tres fluidos.. 255	
22. Representación esquemática del mecanismo de secado por aspersión.....	266
23. Representación del flujo de aire caliente cocorriente (o paralelo) (izquierda), contracorriente (centro) y mixto (derecha) en un secador por aspersión..... 277	
24. (a) Microcápsula única (microcápsula con un solo núcleo), (b) microcápsula con múltiples núcleos y (c) microcápsula de matriz.....	28
25. Ejemplos de diferentes formas de las partículas posibles en sistemas de encapsulación alimentaria.....	28
26. Esquema de formación de micropartículas in-situ por el método de secado por aspersión	29
27. Ilustración de las características de compuestos polifenólicos encapsulados por medio de secado por aspersión..... 299	
28. Imagen de microscopio óptico de una emulsión de quitosano/glicerol/aceite de oliva....	311
29. Imágenes CLSM de diferentes morfologías de microesferas de quitosano.....	322
30. Imagen de microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas de quitosano reticuladas con glutaraldehído.....	32
31. Imágenes SEM de microcápsulas de quitosano preparadas por el (a) proceso de emulsión de membrana y (b) el método de agitación mecánica..... 333	
32. Imagen de microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) de nanogeles de quitosano y sulfato dextrano..... 344	
33. Esquema gráfico de la influencia del nivel de carga eléctrica negativa en la distancia desde la superficie de la partícula con los protones y neutrones..... 355	
34. Diagrama de bloques de un instrumento de análisis térmico (TGA).....	377
35. Curvas (a) TGA y b) DTA de nanocompuestos de quitosano-plata.....	388
36. Sensor DSC Tzero™..... 400	
37. DSC de potencia compensada.....	41
38. Esquema del instrumento de calorimetría isoterma de titulación.....	422
39. Termograma ITC obtenido de la titulación de quitosano una solución de xantano.....	433

1. INTRODUCCIÓN

A través de la historia, la industria de alimentos ha intentado mejorar sus tecnologías para prolongar la vida útil de los alimentos o añadir nuevos ingredientes funcionales que mejoren las propiedades fisicoquímicas. Para el 2018, se estimó que habían más de 820 millones de personas en condiciones de hambruna en países subdesarrollados; la meta es lograr los objetivos de desarrollo sostenibles, entre ellos el hambre cero, para el año 2030 (FAO *et al.* 2019). El sector alimentario y la investigación científica tienen un gran reto para mantener las características nutricionales y sensoriales de los alimentos que se producen por el mayor tiempo posible, aprovechando al máximo los recursos. Una tecnología que puede ayudar en gran medida a lograr esta meta es la encapsulación.

La encapsulación ayuda a prolongar la vida útil de algunos compuestos o nutrientes de los alimentos. Ésta es usada para conservar componentes bioactivos, que pueden llegar a ser funcionales para nuestro cuerpo, pero que tienen una vida útil bastante corta y pueden ser muy sensibles a factores externos como la luz, presencia de oxígeno, etc. La encapsulación consiste en atrapar y proteger esos componentes en un material para protegerlos de las condiciones del ambiente (Nedovic *et al.* 2011). En otras palabras, encapsulación consiste en atrapar una sustancia (material a encapsular) en otra (material pared), formando pequeñas partículas (desde algunos nanómetros a algunos milímetros) (Poornima y Sinthiya 2017). Se estimó que, para octubre de 2013, 1600 productos de consumo estaban formulados en base a nanopartículas en el mercado, en comparación con 54 productos en 2005, y este no ha parado de crecer (Mansfield 2015).

Uno de los factores más importantes, desde el punto de vista económico para la industria, es el material pared o material para encapsulación. Es necesario determinar el material pared óptimo para el producto a encapsular, que cumpla con su función de protección pero que además sea rentable para la empresa. No se puede olvidar que el objetivo de una empresa es ser rentable y, dado que alrededor del 60% del costo de producción proviene del costo de los materiales y/o materias primas; entonces, si se logra optimizar el uso de estos, se puede reducir el costo total de producción (Amoako-Gyampah y Acquah 2008). Esta es una de las razones porque las grandes empresas dedican un buen porcentaje de sus utilidades a investigación y desarrollo.

Algunos materiales para encapsulación se crean a través de la reticulación de varias moléculas, las cuales pueden desarrollar una red capaz de atrapar el compuesto a encapsular. Los compuestos bioactivos tienen un impacto benéfico en la salud de quienes lo consumen y se ha demostrado que ayuda a la prevención del cáncer, enfermedades del corazón y otras enfermedades crónicas no transmisibles (Herrera *et al.* 2014). Los consumidores ya no buscan únicamente suplir las demandas calóricas, sino que son más objetivos y velan por su salud, por esa razón, uno de los enfoques de la industria es reducir el impacto negativo a la salud de sus consumidores (Đorđević *et al.* 2015).

Los compuestos bioactivos generalmente son muy sensibles a estímulos ambientales, causando que la industria busque la forma de mantener su estabilidad (por medio de encapsulación) y así mantener sus características funcionales durante su almacenamiento y en el cuerpo humano (Đorđević *et al.* 2015; Luna *et al.* 2016). La aplicación de compuestos bioactivos puros en la industria de alimentos resulta ser muy limitada, ya que estos generalmente tienen baja solubilidad, pobre biodisponibilidad y tienen rápida liberación, por lo cual, la encapsulación supone una solución a dichos problemas (Shishir *et al.* 2018).

Madalena *et al.* (2019), describen que los compuestos bioactivos deberían ser encapsulados ya que estos pueden ser sensibles a factores ambientales como: temperatura, pH, luz, oxígeno, iones metálicos, enzimas, y exposición al agua. La encapsulación permite la protección de compuestos bioactivos del estrés ambiental, mejora las funcionalidades fisicoquímicas y mejora sus actividades para promover la salud y contra las enfermedades (Shishir *et al.* 2018).

Se ha demostrado que la encapsulación de polifenoles y liposomas como resveratrol, la quercetina, la luteína, el β -caroteno, entre otros; mejoran su biodisponibilidad y absorción en el intestino delgado, por lo cual se necesita menos cantidad para obtener los mismos resultados, a comparación de estos compuestos no encapsulados (Ruiz *et al.* 2018; Song *et al.* 2014). Específicamente, en el uso de quitosano, Jeon *et al.* (2016) demostraron que el uso de este biopolímero como material encapsulante para compuestos bioactivos puede hacerlos hasta 4.2 veces más soluble que en su estado original, además de que previene su oxidación y, por lo tanto, alarga su vida útil.

Unos de los primeros compuestos usados para fines de encapsulación fueron los polisacáridos. Estos compuestos tienen características que los hacen idóneos para esta tarea (Szekalska *et al.* 2018) debido a que, no son tóxicos para la salud humana, están altamente disponibles en el mercado, sus precios son asequibles, fácil para descomponerse en el sistema digestivo humano y tienen propiedades quelantes, al usar agentes reticulantes (iones negativos multivalentes o aniones).

El quitosano constituye una opción viable para ser utilizado en encapsulación (por precio y disponibilidad), ya que es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza (en forma de quitina), solamente siendo superado por la celulosa. El quitosano es un polisacárido lineal compuesto de D-glucosamina (unidad desacetilada) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada) distribuida aleatoriamente y que puede polimerarse por medio de una formación de enlaces cruzados en la presencia de aniones y polianiones (Morales y Ruiz 2016). Casettari e Illum (2014), confirmaron que el quitosano está clasificado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés, en su regulación 21 C.F.R. 170.30) de EUA como una sustancia Generalmente Reconocida como Segura (GRAS, por sus siglas en inglés).

También se pueden usar algunas proteínas para encapsular, pero tomando en cuenta el precio, los polisacáridos son más utilizados debido a que son más estables, más baratos y están más disponibles en la mayoría de los mercados. El uso de quitosano como material pared para encapsulación de compuestos bioactivos se ha ilustrado en muchas publicaciones científicas en el área de ciencia de alimentos. Incluso, el quitosano es estudiado como un polímero prometedor para encapsular medicamentos, ya que sus propiedades medicinales (antimicrobianas, antioxidante, baja inmunogenicidad y mucoadhesiva) aumenta su potencial en diversas aplicaciones (Saikia y Gogoi 2014). Shishir *et al.* (2018), en su estudio concluyen que la microencapsulación y la nanoencapsulación constituye alternativas prometedoras para encapsulación, pero que se requieren

más estudios para mejorar los sistemas de encapsulado existentes y así mejorar su aplicación en la industria.

Los objetivos de esta revisión de literatura fueron:

- Recopilar información acerca de los métodos de formación de partículas existentes para encapsulación de compuestos bioactivos usando quitosano y exponer los métodos de caracterización de estas partículas o encapsulados.
- Recopilar información acerca del quitosano y su uso en la fabricación de micro y nanopartículas para encapsulación de compuestos bioactivos.
- Presentar los métodos de fabricación de las micro- y nanopartículas y las metodologías empleadas para su caracterización.
- Explicar las diversas aplicaciones de las nanopartículas fabricadas a partir de quitosano y potencial uso en Zamorano.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Criterios de búsqueda

Se seleccionaron los artículos relevantes a la temática de la formación de partícula de quitosano, y de la caracterización de las partículas de quitosano, con que vayan acorde a los objetivos de la revisión de literatura. Se utilizaron bases de datos confiables y de renombre para la búsqueda de información. Estas fueron principalmente: “Elsevier, Springer, ResearchGate, Science-Direct, NCBI, SciELO, Nature, Wiley Online Library y Royal Society of Chemistry”. Todo esto con el fin de obtener información fiel a la realidad, con base científica para la redacción de una revisión de literatura con valor científico.

Criterios de selección de artículos

Para determinar los artículos aptos para la inclusión en esta revisión de literatura, se tomaron en cuenta factores como: Año de publicación, base de dato fuente, relación con el tema en cuestión y con bases científicas. En cuanto al año de publicación, se optó por usar artículos en su mayoría, menores a 10 años de antigüedad, con el objetivo de tener información actual. En cuanto a la base de dato fuente del artículo, se optó porque sean de renombre, con peso en la comunidad y que tengan credibilidad científica para la redacción de un artículo con valor científico. Por último, se tomó en cuenta que el artículo esté relacionado directamente con el tema en cuestión de fabricación de partículas de quitosano o caracterización de partículas de quitosano para redactar la información pertinente a la revisión de literatura y lograr los objetivos planteados.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Métodos de fabricación de micro/nanopartículas de quitosano

Descripción del quitosano. Es un polisacárido no amiláceo policationico derivado de la desacetilación de la quitina (Figura 1). El quitosano está formado por unidades repetidas de 2-acetamido-2-deoxy- β (1, 4)-D-glucosa. En general, está formado por unidades desacetiladas (β -(1-4)-D-glucosamina) y unidades acetiladas (N-acetil-D-glucosamina) (Sudarshan *et al.* 1992; Tolaimate *et al.* 2000; Younes y Rinaudo, 2015).

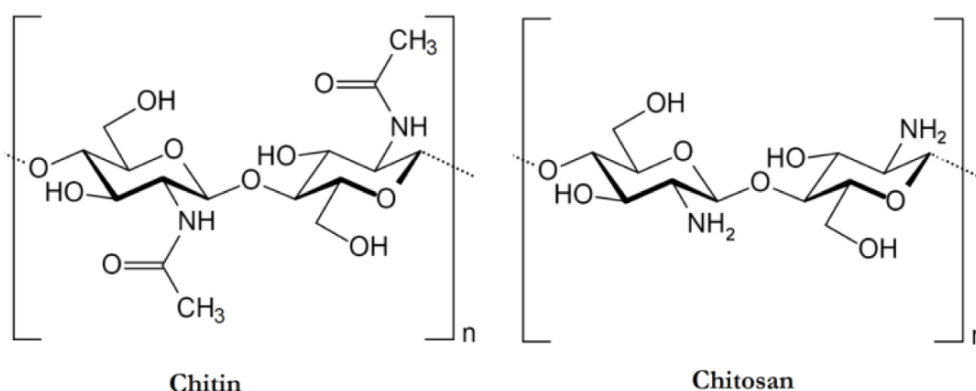


Figura 1. Estructura química de la quitina (izquierda) y quitosano (derecha).

Fuente: Younes y Rinaudo 2015.

Es importante mencionar que tanto el quitosano como la quitina no presentan una estructura homogénea, y sus propiedades dependen de la longitud de la cadena (peso molecular) y el nivel de N-acetilación. La diferencia general entre la quitina y el quitosano es que la quitina tiene un grado de acetilación de 70-95% (15-20.7% del total del contenido de acetilo); mientras que el quitosano tiene un grado de acetilación de 15-25% (3.2-5.3% del total del contenido de acetilo) (Escobar *et al.* 2014; Barra *et al.* 2012). El peso molecular de la quitina depende del proceso de extracción, ya que cuando se realiza la extracción con altas temperaturas y altas concentraciones de reactivos, se suele acortar la cadena y por ende el peso molecular (Tsaih y Chen, 2003).

Al realizar el proceso de desacetilación de la quitina, se disminuye el número de grupos amido (acetamida) y aumenta el número de grupos amino. Tomando en cuenta que la suma de estos dos grupos es el 100%, se determinó un concepto llamado grado de desacetilación (GD). La quitina tiene 60% o menos de GD, por lo que tiene un 40% o más de grupos amido; y para ser considerado quitosano debe tener más del 60% del GD, es decir, tiene menos de 40% de grupos amido. Esta diferencia hace que el quitosano (GD mayor de 60%) sea soluble en ácidos diluidos (Barra *et al.* 2012).

El quitosano, como una macromolécula, se puede clasificar en estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria. Al igual que las proteínas, la estructura primaria consiste en la secuencia de unidades acetiladas y desacetiladas. La estructura secundaria depende del grado de desacetilación, las modificaciones de la estructura y el tipo de disolvente utilizado. La estructura terciaria depende

de la temperatura del disolvente y su estructura cuaternaria depende de las interacciones intermoleculares y la concentración (Weinhold *et al.* 2009). Estas diferentes estructuras se muestran en la Figura 2.

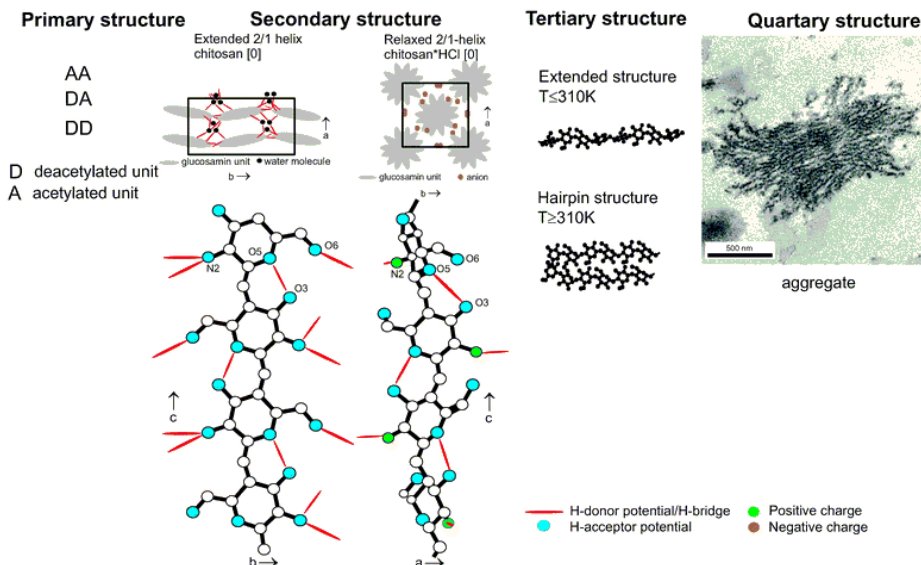


Figura 2. Estructura conformacional del quitosano.
 Fuente: Weinhold *et al.* 2009.

El quitosano es un polisacárido que tiene propiedades funcionales como: biodegradabilidad, biocompatibilidad, mucoadhesión, capacidad filmogénica, hemostático, promotor de absorción, actividad antimicrobiana, anticolesterolemica y antioxidante. Debido a estas propiedades es utilizado en agricultura, industria y medicina, de hecho, el quitosano es el único polímero catiónico soluble en agua disponible comercialmente (Barra *et al.* 2012; Călinoiu *et al.* 2019). Además, el quitosano ha sido usado como floculante para tratar el agua potable debido a que incrementa la velocidad de deposición y permite una mayor eficiencia en la reducción de DQO (Demanda Química de Oxígeno), iones metálicos y sólidos en suspensión; pero no es comúnmente usado por su alto costo (Kangama *et al.* 2018). Uno de los usos en la industria alimentaria es la de agente encapsulante (material pared). Los materiales utilizados para la encapsulación deben ser de grado alimenticio, biodegradables y deben formar una barrera entre la fase interna de la cápsula y sus alrededores (Nedovic *et al.* 2011). Todas las industrias que encapsulan deben obedecer las leyes de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria para Europa, la Administración de Alimentos y Medicamentos para EUA (Jafari 2017) u otra regulación regional o nacional.

Los polisacáridos son el material más utilizado para la encapsulación en el sector alimentario debido a su abundancia en la naturaleza, lo que los convierte en un material barato y disponible para usar (Wandrey *et al.* 2010). El quitosano constituye una de las alternativas más viables para encapsulación ya que, entre los polisacáridos, es el segundo más abundante en la naturaleza (en forma de quitina). La quitina es naturalmente encontrada en el exoesqueleto de crustáceos, insectos, algunos hongos y algas. La función que cumple en estos organismos, al igual que la celulosa en las plantas, es la de soporte y defensa (Elieh-Ali-Komi y Hamblin 2016). En comparación con la

celulosa, la quitina tiene una mayor tasa de recambio o regeneración en los organismos, es decir, se genera más quitina nueva en menos tiempo (Morganti *et al.* 2018).

En los últimos años, el quitosano ha captado la atención de la industria alimentaria debido a sus propiedades antimicrobiales y su potencial uso para encapsulación. Debido a sus propiedades fisicoquímicas, los estudios se han enfocado en la capacidad de reticulación iónica del quitosano. La reticulación iónica se produce cuando cadenas de polímeros se unen mediante interacciones no covalentes, la cual se presenta cuando se mezcla el quitosano con moléculas de cargas opuestas (Gulrez *et al.* 2011). Los iones de carga opuesta se atraen electrostáticamente entre ellos formando una matriz reticulada.

Proceso de desacetilación de la quitina. El quitosano se produce por la desacetilación de la quitina del exoesqueleto de los crustáceos (Morales y Ruiz 2016). La desacetilación de la quitina se realiza mediante la adición de soluciones alcalinas fuertes, como se muestra en la Figura 3. Sin embargo, también puede realizarse mediante enzimas, conocidas como de-N-acetilinas de quitina (CDAs). La desacetilación enzimática ofrece un proceso más controlado que produce oligómeros de quitosano definidos (Tsigos *et al.* 2000). Cuando la quitina se desacetila por encima del 60 - 70%, técnicamente se considera quitosano (Li *et al.* 1997). La distinción entre quitina y quitosano también se puede presentar sobre la base de su solubilidad en soluciones acuosas; donde el polímero insoluble se clasifica como quitina y el polímero soluble como quitosano (Weinhold *et al.* 2009). Sin embargo, este concepto no es completamente aplicable porque también dependerá de la fuente de quitina y su polimorfismo cristalino (Kurita *et al.* 1993).

El quitosano es parcialmente insoluble en agua pura (~ pH neutro), pero la adición de ácidos diluidos (por ejemplo, ácido acético) puede mejorar su solubilidad. El proceso de desacetilación permite la exposición de los grupos $-NH_2$ que pueden ser protonados en las soluciones de baja acidez. En este sentido, la magnitud de la carga positiva depende del grado de acetilación y su configuración molecular (Kienzle-Sterzer *et al.* 1982; Kurita *et al.* 1993; Weinhold *et al.* 2009).

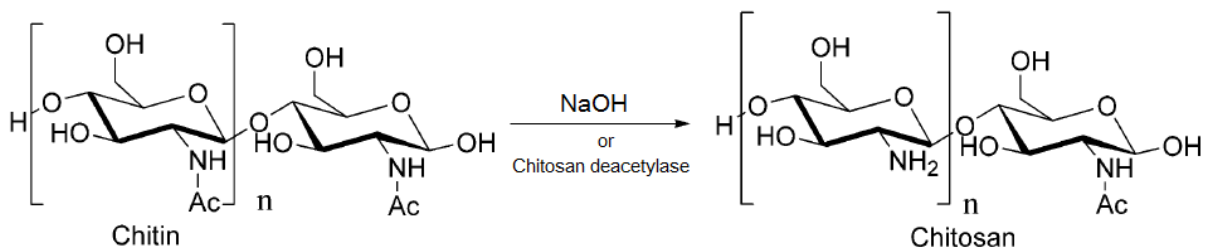


Figura 3. Proceso de desacetilación de la quitina.
Adaptado de: Rabea *et al.* 2003; Tsigos *et al.* 2000.

Concepto de encapsulación. La encapsulación es un proceso que involucra la incorporación de componentes de los alimentos, enzimas, células u otros materiales en pequeñas cápsulas (Gibbs *et al.* 1999). La encapsulación requiere de un material pared para funcionar, cuya función es ser la capsula donde se incorporará el compuesto a encapsular. El material pared puede formarse al reticular una sustancia para que funcione como cápsula. La reticulación es un proceso químico que nos permite crear una matriz para atrapar el compuesto a encapsular. Los agentes reticulantes son responsables de hacer el enlace o puente entre las moléculas para crear una red de unidades de los polímeros utilizados como material de pared. El núcleo se refiere a la sustancia a encapsular. El polímero utilizado para atrapar el núcleo puede denominarse revestimiento, membrana, carcasa, material de soporte, material pared, fase externa o matriz (Kailasapathy 2015).

Según Estevinho *et al* (2013), los aspectos a considerar para elegir un material pared incluyen:

- Compatibilidad con el núcleo y el reticulante.
- No debe reaccionar con el núcleo.
- Compatibilidad con el procesamiento.
- Económicamente rentable.
- Toxicidad (grado alimenticio, comestible).
- Producción de tamaño adecuado de partículas.
- Protección adecuada del núcleo.

La agregación de las partículas es un aspecto definitivo para determinar la formación y estabilidad de los encapsulados. En una solución hidrocólica, las partículas están sujetas a fuerzas que las hacen colisionar con otras; cuando esto ocurre, las partículas pueden separarse o permanecer agregadas, dependiendo de la magnitud y el alcance de las interacciones atractivas y repulsivas entre ellas. Estas tienden a permanecer agregadas cuando las fuerzas atractivas superan las repulsivas, estas fuerzas son principalmente van der Waals, atracción hidrofóbica, así como los efectos de puente (McClements 2015). Las principales fuerzas usadas para evitar la agregación son la repulsión electrostática y estérica, donde la electrostática tiende a aumentar cuando aumenta la carga en la superficie de la partícula y disminuye la carga del medio circundante. Por otro lado, la repulsión estérica aumenta al incrementar el espesor y la polaridad de la capa interfacial (Israelachvili 2011; McClements 2015).

Tahara *et al.* (2008) demostraron que las partículas recubiertas con quitosano reducen el estallido inicial de liberación de compuesto bioactivo y prolongan su liberación en etapas posteriores. Específicamente, Fotticchia *et al.* (2016) demostraron que la estabilidad (no agregación) de las gotas de emulsión recubiertas de lecitina, debido al procesamiento térmico, el ciclo de congelación-descongelación y el alto contenido de iones de calcio, se puede mejorar recubriéndolas con quitosano.

Es importante considerar las características de carga potenciales de un sistema de encapsulado; para determinar el mecanismo de encapsulación, máxima cantidad de compuesto bioactivo que se puede cargar y cuánto del compuesto bioactivo queda encapsulado; esto varía dependiendo de la naturaleza del compuesto bioactivo y del sistema de administración (McClements 2015). Como cada caso es diferente, se deben conocer diferentes términos relacionados a estas características y cómo se calculan estos. McClements (2015), establece los siguientes:

La capacidad de carga (LC, por sus siglas en inglés). Es la cantidad de ingrediente activo cargado por unidad de masa de partícula portadora. Con un rango de 0 a 100%, esta se calcula con la siguiente Ecuación 1.

$$LC = 100 \times mA/mP \quad [1]$$

Donde:

mA es la masa del ingrediente activo y mP es la masa de la partícula (ingrediente activo + material pared).

La eficiencia de encapsulación (EE, por sus siglas en inglés). Es el porcentaje de compuesto bioactivo agregado a un sistema que está realmente atrapado dentro del material pared. Con un rango de 0 a 100%, esta se calcula con la Ecuación 2.

$$EE = 100 \times mA,E/mA,T \quad [2]$$

Donde:

mA,E es la masa del compuesto bioactivo encapsulado y mA,T es la masa total del compuesto bioactivo en el sistema (encapsulado + no encapsulado).

La eficiencia de retención (RE, por sus siglas en inglés). Es el porcentaje de compuesto bioactivo inicialmente presente dentro del material pared que permanece dentro de este después de un período de almacenamiento o tratamiento específico. Con un rango de 0 a 100%, esta se calcula con la Ecuación 3.

$$RE = 100 \times mA,t/mA,0 \quad [3]$$

Donde:

mA,t es la masa del compuesto bioactivo encapsulado dentro de las partículas en el tiempo final y mA,0 igual pero en el tiempo 0 (inicio). El sistema ideal tendría alta capacidad de carga, alta eficiencia de encapsulación y alta eficiencia de retención.

Al momento de elegir un método de formación de partículas debemos tomar en cuenta factores como el requisito de tamaño de partícula, la estabilidad térmica y química de la molécula del compuesto bioactivo, la reproducibilidad de los perfiles cinéticos de liberación, la estabilidad del producto final y la toxicidad residual asociada con el producto final (Mitra y Dey 2011). Parra-Huertas (2011) clasificó los métodos de formación de partículas en: Procesos químicos y mecánicos. En esta sección, se desarrollarán métodos de ambas índoles. Dentro de los procesos químicos se encuentran: coacervación, reticulación iónica y nanoprecipitación; y dentro de los procesos mecánicos se enlistan: secado por aspersion, secado por sublimación (liofilización) y extrusión.

Procesos químicos

Reticulación. La reticulación del quitosano (el cual es un catión a pH 's ácidos) se logra al mezclarlo con un anión (ion de carga negativa). Para que el quitosano sea catiónico (carga negativa), es necesario disolverlo en una solución ácida acuosa, donde generalmente es usado ácido

acético (Mitra y Dey 2011; Rinaudo *et al.* 1999). Existe varios compuestos (aniones) que se pueden utilizar para el proceso de reticulación del quitosano, como son tripolifosfato, gelipina, aldehídos, ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, sulfato de sodio, entre otros (Naskar *et al.* 2018), a continuación, se describen algunos.

Quitosano reticulado con tripolifosfato de sodio (STPP, por sus siglas en inglés). El inductor de gelificación iónica más utilizado para el quitosano es el Tripolifosfato de Sodio (TPP), el cual cuenta con cinco grupos con carga negativa (Duarte *et al.* 2019). El tripolifosfato de sodio es una sal obtenida a partir de la unión de sodio con tripolifosfato (polisacárido). El pKa del quitosano es 6.5, lo que hace que tenga una carga ligeramente positiva a pH ácidos; a pH 6.4 o inferior el quitosano se encuentra en un estado protonado y altamente reactivo (Ramírez *et al.* 2016). Al unir el quitosano con STPP (Sustancias con Cargas Opuestas) se produce una atracción electrostática que forma una matriz reticulada iónicamente (hidrogel). Estos dos compuestos se usan ampliamente para la encapsulación en la industria alimentaria debido a su alta disponibilidad, su alta estabilidad a pH bajo y su biocompatibilidad (Giraldo *et al.* 2019). En las Figuras 4 y 5 se muestra cómo se realiza la reticulación entre las moléculas de STPP y quitosano:

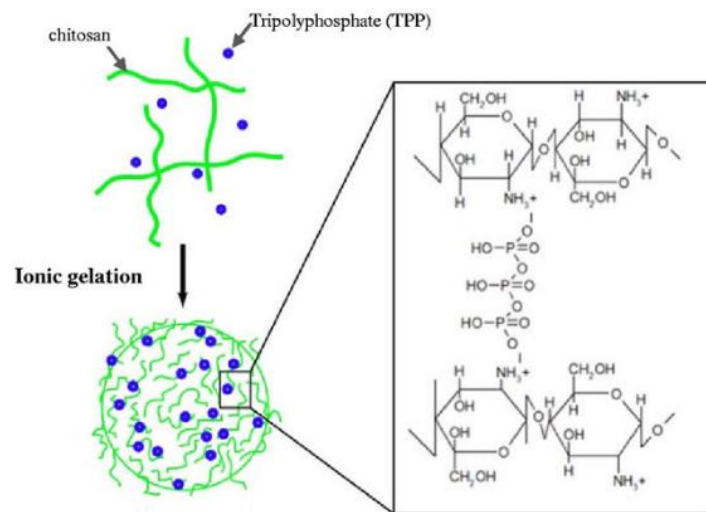


Figura 4. Formación del complejo quitosano-tripolifosfato por reticulación ionotrópica. Adaptado de: Chávez de Paz *et al.* 2011.

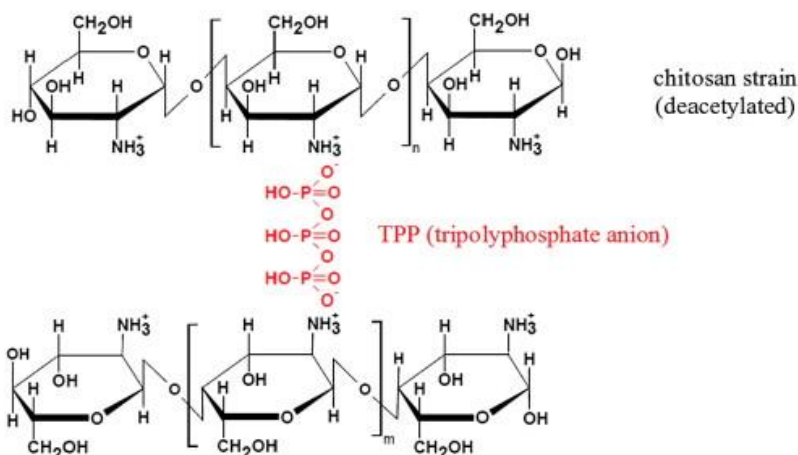


Figura 5. Estructura del complejo de quitosano-TPP reticulado.
Fuente: Kašpar *et al.* 2013.

Xiao *et al.* (2017), encapsularon linalool en cápsulas de quitosano reticulado con STPP, mediante gelación ionotrópica en emulsión, donde reportó nanocápsulas con superficies lisas, casi esféricas, tamaños medios de 352 nm y capacidad de carga de linalool de 15.17%. Como se puede apreciar en la Figura 6, el quitosano forma la pared externa de la capsula mientras que el STPP une las cadenas de quitosano, y como resultado, el linalool queda atrapado en la matriz.

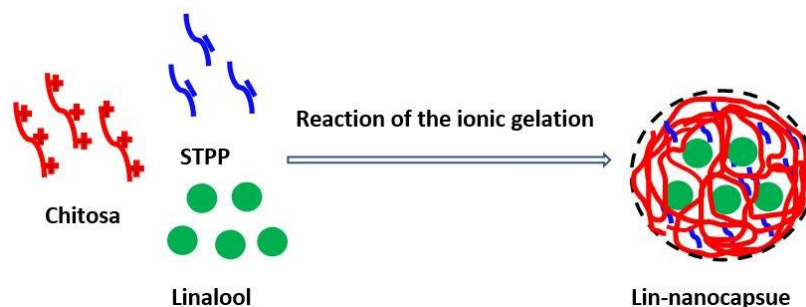


Figura 6. Esquema de formación de partículas de quitosano con STPP para encapsular linalool.
Fuente: Xiao *et al.* 2017.

Yang *et al.* (2009), reportaron el uso de quitosano reticulado con STPP para formar nanopartículas con el fin de encapsular albúmina de suero bovino (ASB). Se reportó homogeneidad en la dispersión y tamaño de partículas (400 nm), una máxima eficiencia de encapsulación de 79.74% y un tiempo retención, antes de liberar la ASB, de hasta una semana. En la Figura 7 se puede observar el progreso de liberación de la ASB encapsulado en nanocápsulas de quitosano/tripolifosfato, en una solución de buffer fosfato salino (pH = 7.2), en un lapso de tiempo de 0.5 a 8 días. En ese mismo estudio se determinó que, en estas condiciones, las cápsulas pueden proteger la ASB de su liberación completa hasta el día 8. Además, se estableció que el abrupto porcentaje de liberación en los 0.5 días se debe a la presencia, en la superficie porosa de la nanocápsula, de ASB.

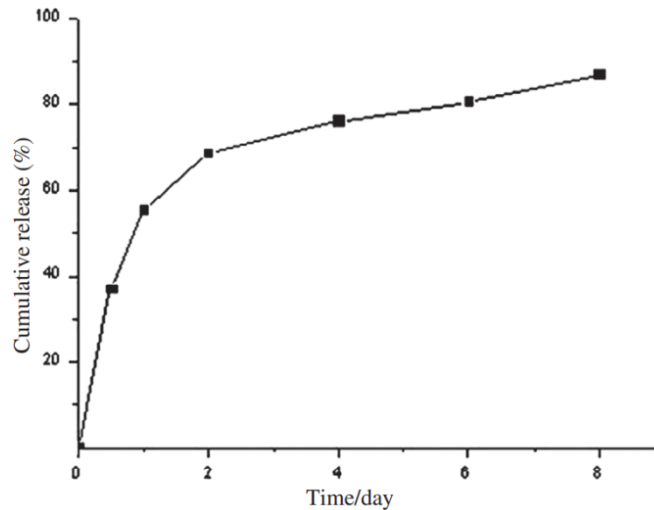


Figura 7. Curva de liberación de la ASB encapsulado en nanocápsulas de quitosano/tripolifosfato, en una solución de buffer fosfato salino (pH = 7.2), en un lapso de tiempo de 0.5 días a 8 días. Fuente: Yang *et al.* (2009)

Quitosano reticulado con alginato de sodio. Ahmed (2019) definió a los alginatos como polisacáridos aniónicos naturales que se encuentran principalmente en las algas pardas y cumplen una función estructural en estos. Estos se comercializan en forma de sales, en unión con calcio, magnesio o sodio; y tienen la capacidad de formar microgeles (desde 0.2 hasta 1000 μm) y nanogeles (menores a 0.2 μm). Parecido al quitosano, el alginato tiene propiedades de biodegradable, biocompatible, no tóxico, barato y accesible (Orive *et al.* 2005; Andersen *et al.* 2011). El quitosano puede formar una matriz polimérica con el alginato a través de su grupo amino protonado NH_3^+ y el grupo carboxilo COO^- del alginato (Figura 8) (Sukhodub *et al.* 2016).

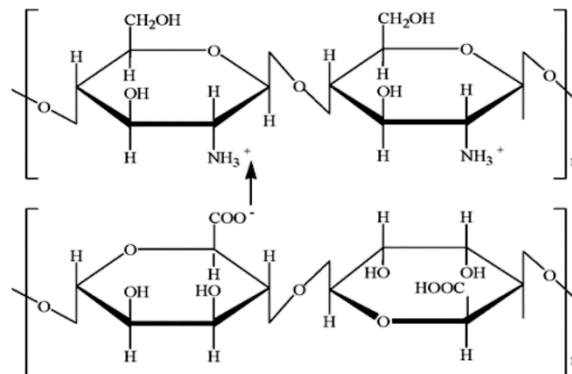


Figura 8. Estructura y esquema de la interacción quitosano-alginato. Fuente: Sukhodub *et al.* 2016.

Tanto el quitosano como el alginato son macromoléculas que se suelen utilizar en ingeniería de tejidos, pero cuando se usan en combinación forman complejos iónicos que mejoran sus propiedades mecánicas y se pueden utilizar en el campo industrial (Jose *et al.* 2019; Baysal *et al.*

2013). La combinación de ambos polisacáridos es posible ya que, el quitosano es catiónico (carga positiva, pero en pH 's ácidos) y el alginato aniónico (carga negativa). Lee *et al.* (2009) describieron la formación de partículas por gelación ionotrópica al agregar (gota a gota) una solución de alginato disuelto en agua destilada en otra solución de quitosano en agitación con ácido acético y cloruro de calcio.

En la Figura 9 se muestra un esquema de formación de nanopartículas de quitosano/alginato para encapsular insulina, donde se usó el ultrasonido (sonicación) para agitar la solución mientras se agregaba el quitosano y la insulina a la solución de alginato. Como se puede observar en dicha figura, la partícula está compuesta por la capa exterior (quitosano en color verde), una matriz interior (alginato en rojo) y el núcleo (insulina, estrellas azules atrapadas en el alginato). Otro factor que se debe tomar en cuenta es la temperatura de fusión para lograr el estado amorfo del polímero. La cristalinidad es el grado de orden estructural y regularidad en las disposiciones moleculares de un material, el cual influye en las propiedades como dureza, densidad, punto de fusión, transparencia y difusión (Shrivastava *et al.* 2018). Los sólidos amorfos son compuestos sin orden ni periodicidad de largo alcance (Vessal 1997).

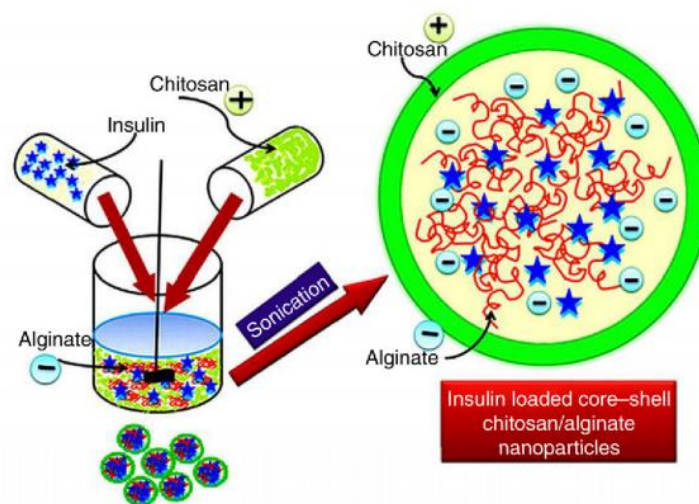


Figura 9. Esquema de preparación de nanopartículas de quitosano/alginato para encapsular insulina.

Fuente: Mukhopadhyay *et al.* 2015.

Un material amorfo tiene una estructura no cristalina que se diferencia de su líquido isoquímico, y no sufre la relajación estructural ni la transición vítrea cuando se calienta. En los materiales amorfos, los enlaces químicos de los átomos se encuentran en una red covalente aleatoria (Moreno *et al.* 2016). El quitosano se puede calentar hasta temperaturas por debajo de su temperatura de transición vítrea sin afectar sus propiedades fisicoquímicas. El tiempo de calentamiento necesario para disolver el quitosano en una solución ácida debe controlarse cuidadosamente, ya que el sobrecalentamiento puede causar la decoloración del polímero y puede inducir a un proceso de despolimerización, lo cual puede afectar sus propiedades reológicas y reducir su tasa de disolución (Szymańska y Winnicka 2015).

La temperatura de Transición Vítrea (T_g , por sus siglas en inglés) es la temperatura por debajo de la cual las propiedades físicas de los materiales cambian a las de un estado vítreo o cristalino. Por encima de la temperatura de transición vítrea se comportan como materiales gomosos (Ebnesajjad 2016). En la Figura 10 se puede observar una comparación entre la estructura cristalina y la estructura amorfa.

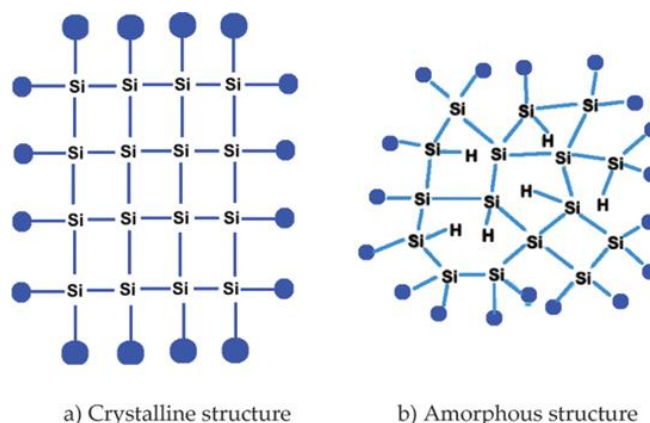


Figura 10. Estructura cristalina (izquierda) y estructura amorfa (derecha) del silicio.
Fuente: Moreno *et al.* 2016.

Xing *et al.* (2012) evaluaron la reticulación de quitosano con alginato de sodio, variando la concentración de este último en 1, 2, 3 y 4% (w/v), donde se demostró que, al aumentar la concentración del alginato, disminuye el tamaño de poros de la estructura formada (quitosano/alginato). Thai *et al.* (2020) formaron nanocápsulas de quitosano/alginato para encapsular lovastatina por medio de reticulación iónica, donde obtuvieron tamaños de partículas en el rango de 50 a 80 nm. Además, encontraron que estas nanopartículas presentaban una temperatura de fusión más alta que el quitosano y más baja que el alginato. Esta diferencia de temperatura fusión significa que ambos interactúan, y como resultado, se obtiene un mayor grado de cristalización a comparación de ambos compuestos individuales. Por último, los autores observaron que la liberación del compuesto bioactivo se llevó a cabo en dos etapas, una rápida o abrupta que ocurría en las primeras 10 horas, y una lenta y estable posterior a la primera etapa.

Quitosano reticulado con glutaraldehído. El glutaraldehído es un agente de reticulación homobifuncional que contiene un residuo aldehído en ambos extremos de una cadena de 5 carbonos y tiene la capacidad de reaccionar con proteínas y otras estructuras que contengan grupos aminos (Hermanson 2013). Sin embargo, el principal uso que se le ha dado a través del tiempo a este compuesto es como desinfectante, siendo usado típicamente en hospitales y clínicas como esterilizadores fríos para dispositivos médicos sensibles al calor (Aronson y Meyler 2016). El glutaraldehído tiene la capacidad de reticular con el quitosano, al ser un anión (ion negativo). La estructura de los enlaces covalentes cruzados que se forman entre el glutaraldehído y los grupos funcionales amino produce un conjugado quitosano-glutaraldehído, como se puede observar en la Figura 11 (Islam *et al.* 2019).

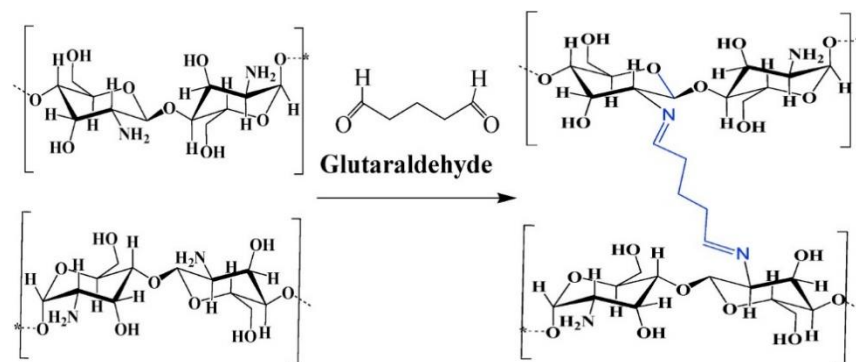


Figura 11. Quitosano químicamente gelificado (reticulado) con glutaraldehído. Fuente: Islam *et al.* 2019.

Para mejorar la eficiencia de formación de partículas de quitosano con glutaraldehído se puede añadir 0.5 M de NaOH a la solución acuosa de quitosano con ácido acético, lo que provoca un aumento del número de grupos aminos desprotonados en un 50%, y a pesar de eso mantiene la solución homogénea (Kildeeva *et al.* 2009). Se usa esa baja concentración de NaOH porque este, en altas concentraciones, puede causar la reticulación del quitosano. Gonçalves *et al.* (2005) reportaron el uso de silicato de magnesio en una solución de quitosano para evitar la agregación de las micropartículas. Poon *et al.* (2014) establecieron que la relación óptima para obtener la capacidad de sorción óptima entre glutaraldehído y quitosano es 4:1.

Monteiro y Airoidi (1999) demostraron que el grado de cristalinidad y el tamaño de partícula disminuyen a medida que se aumenta la cantidad de glutaraldehído. Jayanudin *et al.* (2019) encapsularon oleorresina de jengibre en quitosano reticulado con glutaraldehído por el método de emulsión. En dicho estudio, se mezcló la oleorresina con el quitosano en concentraciones de 1, 2, 3 y 4%, formando una emulsión aceite en agua (O/W); luego se añadió aceite de maíz para formar emulsión O/W/O. Seguido se añadió tolueno saturado con glutaraldehído (GST), y por último el glutaraldehído en solución al 25% para formar así las microcápsulas. Entre mayor fue la concentración de quitosano utilizada en el proceso, mayor fue el tamaño de partículas, el cual osciló entre 75 y 178 μm . En general, la eficiencia de encapsulación de estas partículas se encontró alrededor de 80% independientemente la concentración de quitosano. En la Figura 12 se ilustra el proceso de formación de partículas de este proceso.

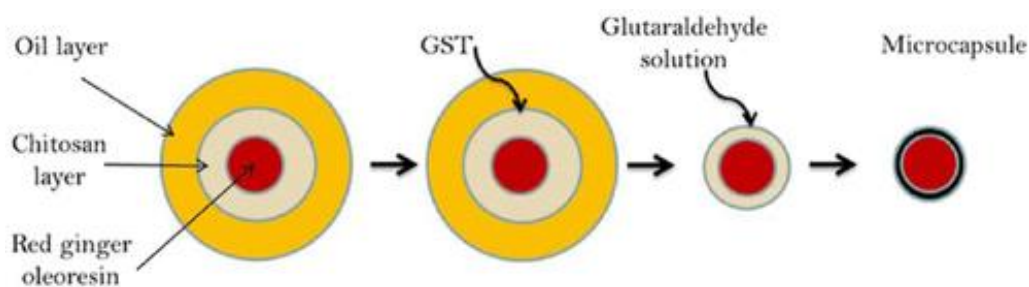


Figura 12. Esquema del proceso de encapsulación de oleorresina de jengibre por medio del método de emulsión.

Fuente: Jayanudin *et al.* 2019.

Nanoprecipitación. La nanoprecipitación, también denominado desplazamiento del solvente o deposición interfacial puede ser considerado como coacervación simple ya que usa un solo polímero. Como lo dice su nombre, esta técnica se basa en precipitación o en desplazar el solvente. Este proceso ocurre al añadir agentes no disolventes (con pobre capacidad de solubilizar) en una solución del polímero (quitosano). Los principales no disolventes utilizados son: etanol, acetona, hexano, cloruro de metileno o dioxano; mientras que el disolvente es agua (Turasan *et al.* 2020). Un estudio realizado en el 2015 establece que la formación de agregados de nanopartículas puede evitarse al añadir surfactantes (por ejemplo, lecitina) a la formulación (Miladi *et al.* 2015). Dependiendo de la o las sustancias no disolventes a utilizar y sus concentraciones, variarán aspectos como la eficiencia de formación de partículas y el tamaño de partículas (Turasan *et al.* 2020).

La nanoprecipitación es una técnica con buena reproducibilidad a escala industrial. Esta se divide en cuatro etapas: sobresaturación, nucleación, crecimiento por condensación y coagulación; esta última lleva a la solución a formar nanopartículas o agregados (Martínez-Rivas *et al.* 2017).

Sobresaturación. Esta fase ocurre cuando el existe más soluto disuelto en la solución que la establecida por el punto de equilibrio de saturación. Esto se logra al agregar el no disolvente en la solución, ya que este reduce la eficiencia del solvente original en el que está disuelto el polímero (quitosano), logrando así la sobresaturación. El nivel de sobresaturación afecta en el tamaño final de las nanopartículas, resultando en partículas más pequeñas al aumentar el nivel de sobresaturación. Se usa la Ecuación 4 para determinar sobresaturación.

$$S_r = C_s / C_\infty \quad [4]$$

Donde:

C_s es la proporción de partículas en la interfase (precipitadas) y C_∞ es la proporción aún solubilizada.

Nucleación. Seguido de la sobresaturación, llega la fase de nucleación, donde la solución busca lograr estabilidad termodinámica al alcanzar niveles críticos específicos de proporción solvente/no disolvente. Al superar la barrera energética (ΔG), empieza la formación de núcleos. Se usa la Ecuación 5 para determinar la barrera energética necesaria para iniciar la etapa de nucleación (Martínez-Rivas *et al.* 2017):

$$\Delta G = (16\pi\sigma^3v^3) / (3K^2T^2[\ln S_r]^2) \quad [5]$$

Donde:

σ es la tensión interfacial en la interfaz sólido-líquido, v es el volumen molar de soluto, K es la constante de Boltzmann y T es la temperatura (D'addio y Prud'homme, 2011). La tensión interfacial se define generalmente como la acumulación de energía y la fuerza de desequilibrio en la interfaz de dos fases diferentes, como líquido-sólido (Gholami y fakhari 2017)

La fluctuación en la concentración de la solución debido a la sobresaturación causa la formación de núcleos primarios, los cuales crecen debido a la asociación de solutos a ellos, hasta lograr alcanzar un tamaño crítico estable en la disolución. Esto sucede hasta lograr contrarrestar la sobresaturación de la solución. Se usa la Ecuación 6 para determinar la tasa de nucleación (N_r).

$$N_r = c \cdot \exp \left[-\frac{(16\pi \sigma^3 v^2)}{(3K^3 T^3 \{\ln S_r\}^2)} \right] \quad [6]$$

Donde:

c es una constante, exp es exponencial. La nucleación se detiene cuando la concentración es menor a la sobresaturación. A partir de ese punto, continúa el crecimiento por condensación o coagulación.

Crecimiento por condensación. La condensación se refiere a la adición de moléculas a la superficie del soluto. Esta se realiza en 2 etapas; en la primera etapa, el soluto por medio de difusión pasa a través de la capa límite de la solución adyacente para llegar a la superficie del núcleo, y en la segunda etapa de deposición, el soluto se integra a la matriz del núcleo. La condensación va disminuyendo debido a la coagulación (D'addio y Prud'homme, 2011).

Coagulación. La coagulación es la adhesión de partículas entre sí; la cual ocurre cuando las interacciones atractivas (van Der Waals, interacciones hidrofóbicas, etc.) son más fuertes que las interacciones repulsivas (repulsión estérica o electrostática), lo cual da origen a las nanopartículas. La frecuencia de colisión es el factor que rige la eficiencia de coagulación, y este depende de factores como concentración de partículas, tamaño y su movimiento (Martínez-Rivas *et al.* 2017). Para proteger las partículas de la coagulación se pueden usar agentes estabilizadores, los cuales pueden ser absorbidos por la superficie de las nanopartículas y crear una fuerza repulsiva en estos, evitando así la aglomeración de partículas (Joye y McClements 2013). En la Figura 13 se puede observar un esquema de formación de partículas mediante nanoprecipitación.

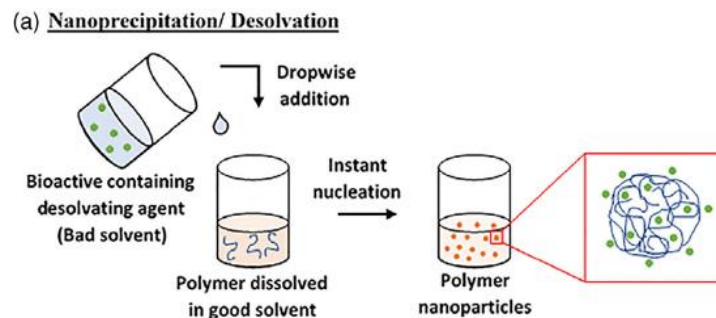


Figura 13. Formación de nanopartículas mediante nanoprecipitación.

Fuente: Turasan *et al.* 2020.

Luque-Alcaraz *et al.* (2016), realizaron un estudio donde demostró que el tamaño de partícula de quitosano al ser nanoprecipitado es menor a medida se reduce la concentración del quitosano o al incrementarse la relación agente no disolvente:solvente. En ese mismo estudio se reportó que al usar metanol, en lugar de agua, se incrementa el tamaño de partícula. Por otro lado, adiciones reducidas de Tween-80 a la fase no solvente disminuye en promedio el tamaño de partícula y aumenta su homogeneidad.

Las ventajas del uso de nanoprecipitación, comparado con otras técnicas de formación de partículas son: simplicidad, facilidad de escalabilidad, buena reproducibilidad, se evitan grandes cantidades

de disolventes tóxicos, obtención de tamaños de partícula submicrónicos con distribución de tamaño estrecha, y sin necesidad de usar alto aporte de energía (Miladi *et al.* 2016).

Schubert *et al.* (2011), describieron que, además de ser un proceso suave, sensible y con bajo requisitos de energía o implementos, en contraste con métodos como emulsión, la nanoprecipitación no requiere usar surfactantes para cambiar la tensión superficial, los cuales pueden llegar a tener efectos tóxicos para quienes los consumen. Además de disolventes orgánicos volátiles (como los usados en emulsión), se pueden usar no volátiles. Hay que tomar en cuenta que los compuestos bioactivos con similar polaridad al material pared son pobremente incorporados a la matriz del polímero o nanopartícula, por lo que se recomienda encapsular compuestos no polares con nanoprecipitación.

Coacervación compleja. Según Jana y Jana (2017), la coacervación es una interacción electrostática entre dos medios acuosos en los que la transición de líquido a gel (es decir, reticulación iónica) se produce en condiciones normales. La coacervación, es un método químico usado para formar gotas de un polímero en suspensión por medio de la separación de dos fases líquidas, las cuales son la fase coloidal concentrada (coacervado) y la fase coloidal diluida (Piacentini 2016). Estas dos fases líquidas son inmiscibles, pero termodinámicamente compatibles; y la fase concentrada (coacervado) está estructuralmente entre las fases cristalina y líquida, la cual puede denominarse mesofase (Rawat y Bohidar 2014). En la Figura 14 se puede observar el proceso de formación de los coacervados.

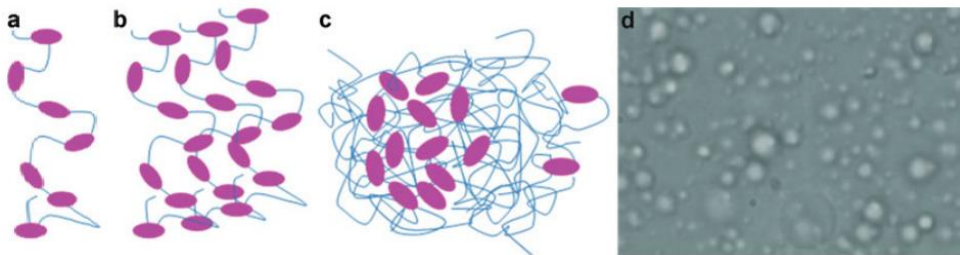


Figura 14. Proceso de formación del coacervado; a) Complejo intrapolimérico; b) agregado soluble de complejos intrapoliméricos; c) coacervado con dominios densos y diluidos; d) Imagen del coacervado.

Fuente: Piacentini 2016.

Según Aloys *et al.* (2016), existen dos tipos de coacervación, la simple y la compleja, donde la simple tiene ventaja referente a costos y a flexibilidad del proceso en comparación a la compleja. La coacervación compleja produce partículas insolubles en agua y con una excelente liberación controlada del bioactivo.

Según Luzzi y Gerraugthy (1964), la coacervación simple se ocupa de sistemas que contienen solo un soluto coloidal (p. Ej., solo gelatina), mientras que la coacervación compleja se ocupa de sistemas que contienen más de un soluto (p. Ej., Gelatina y goma arábica). Gu *et al.* (2010), encapsularon mediante coacervación simple y compleja feromonas sexuales de insectos donde se demostró que la encapsulación con coacervación compleja fue mayor que la simple debido a un

aumento de reticulación del material pared. También, se demostró que la coacervación simple tiene un menor tiempo de liberación controlada a comparación de la coacervación compleja, lo que se traduciría en menor vida útil (Gu *et al.* 2010).

La separación de fases del o de los polielectrolitos de una solución y la deposición de las partículas coloidales aglomeradas (material pared) en un núcleo activo inmiscible da como resultado la formación de un coacervado simple o complejo, respectivamente (Piacentini 2016). En la Figura 15 se puede observar una representación esquemática de la formación de un coacervado complejo a partir de un polímero polianiónico (por ejemplo, el alginato) y un polímero policatiónico (como el quitosano). Se puede observar que, en el coacervado final, la capa exterior está formada por el polímero policatiónico (quitosano) y el interior está reticulado o unido por medio del polímero polianiónico.

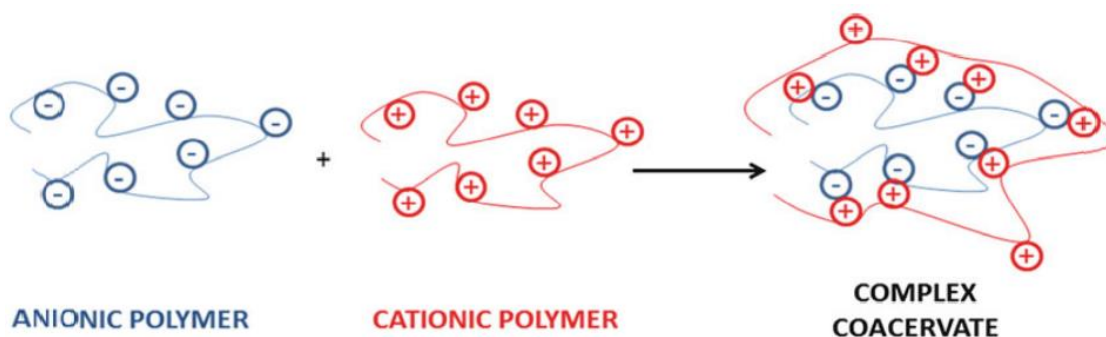


Figura 15. Proceso de formación de un coacervado complejo a partir de un polímero polianiónico y un polímero policatiónico.

Fuente: Piacentini 2016.

La coacervación permite la formación de nanopartículas al mezclar dos polímeros electrolitos con cargas opuestas. Dependiendo del punto isoeléctrico (PI) de los polímeros, donde la carga neta en el polímero es igual a cero, y lejos del PI, las fuerzas de atracción y repulsión entre los polímeros se pueden ajustar para variar las propiedades de las partículas (Turasan *et al.* 2020). La homogeneidad molecular y tamaño del polímero utilizado, viscosidad del solvente, tasa de flujo de agregación de una solución a otra y el tamaño de las partículas formadas va a depender de factores como: peso, y concentración de ambas soluciones (Dubey *et al.* 2016; Kašpar *et al.* 2013). Para una compatibilidad óptima entre dos sustancias para coacervar, estas deben tener carga similares y contrarias de potencial zeta. En la Figura 16 se puede corroborar que a pH 4, quitosano y alginato de sodio son sustancias ideales para coacervación, ya que ambos biopolímeros a ese pH tienen un potencial zeta alrededor de 30 y -30 mV, respectivamente (Yilmaz *et al.* 2019).

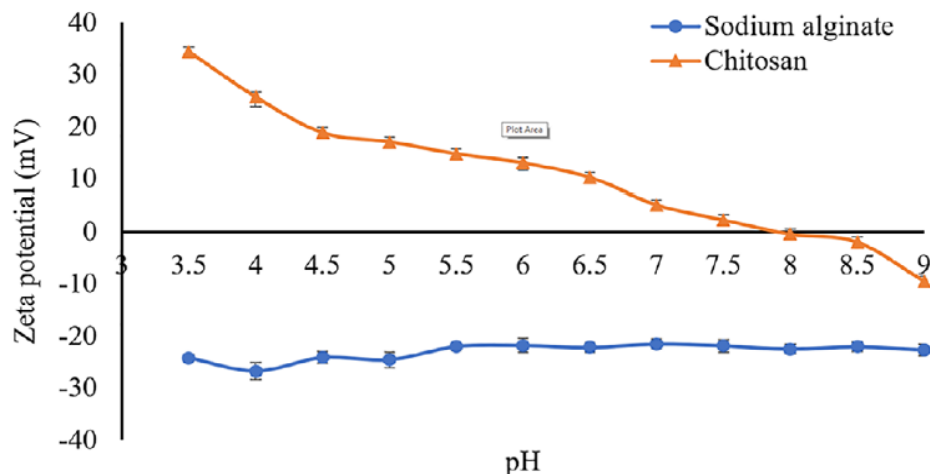


Figura 16. Potencial zeta de quitosano (▲) y alginato de sodio (●).
Fuente: Yilmaz *et al.* 2019.

La capacidad de interacción entre los polímeros y la naturaleza del complejo a formar va a depender de factores como pH, concentración, fuerza iónica, tipo de biopolímero, y proporción de estos biopolímeros (Bayraktar *et al.* 2017). Según Fang y Bhandari (2010), la eficiencia de la nanoencapsulación de los coacervados se incrementa con el aumento de las cargas superficiales. Al usar la técnica de coacervación, se pueden obtener nanopartículas que van desde 100 a 600 nm. Se recomienda el uso de quitosano con alginato para la formación de partículas por medio de coacervación debido a que el quitosano es de fácil solubilidad a pH bajos, mientras que el alginato es insoluble en esas mismas condiciones (Bayraktar *et al.* 2017).

Ensamblaje capa por capa (LbL, por sus siglas en inglés). Ensamblaje capa por capa (también llamado ensamblaje electrostático), es una técnica que permite la formación de estructuras en el rango de nanómetros con mucha precisión. Esta técnica ha sido utilizada tanto para la formación de estructuras planas como estructuras coloidales con diferentes aplicaciones, una de ellas la formación de nanopartículas (McShane y Lvov 2014). El ensamblaje capa por capa generalmente es impulsado por atracción electrostática, es decir, adsorción alternativa de materiales de cargas opuestas sobre el sustrato basados en la neutralización de cargas y resaturación (Liu *et al.* 2009). Las partículas multicapas suelen ser formadas a través de la deposición secuencial de materiales, por interacciones complementarias en una plantilla, es decir, mezclar y separar plantillas alternativamente (Yan *et al.* 2013).

Las plantillas pueden ser partículas usadas como molde para la formación de partículas multicapa. En algunas ocasiones, la partícula núcleo (plantilla) es disuelta o destruida, lo cual permite obtener cápsulas multicapa huecas (Slika y Patra 2019). La destrucción del núcleo (plantilla) se realiza después del proceso de formación de la partícula multicapa y se lleva a cabo por medio de descomposición térmica o por disolución química. Estas partículas huecas pueden ser deshidratadas y comercializadas en polvo para sus diferentes usos (Fuji *et al.* 2013). Según Eslamian y Ashgriz (2011), se usan dos tipos de secado, secado por aspersión y liofilización.

En la Figura 17 se puede observar el proceso de formación de una capsula hueca multicapa, usando una nanopartícula de sílice como plantilla (330 nm de diámetro) y, quitosano (catión) y sulfato

dextrano (anión) como materiales pared. En este tipo de partículas, la plantilla se elimina por el método químico utilizando ácido fluorhídrico (HF) para disolver la sílice (Itoh *et al.* 2004).

A pesar de que se elimina la sílice de las cápsulas finales, se debe tomar en cuenta que pueden quedar pequeñas cantidades de este en las cápsulas finales, por lo que se debe considerar su toxicidad. Yang *et al.* (2014) en su estudio sobre la sílice, concluyen que la sílice no es tóxica y puede ser utilizada como aditivo alimentario seguro para la formación de nanopartículas, pero se requieren más estudios a futuro para determinar su efecto a largo plazo.

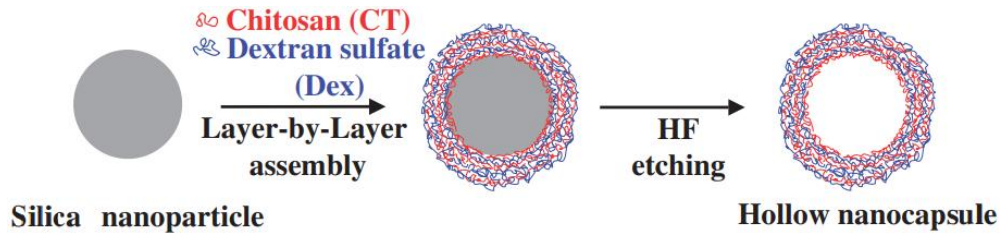


Figura 17. Proceso de formación de partículas huecas por ensamblaje capa por capa.

Fuente: Itoh *et al.* 2004.

El ensamblaje capa por capa permite el uso de partículas de varios tipos, tamaños, y formas como plantillas. Debido a esta versatilidad, se pueden utilizar un conjunto de polímeros con diferentes propiedades (funcionalidad, capacidad de respuesta y degradabilidad) para la formación de partículas multicapas con diferentes fines (Richardson *et al.* 2013). Se han realizado estudios para conseguir usar la propia sustancia a encapsular como plantilla, evitando así el uso de plantillas que posteriormente se deberán eliminar (Fuji *et al.* 2013). Es muy importante seleccionar una buena plantilla, adecuada para el proceso, porque esta tendrá mucho impacto en la calidad y eficiencia de la producción de la capsula hueca.

El ensamblaje capa por capa supone una ventaja ante otros métodos de formación de partículas, ya que debido a su simplicidad y bajo costo; estas pueden formarse simplemente usando un vaso de precipitado y unas pinzas, usados para sumergir el sustrato en la solución con los componentes objetivo (Ariga *et al.* 2019). Generalmente se usa centrifugación para el ensamblaje capa por capa, el cual requiere numerosos pasos de centrifugado y enjuague para separar el material de revestimiento y las partículas formadas, sin embargo, existen otros métodos para este fin, como técnicas de atomización y membranas de filtrado, sin embargo, estos métodos reducen la diversidad de los tipos de partículas y polímeros a emplear (Richardson *et al.* 2013; Correa *et al.* 2016; Liu *et al.* 2019). En la Figura 18 se pueden observar 3 métodos comúnmente empleados para llevar a cabo la formación de partículas mediante ensamblaje capa por capa.

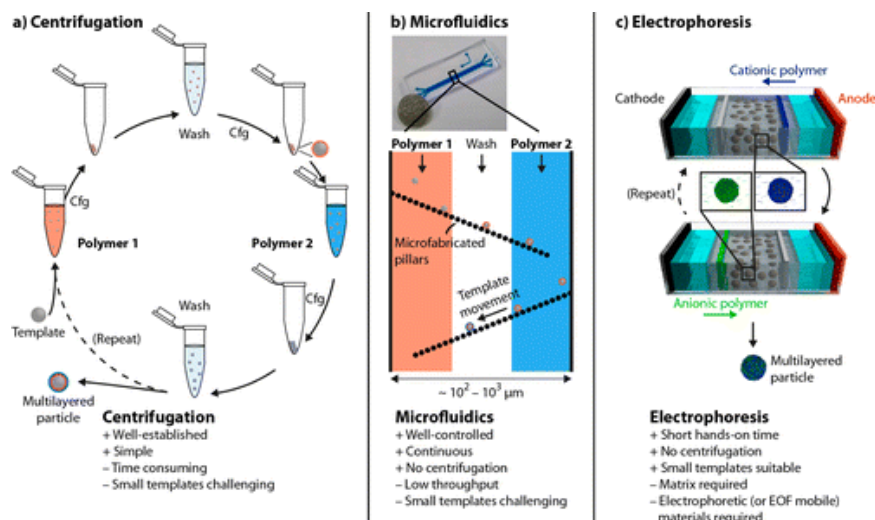


Figura 18. Diferentes métodos de formación de partículas basado en la técnica de ensamblaje capa por capa; a) Centrifugación; b) Microfluidos; c) Electroforesis.

Fuente: Yan *et al.* 2013.

Centrifugación. La centrifugación es un proceso rápido y robusto que facilita la formación de partículas multicapa. Para ello, se realizan varios lavados o deposiciones de diferentes polímeros sobre una plantilla o molde, lo cual permite el desarrollo de una partícula multicapa. Para separar las partículas con el polímero absorbido del polímero libre (sedimentación) se emplea la centrifugación (South *et al.* 2009; Yan *et al.* 2013). Según South *et al.* (2009), el uso de la centrifugación para el ensamblaje capa por capa permite un alto grado de uniformidad y cobertura del sustrato (partículas). Yan *et al.* (2013), reportó que este es un método bien establecido, robusto y es simple, pero como desventaja requiere de mucho tiempo, dependiendo de las capas que se necesitan y que, plantillas menores a 100 nm son muy difíciles de formar debido a que se pueden formar agregados.

Microfluidos. Los microfluidos se refieren a una ciencia y tecnología de sistemas que procesa o manipula pequeñas cantidades de fluidos (10^{-9} a 10^{-18} litros), usando canales que miden desde 10 hasta varios micrómetros (Farré *et al.* 2012). Kantak *et al.* (2011) realizaron un estudio donde formaron partículas usando microfluidos; en este estudio se usaron gotas de aceite que atravesaron suavemente una fila de micropilares y viajaron a través de tres micro canales que consistían en dos polímeros (a los extremos) y una solución de lavado en el centro. De esta forma, se logró formar partículas de seis capas formada por los dos polímeros colocadas intercaladamente sobre este (Figura 19).

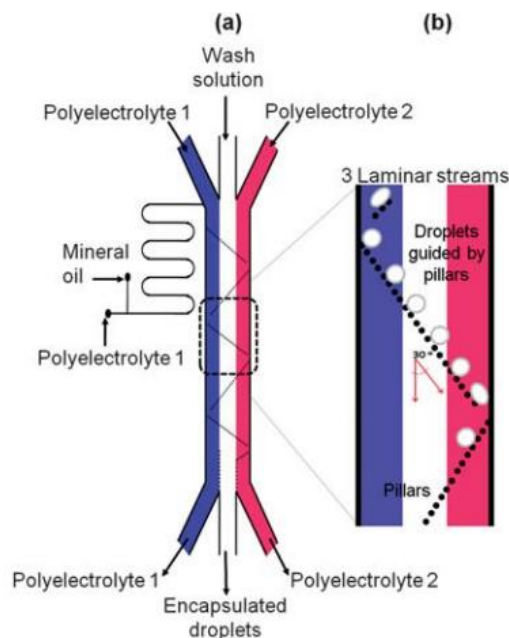


Figura 19. (a) Esquema de formación de partículas de seis capas de dos polímeros usando microfluidos (b) y el recorrido de la partícula en los canales.

Fuente: Kantak *et al.* 2011.

En este proceso la plantilla fue el aceite mineral, el cual, posterior a la formación y secado de la partícula de 6 capas, esta fue colocada en metil ter-butil éter por 24 horas para extraerlo y obtener la cápsula hueca a la cual se le puede dar diferentes usos (Kantak *et al.* 2011). La fabricación de micro o nanopartículas por microfluidos es un proceso continuo, el cual permite manejar de manera eficiente el factor tiempo, en comparación con centrifugación. Con esta metodología se requieren pequeñas cantidades de material para trabajar (que puede ser desventaja si queremos mucho volumen, pero ventaja si estamos haciendo investigación usando este método) (Yan *et al.* 2013).

Electroforesis. La electroforesis es un término general que explica la migración y separación de partículas cargadas (iones) bajo la influencia de un campo eléctrico; este está compuesto por dos electrodos de carga opuesta (ánodo y cátodo) conectados por un medio conductor (electrolito) (Fritsch y Krause 2003). La electroforesis capilar (CE, por sus siglas en inglés) es conocida como una excelente herramienta de separación analítica debido a su alta resolución, alta eficiencia, volumen mínimo de la muestra y facilidad de automatización (Liu *et al.* 2009).

Richardson *et al.* (2013) utilizaron este método para formar partículas y el proceso que siguieron fue el siguiente: colocar e inmovilizar las plantillas en el medio conductor (gel de agarosa), inyectar los polielectrolitos y dejar que estos pasen a través del gel. Los polielectrolitos se inyectan varias veces y en ambos lados de la electroforesis respectivamente (por ciclos, para formar varias capas). Posteriormente se calienta la agarosa para así recuperar las partículas multicapa formadas. De esta forma se generaron partículas estables, con tamaños alrededor de 35 nm, algo muy difícil de lograr por medio de centrifugación, ya que se pueden formar agregados (Richardson *et al.* 2013). En la Figura 20 se representa el proceso de formación de partículas por el método electroforético, donde:

- 1) Se coloca el polímero catiónico cercano al ánodo para la electroforesis, y mientras se mueve al

cátodo, va recubriendo la plantilla; 2) Se coloca el anión cercano al cátodo para la electroforesis, mientras se mueve al ánodo recubre la plantilla y el polímero catiónico sobre este. Se repiten los pasos 1 y 2 hasta obtener la cantidad de capas que se requiera; 3) Se calienta el medio agarosa para poder extraer y recuperar las partículas formadas.

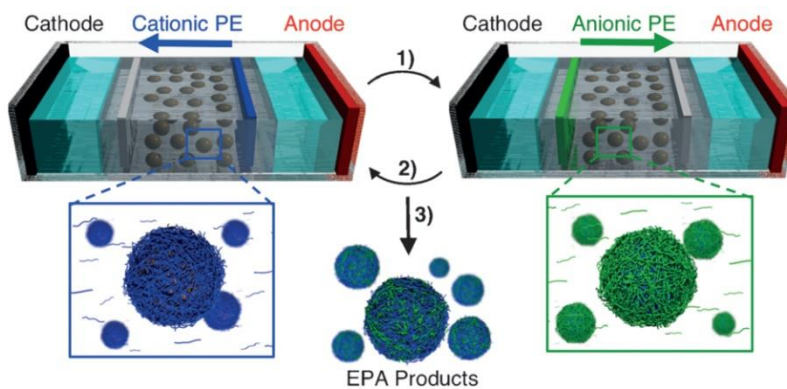


Figura 20. Proceso de formación de nanopartículas multicapa por el método electroforético (plantillas en el centro).

Fuente: Richardson *et al.* 2013.

Esta técnica tiene las ventajas como: corto tiempo de trabajo, facilidad para automatización y generación de pequeñas partículas; pero se debe tomar en cuenta que esta técnica requiere una matriz inmovilizadora porosa soluble (en el ejemplo, gel de agarosa) y que los materiales a usar se puedan mover a través de dicha matriz por electroforesis (Yan *et al.* 2014).

Procesos mecánicos

Existen varios métodos mecánicos usados para formar y/o secar las micro y nanopartículas, los principales son: secado por aspersión, enfriamiento por aspersión, lecho fluidizado, co-cristalización, liofilización y extrusión (Parra-Huertas 2011; Silva *et al.* 2014). A continuación, se discute el más utilizados en la industria, secado por aspersión y liofilización. Fang y Bhandari (2012) establecen que el secado por aspersión y la liofilización se han aplicado comúnmente debido a sus ventajas en la disponibilidad de la instalación del equipo, alta estabilidad del producto, bajo volumen y peso del producto, menor espacio de almacenamiento y costo de transporte, y facilidad de manejo y reconstitución de polvos encapsulados.

Secado por aspersión. El secado por aspersión es el método de encapsulación más utilizado, ya que es barato y brinda altos rendimientos (Zuidam 2012). Este método consiste en atomizar un producto líquido utilizando un gas caliente para secarlo y obtener un polvo del producto. El gas generalmente es aire, pero a veces también se pueden utilizar gases inertes, como el nitrógeno (Poornima y Sinthiya 2017). El secado por aspersión es un proceso diseñado inicialmente para secar productos, como en la leche en polvo, pero también se ha utilizado como una herramienta para encapsular.

Existen dos formas de hacer un secado por aspersión: usando una boquilla de dos fluidos y usando una boquilla de tres fluidos; estas se diferencian en la forma en que la solución se inyecta en el secador por aspersión (Figura 21). En el secado por aspersión usando boquilla de dos fluidos, el material pared y la sustancia a encapsular se inyectan en el mismo lugar. En el secado por aspersión usando una boquilla de tres fluidos, estos se inyectan en diferentes lugares, haciendo posible la reticulación *in-situ* (Antoniraj *et al.* 2019; Kašpar *et al.* 2013).

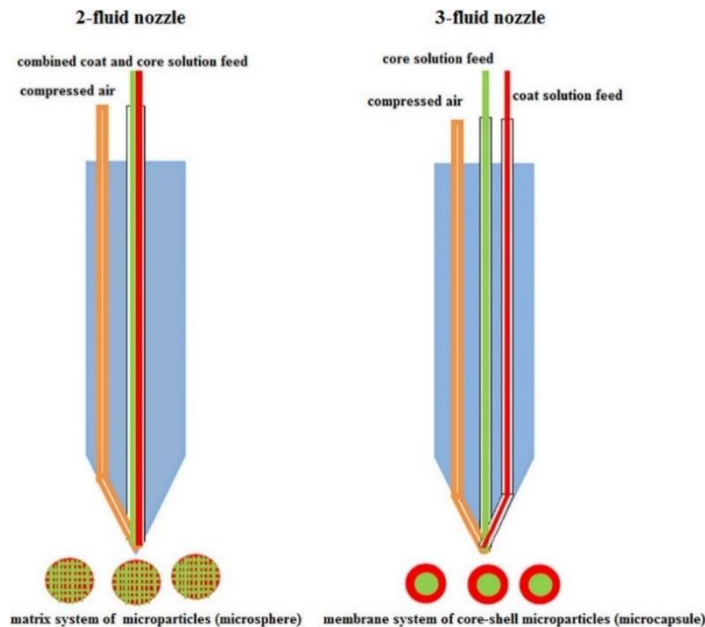


Figura 21. Representación esquemática del sistema de matriz y preparación de micropartículas núcleo-pared mediante secado por aspersión boquilla de dos fluidos y boquilla de tres fluidos. Fuente: Antoniraj *et al.* 2019.

Según Kašpar *et al.* (2013), una ventaja de usar el secado por aspersión con boquilla de tres fluidos es que el proceso de reticulación tiene lugar en las gotas después de la salida de la boquilla, por lo tanto, es posible trabajar con concentraciones más altas de materiales de reticulación. Sin embargo, tiene algunas consecuencias relacionadas con la investigación detrás de este proceso para cada producto específico. Es necesario encontrar parámetros viables (como la concentración de materiales de reticulación, los caudales de ambas soluciones y el caudal de gas atomizador) para evitar la reticulación en la salida de la boquilla, lo que resulta en el bloqueo de dicha boquilla o la formación de aglomerados más grandes. Los tipos de atomizadores comúnmente utilizados en secado por aspersión son los atomizadores de presión, los atomizadores centrífugos (de rueda) y los atomizadores neumáticos (de dos fluidos) (Fang y Bhandari 2012).

En la Figura 22 se muestra una representación esquemática de un secador por aspersión. En los secadores por aspersión de boquilla de dos fluidos, el tanque de alimentación es donde se encuentra la solución del material del núcleo con el material pared. Sin embargo, en los secadores por aspersión de boquilla de tres fluidos se inyectan por separado en el secador. La bomba de alimentación inyecta la solución al atomizador, y por medio del sistema de calentamiento de aire se inyecta gas caliente (aire presurizado o gas inerte a 100 - 200 °C) en el secador por atomización

donde se seca la solución de alimentación. La cámara de secado es donde ocurre el proceso de deshidratación. El producto seco que tiene una densidad más alta cae y entra en la cámara de recolección del producto. El gas utilizado para el secado pasa a través del separador ciclónico donde se separa el gas y el polvo seco. Este gas va al depurador y el producto seco va a la cámara de recolección del producto (Santos *et al.* 2017).

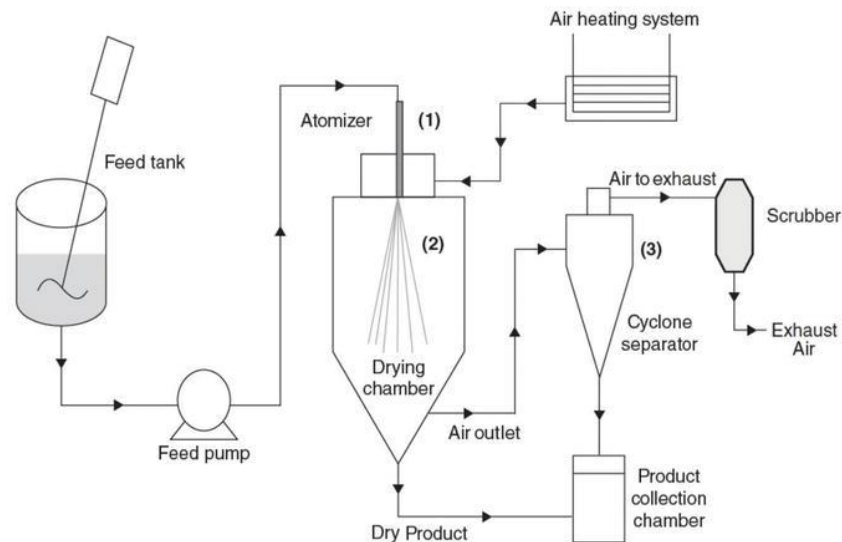


Figura 22. Representación esquemática del mecanismo de secado por aspersión. (1) Atomización. (2) Conversión de gota a partícula. (3) Colección de partículas.

Fuente: Santos *et al.* 2017.

Existen dos formas de reticular un material para encapsulación usando secado por aspersión: *in-situ* y *ex-situ*. En la reticulación *in-situ*, el proceso de deshidratación y encapsulación del compuesto bioactivo ocurren simultáneamente en la cámara de secado; mientras que en la reticulación *ex-situ*, la encapsulación del compuesto bioactivo ocurre antes del secado (Zhao *et al.* 2015; Kašpar *et al.* 2013). En el caso de la reticulación *ex-situ*, se puede reticular con cualquiera de los métodos químicos antes mencionados.

La atomización es una de las fases más críticas del secado por aspersión, ya que es donde aumenta el área superficial de la solución, optimizando la transferencia de calor y masa entre el gas caliente inyectado y la solución de alimentación (Santos *et al.* 2017). Se usan 3 tipos de flujos de aire caliente en el proceso de secado por aspersión: Co-corriente (paralelo), contracorriente y mixto. En el flujo co-corriente, el aire caliente es inyectado desde arriba, al igual que el alimento. En el flujo contracorriente, el aire caliente es inyectado desde abajo, al contrario que el alimento. En el proceso mixto, el aire es inyectado desde arriba y el alimento desde abajo, lo que causa que después que el alimento sube, vuelva a caer por efecto de la gravedad haciendo que sea un flujo co-corriente y contracorriente a la vez (Figura 23) (Wong y John 2016).

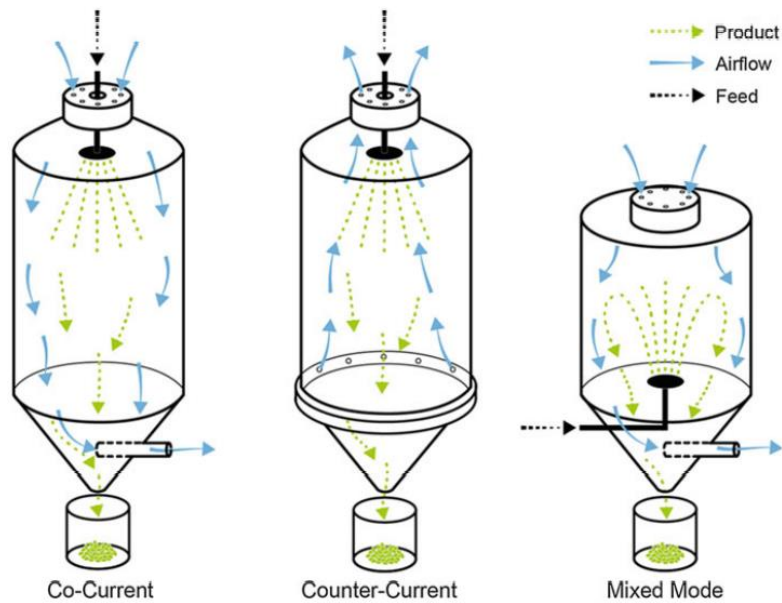


Figura 23. Representación del flujo de aire caliente co-corriente (o paralelo) (izquierda), contracorriente (centro) y mixto (derecha) en un secador por aspersión.
 Fuente: Wong y John 2016.

El flujo co-corriente o paralelo es adecuado para productos más sensibles al calor, ya que la transferencia de calor ocurre de manera gradual, aunque también se usa en otros productos. En el flujo contracorriente, la partícula más caliente tiene contacto con la más fría, lo que causa una mayor velocidad de transferencia de calor, pero por menos tiempo. En secadores similares, el flujo contracorriente generalmente es más eficiente al momento de transferir el calor, con la desventaja de no poder usarse en productos termolábiles (Ziaee *et al.* 2019). Para la encapsulación de compuestos bioactivos en el campo de la industria de alimentos es más utilizado el flujo co-corriente o paralelo (Fang y Bhandari 2012).

Formación de partículas mediante secado por aspersión. Cuando la encapsulación se realiza mediante secado por atomización, generalmente se forman partículas en el rango de micrómetros. El tamaño de las microcápsulas creadas mediante secado por atomización se encuentra en el rango de 5 a 150 μm (Silva *et al.* 2014). Las microcápsulas tienen un material pared (sustancia reticulada) y un núcleo (sustancia encapsulada). Según la morfología de las microcápsulas, podrían clasificarse como microcápsula única, microcápsula de múltiples núcleos y microcápsula de matriz (Figura 24).

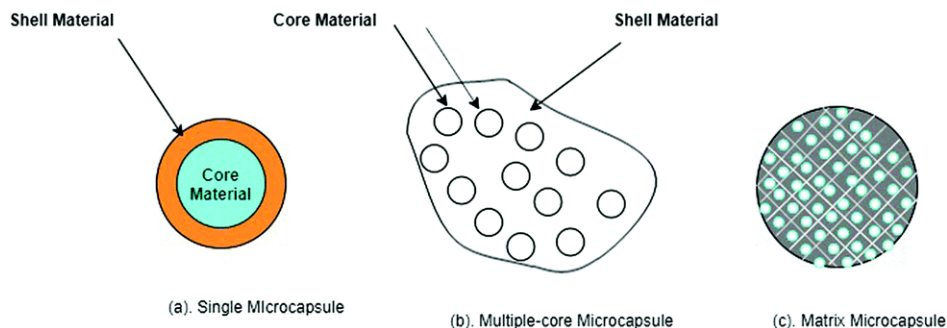


Figura 24. (a) Microcápsula única (microcápsula con un solo núcleo), (b) microcápsula con múltiples núcleos y (c) microcápsula de matriz.

Fuente: Bah *et al.* 2020.

Las partículas producidas con secado por aspersión tienen una estructura interna compleja, de pequeñas partículas coloidales incrustadas dentro de partículas sólidas más grandes que se formaron durante el proceso de secado. Además, estas pueden aglomerarse o recubrirse posteriormente, creando estructuras aún más complejas, lo que proporciona una gran flexibilidad en la producción de sistemas de administración coloidal con diferentes características funcionales (McClements 2015). Las partículas pueden llegar a tener diferentes formas, tanto esféricas como no esféricas. En la Figura 25 se pueden observar algunos ejemplos de formas comunes en la formación de partículas.

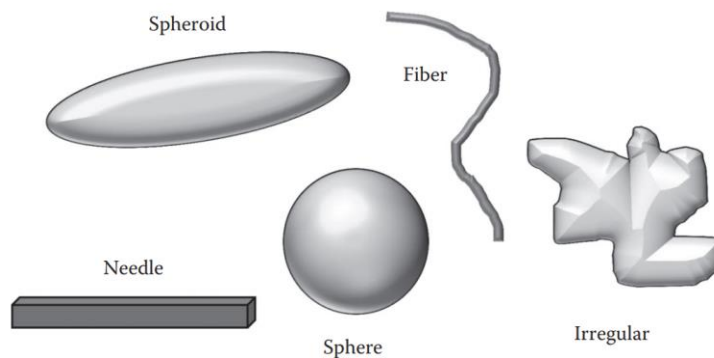


Figura 25. Ejemplos de diferentes formas de las partículas posibles en sistemas de encapsulación alimentaria.

Fuente: McClements 2015.

Las microcápsulas obtenidas a través del secado por aspersión son influenciadas por: propiedades de la emulsión (incluida la naturaleza de la fase lipídica), los tipos de materiales de la pared, y la proporción pared/ núcleo. Además, el proceso en si son influenciados por parámetros del secador por aspersión como son: temperatura de entrada del aire, velocidad del flujo de alimentación y velocidad del atomizador (Chen *et al.* 2013; Wisniewski 2015).

En la Figura 26 se muestra el proceso de formación de partículas utilizando el secado por aspersión con reticulación *in-situ*. Se reticuló alginato con calcio para formar el material pared el cual

encapsuló el aceite. Se obtuvieron tamaños de partícula de 8.1, 11.8 y 17.9 μm con encapsulaciones de 15, 25 y 35% de aceite, respectivamente. Las gotas de aceite fueron de tamaño de 200 a 300 nm. El producto final es el polvo de los encapsulados secos (Strobel *et al.* 2016).

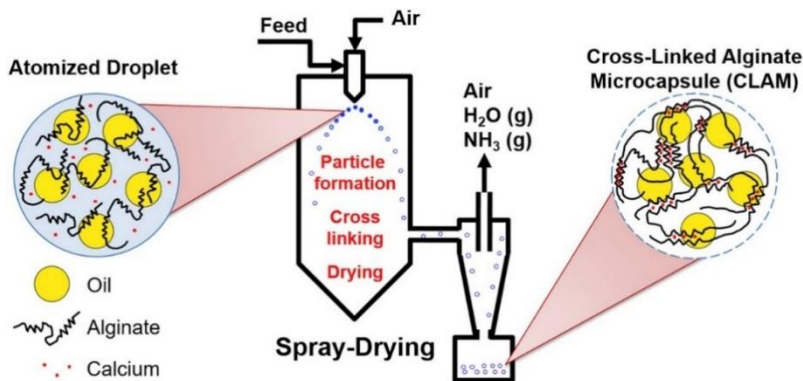


Figura 26. Esquema de formación de micropartículas *in-situ* por el método de secado por aspersión. Fuente: Strobel *et al.* 2016

Para la encapsulación por medio del secado por aspersión se requiere preparar la solución a inyectar en dicho secador, esta debe ser relativamente estable y prepararse tomando en cuenta la naturaleza del compuesto a encapsular y del material pared. Para un núcleo soluble en agua, se puede disolver la solución con un material de pared; para núcleos solubles en aceite, se debe preparar una emulsión de aceite en agua (Figura 27), y para partículas (por ejemplo, cristales o microorganismos) se pueden dispersar en una solución de material de pared para formar suspensiones (Fang y Bhandari 2012).

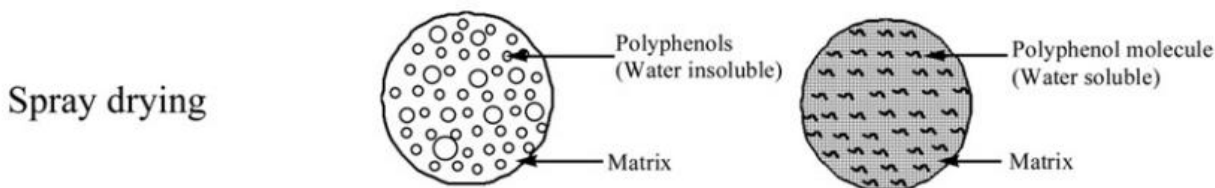


Figura 27. Ilustración de las características de compuestos polifenólicos encapsulados por medio de secado por aspersión. Adaptado de: Fang y Bhandari 2010.

Las ventajas de la formación de partículas por secado por aspersión son: alta eficiencia de proceso, reproducibilidad del proceso, facilidad de operación del instrumento, bajo costo del proceso y posibilidad de emplear una amplia variedad de agentes encapsulantes (Wong y John 2016; Silva *et al.* 2014). La principal desventaja del uso de este método para la formación de partículas es que produce tamaños no uniformes; además de que no se puede usar para encapsular materiales muy sensibles a altas temperaturas (Silva *et al.* 2014). Debido al corto tiempo de exposición durante este proceso, el núcleo de la capsula se mantiene por debajo de los 40 $^{\circ}\text{C}$, previniendo el daño de la sustancia a encapsular en dicha capsula (Fang y Bhandari 2012).

En un estudio realizado por Chen *et al.* (2013), se comprobó que el uso del secado por aspersión para encapsular aceite de pescado, fitoesterol éster y limoneno aumentó la retención de volátiles en la microcápsula final, a comparación de liofilización, aumentando la eficiencia de encapsulación. Se usó proteína aislada de suero (WPI) y fibra de maíz soluble como material pared. La oxidación fue similar tanto por el método secado por aspersión como por liofilización, pero la retención de limoneno fue menor en los encapsulados por el proceso de liofilización. Debido a la complejidad del proceso de secado por aspersión, en ese estudio se concluyó que se necesitaban realizar más estudios utilizando otros materiales pared con el objetivo de determinar si los resultados son constantes o si depende de otras variables.

Métodos de caracterización física de los encapsulados

Las nanopartículas requieren caracterización analítica completa del material, incluido el núcleo, los recubrimientos y cualquier otro factor que afecte su uso. La caracterización es fundamental para comprender su potencial como producto comercial, ya que se evalúan las características para su aplicación en encapsulación o con fines médicos (Mansfield 2015). La eficiencia de carga y encapsulación son variables que están relacionadas con la cuantificación de los ingredientes activos incorporados dentro de las nanopartículas; estos parámetros podrían establecerse mediante métodos analíticos como la espectrofotometría UV-visible, la cromatografía líquida de alto rendimiento o la cromatografía de gases (para activos volátiles, es decir, aceites esenciales (Martínez-Rivas *et al.* 2017).

Para la evaluación de las propiedades como morfología, carga superficial, y otras características físicas de las nanopartículas en sí, se pueden dividir los métodos de evaluación en 2 tipos: métodos a base de luz (microscopía, dispersión de luz y rayos X) y caracterización térmica (Análisis Termogravimétrico, Análisis Térmico Diferencial, Calorimetría de Titulación Isotérmica, Calorimetría Diferencial de Barrido).

Métodos a base de luz

La caracterización física se realiza por medio de instrumentos basados en principios de microscopía, dispersión dinámica de luz y rayos X. En la caracterización física se miden aspectos como: tamaño y distribución de partículas, carga superficial y morfología.

Microscopía. Con ayuda de la microscopía se determinan aspectos relacionados con el tamaño, topografía de la superficie, grosor y diámetro de la capsula y, a veces, la porosidad de estas. Además, el rendimiento de la producción de encapsulados y la disolución son aspectos relacionados con las propiedades físicas.

Microscopía óptica convencional. Este tipo de microscopía es capaz de evaluar estructuras de hasta 0.2 μm o más grandes, dependiendo de la longitud de onda de la luz. El proceso se realiza mediante la toma de imágenes y videos por medio de una cámara, que posteriormente se analiza en un software informático para cuantificar y medir el tamaño de las partículas. Si los encapsulados no son esféricos, se puede determinar su forma por medio de un parámetro de redondez (RN), que toma en cuenta el valor mínimo para considerarse circular. Para ello se utiliza la Ecuación 7.

$$RN=P^2/(4\pi \times A) \quad [7]$$

Donde:

P es el perímetro del encapsulado y A es el área transversal (Đorđević *et al.* 2015).

En resumen, la microscopía óptica convencional con ayuda de un software informático es capaz de cuantificar, medir y determinar la forma de los encapsulados. En la siguiente imagen (Figura 28) se muestra una imagen de microscopio óptico de una emulsión de quitosano/glicerol/aceite de oliva.

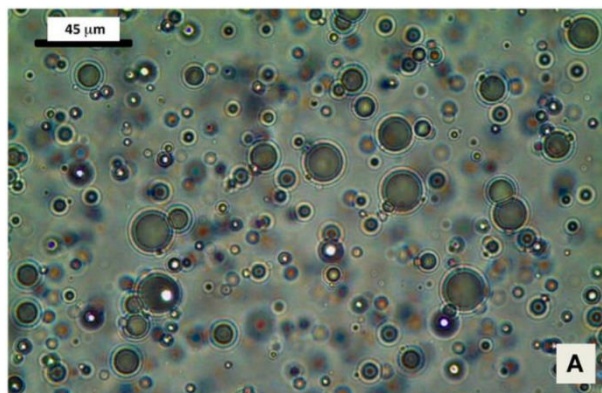


Figura 28. Imagen de microscopio óptico de una emulsión de quitosano/glicerol/aceite de oliva.
Fuente: Pereda *et al.* 2014.

Microscopía Confocal Láser de Barrido (CLSM). Esta técnica es una imagen basada en fluorescencia y ofrece mayor resolución que la microscopía de fluorescencia debido a sus propiedades de detección e iluminación puntual (Rossetti *et al.* 2013). Por medio de esta técnica se mide cada punto de manera individual. Un haz de luz pasa por la muestra para iluminarla (donde sus electrones se excitan y emiten fluorescencia) y, el volumen de la muestra iluminada se asocia con la intensidad discreta de fluorescencia para determinar las características de los encapsulados. La información de la luz obtenida de la muestra se puede utilizar para reconstruir tridimensionalmente su estructura, con ayuda de un software informático (Đorđević *et al.* 2015).

El uso de láseres como fuente de luz y fluorescencia permite la excitación selectiva, de alta resolución y brillante de los materiales de interés. A pesar de que el límite de resolución de esta técnica es aproximadamente 200 nm, las ventajas del uso de CLSM son; (1) No se requiere un proceso de secado para la preparación de muestras; (2) las estructuras tridimensionales se pueden reconstruir a partir de múltiples imágenes bidimensionales obtenidas en diferentes planos focales; (3) la obtención de imágenes de lapso de tiempo permite la visualización de procesos dinámicos en tiempo real (p. Ej. Formación y colapso de nanofibras); (4) se pueden distinguir especies químicas distintas mediante tinción con sondas fluorescentes selectivas para cada componente; (5) el uso de objetivos con diferentes aumentos permite la observación con una amplia gama de campos de visión desde la escala submicro a milimétrica (Kubota *et al.* 2020). En la Figura 29 se muestran imágenes CLSM de microesferas de diferentes morfologías de quitosano.

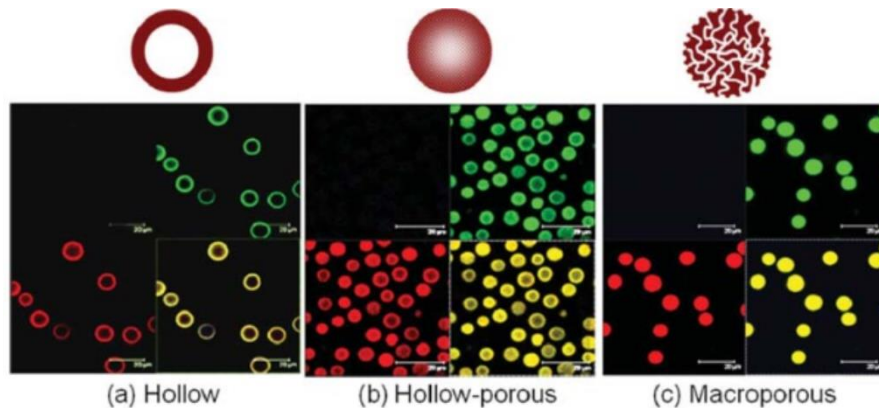


Figura 29. Imágenes CLSM de diferentes morfologías de microsferas de quitosano: (a) hueco, (b) poros huecos y (c) macroporos.
 Fuente: Wang *et al.* 2015.

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM, por sus siglas en inglés). Esta técnica es utilizada para encapsulados con diámetros más pequeños (hasta 0.003 nm) que no se podrían observar con la microscopía óptica. Esta técnica consiste en medir los electrones emitidos por un filamento calentado, lo cual provee imágenes limitadas únicamente por la longitud de onda (0.003 nm). Para evitar perder resolución de la muestra, se realiza en alto vacío, ya que los choques de electrones con moléculas de aire pueden afectar los resultados (Đorđević *et al.* 2015). En esta técnica se utilizan electroimanes que permiten tener energía suficiente para penetrar la muestra con los electrones y así poder determinar la morfología y grosor de los encapsulados (Xu y Du 2003; Chiu *et al.* 2005). La Figura 30 muestra una imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de nanopartículas de quitosano reticuladas con glutaraldehído y con un tamaño promedio de partícula de 90 nm.

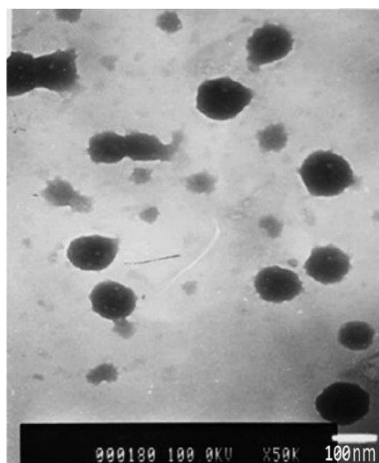


Figura 30. Imagen de microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas de quitosano reticuladas con glutaraldehído.
 Fuente: Chandra *et al.* 2014.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés). El microscópico electrónico de barrido es una herramienta indispensable y de los instrumentos más versátiles para el análisis y caracterización de estructuras a escalas nanométricas (Jin *et al.* 2016). Una de las razones por las que este método es ampliamente usado es porque para el análisis de tamaño de partícula se puede conseguir resoluciones de hasta 10 nm, e incluso, en versiones avanzadas se pueden alcanzar hasta 2.5 nm aproximadamente (Raval *et al.* 2019). El SEM utiliza un haz de electrones enfocados de energía relativamente baja como una sonda electrónica que se escanea de manera regular sobre la muestra (Joy *et al.* 2019; Raval *et al.* 2019).

Para utilizar esta técnica, igual que el TEM, se requiere de alto vacío, para evitar la interferencia de las moléculas de aire en el análisis. Sin embargo, la utilización de este método es más práctico, ya que la preparación de muestras es más rápida y fácil. Otra ventaja es que puede analizar un amplio rango de tamaños de partículas, que van desde la escala nanométrica (nm) a escala centimétrica (cm). SEM tiene la capacidad de analizar la muestra desde diferentes puntos de vista (gracias a los movimientos de traslación, inclinación y rotación), pero no puede captar colores como lo hace la microscopía óptica convencional (Đorđević *et al.* 2015). En las siguientes imágenes de SEM (Figura 31) se muestran microcápsulas de quitosano preparadas por dos diferentes métodos y en una escala de 2 μm de tamaño.

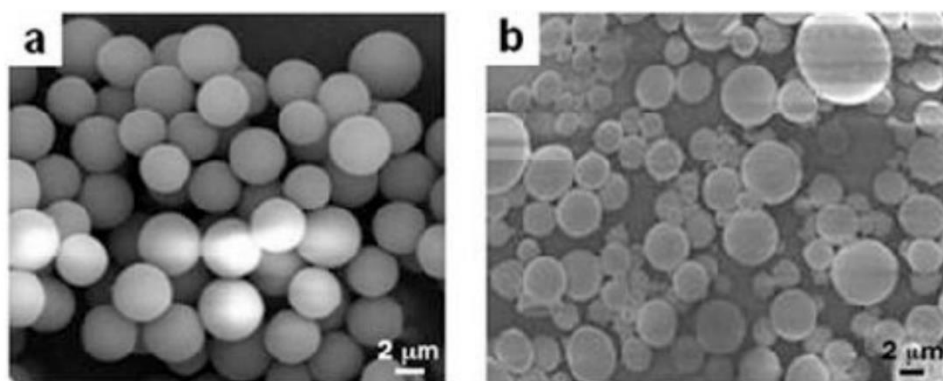


Figura 31. Imágenes SEM de microcápsulas de quitosano preparadas por el (a) proceso de emulsión de membrana y (b) el método de agitación mecánica.

Fuente: Wang *et al.* 2015.

Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ESEM, por sus siglas en inglés). Esta técnica tiene algunas ventajas en comparación a SEM. Mientras que SEM requiere alto vacío en la cámara de muestras para evitar la interferencia de las moléculas de aire con los electrones; ESEM requiere bajo vacío (hasta 10 torr) en la cámara de muestra, lo cual es mucho menos grado de vacío que lo requerido por SEM (hasta 0.001 torr). ESEM, también permite la toma de imágenes en modo húmedo (bajo vacío y 10% de humedad relativa), es decir sin deshidratarse y sin preparación previa, lo que es especialmente útil para muestras biológicas y otras muestras que contienen agua (Đorđević *et al.* 2015; Mayeen *et al.* 2018). La Figura 32 muestra nano-geles de quitosano y sulfato dextrano, caracterizados por ESEM a tamaños de 500 nm.

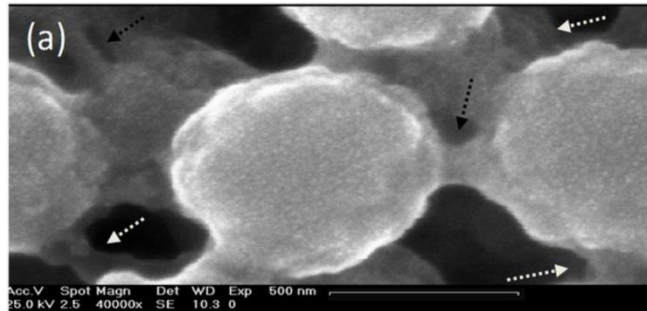


Figura 32. Imagen de microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) de nano-geles de quitosano y sulfato dextrano.

Fuente: Diez-Pascal y Shuttleworth 2014.

Dispersión Dinámica de Luz (DLS, por sus siglas en inglés). Se puede utilizar la microscopía combinada con el análisis de imágenes para medir el tamaño individual de partículas, pero es algo impráctico, ya que es lento y cuando se necesita medir grandes cantidades de macropartículas es ineficaz. Sin embargo, para partículas no esféricas o partículas que tiende a formar aglomerados, se prefiere microscopía combinada con el análisis de imágenes. Si se conoce el índice de refracción del agente encapsulante y del medio de suspensión, se puede utilizar una técnica de dispersión de luz láser para determinar tamaño de partículas (entre 0.02-2000 μm) y potencial zeta de miles de partículas en pocos segundos (Zhang *et al.* 2010).

La DLS permite el cálculo del tamaño de partícula y la distribución del tamaño utilizando una función de autocorrelación temporal de la señal de luz dispersa en el tiempo y el ángulo, junto con la ecuación de Stokes-Einstein para determinar el radio de partícula (Coe *et al.* 2015). La ley de Stokes-Einstein expresa que el coeficiente de difusión en términos de viscosidad del disolvente y radio molecular del soluto se basa en el supuesto de que un ion o molécula difusora se mueve entre las moléculas de soluto como lo hace una entidad macroscópica en un continuo (Schiller 1991).

También se ha utilizado una técnica parecida a la dispersión dinámica de luz para determinar el tamaño y distribución del tamaño de partículas, esta es llamada oscurecimiento de la luz o detección óptica de una sola partícula (SPOS, por sus siglas en inglés). Esta técnica consiste en medir la magnitud de un pulso generado por partículas individuales (diluidas) que pasan a través de una pequeña fotozona, la cual es iluminada por un diodo laser o lámpara incandescente. La sombra generada se puede correlacionar para determinar el tamaño de partículas, es decir, el flujo de partículas que pasan a través de una fuente de luz y un detector, generan sombras que permiten determinar su tamaño (Zhang *et al.* 2010).

Potencial zeta. El potencial zeta es la forma abreviada de la oración en inglés de: potencial electrocinético de los sistemas coloidales. La química coloidal normalmente se representa por la letra griega zeta, eso también influyó en dicho nombre. El potencial zeta es un potencial eléctrico de la doble capa fronteriza de contacto en el lugar del plano de deslizamiento frente a un punto en el volumen principal de fluido lejos de la interfaz. Es decir, es la diferencia de potencial entre el medio de dispersión y la capa estacionaria de fluido anexa a la partícula dispersada. En la Figura 33 se puede observar el comportamiento de los protones y neutrones cerca de una molécula de carga negativa. Los protones se unen formando una capa rígida, y dependiendo del nivel de negatividad de la partícula (mV) será la distancia desde la partícula. Mientras menor sea la carga negativa (más lejano de 0) más larga será la distancia desde la superficie de la partícula (Hartman 2018).

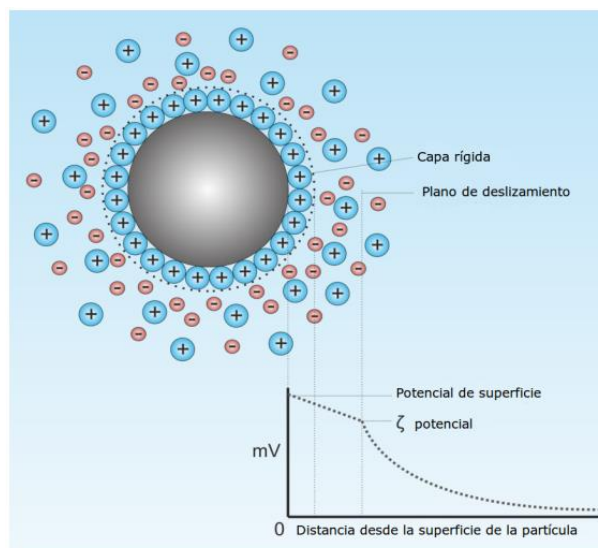


Figura 33. Esquema gráfico de la influencia del nivel de carga eléctrica negativa en la distancia desde la superficie de la partícula con los protones y neutrones.

Fuente: Hartman 2018

El potencial zeta de un polímero es un indicador de su estabilidad potencial en solución. Su magnitud es una función del pH y la presencia de solutos en el solvente. Esta mide la magnitud de repulsión o atracción entre encapsulados, y sus unidades de medida son los milivoltios (mV). Este valor tiene una relación directa con la estabilidad de almacenamiento de los encapsulados en suspensión. En general, partículas con un potencial zeta menor a -35 o mayor a 35 mV son consideradas estable (Kadu *et al.* 2011; Krstić *et al.* 2018). En el Cuadro 1 se muestra el comportamiento de la estabilidad coloidal de las moléculas en base al potencial zeta.

Cuadro 1. Comportamiento de la estabilidad coloidal en base al potencial zeta.

Valor de potencial zeta (mV)	Comportamiento de estabilidad
0 a ± 5	Floculación o coagulación
± 10 a ± 30	Inestabilidad incipiente
± 30 a ± 40	Estabilidad moderada
± 40 a ± 60	Estabilidad buena
Mayor a ± 60	Estabilidad excelente

Adaptado de: Kumar y Dixit 2017.

El potencial zeta suele medirse a base del principio de electroforesis. Este consiste en someter la suspensión a un campo eléctrico y medir la velocidad de desplazamiento de las partículas dentro de este campo eléctrico. Mientras más alta sea su velocidad de desplazamiento, mayor potencial zeta (Zhang *et al.* 2010). Sin embargo, el potencial zeta de un agente encapsulado en suspensión depende del pH, la concentración de electrolitos y los surfactantes en suspensión. En general, cuando aumenta la fuerza iónica (pH mayor) disminuye el potencial zeta (Yan *et al.* 1992).

Caracterización térmica

Los métodos de análisis térmico miden las propiedades de los encapsulados como resultado de cambios de temperatura. Las mediciones termoanalíticas proporcionan información relacionada con factores como: la composición de los materiales y del recubrimiento de nanopartículas, así como la estructura, cristalinidad del material y cinética de formación (Mansfield 2015). Las nanopartículas termodinámicamente inestables se descomponen a través de mecanismos fisicoquímicos como la separación gravitacional o sedimentación, agregación (floculación, coalescencia y coalescencia parcial) y maduración (composición y maduración de Ostwald) de las partículas (McClements 2015). El análisis calorimétrico de nanopartículas es un campo en crecimiento debido a la alta disponibilidad de la instrumentación y la reducción de los requisitos de muestra en los calorímetros modernos (Fotticchia *et al.* 2016).

Análisis Termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés). Es una técnica usada para determinar la estabilidad térmica de un material y su fracción de componentes volátiles al monitorear el cambio de peso que ocurre cuando una muestra se calienta a una velocidad constante (Rajisha *et al.* 2011). Este determina la pérdida de peso endotérmica y exotérmica al calentar o enfriar las nanopartículas. El TGA utiliza calor para forzar reacciones químicas y cambios físicos en los materiales. Incluso, las curvas termogravimétricas pueden caracterizar los compuestos específicos debido a la secuencia única de las reacciones fisicoquímicas que ocurren sobre los rangos de temperatura específicos (Martínez-Rivas *et al.* 2017). En nanotecnología, el TGA se usa para la predicción de la estabilidad térmica y también puede indicar la modificación de la superficie de las nanopartículas por otros grupos funcionales y la cantidad de agente modificador de la superficie adherido a la superficie de las nanopartículas (Abraham *et al.* 2018).

La medición se realiza normalmente en aire o en atmósfera inerte, como helio o argón, y la pérdida del peso se registra en función del aumento de temperatura (Rajisha *et al.* 2011). Estos instrumentos

pueden aumentar la temperatura hasta 2000 °C y trabajar con pequeñas cantidades de muestra, hasta 1 g. El instrumento TGA genera dos tipos de gráficos como resultado, la curva TGA y la derivada de dicha curva. La curva TGA es una gráfica del peso de la muestra con respecto a la temperatura; esta proporciona temperaturas de descomposición térmica con la cantidad de residuos en función de la temperatura. La derivada de la curva TGA indica la tasa de pérdida de masa en función de un aumento de temperatura. Estas dos curvas se podrían usar para determinar otros parámetros como la cinética de la reacción (Das *et al.* 2019). Un aparato de análisis térmico consta de un sensor de propiedades físicas (peso), un horno de atmósfera controlada, un programador de temperatura y un dispositivo de registro, como se puede ver en la Figura 34 (Abraham *et al.* 2018).

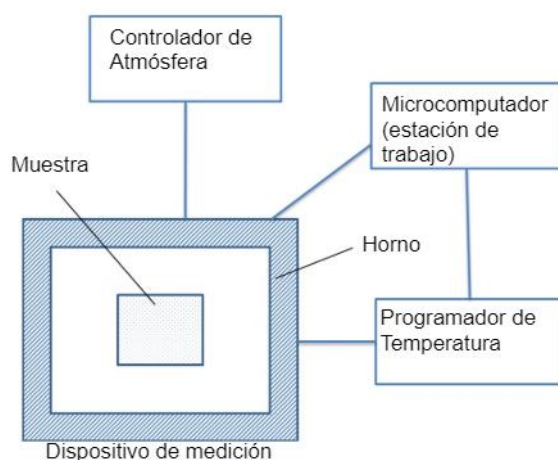


Figura 34. Diagrama de bloques de un instrumento de análisis térmico (TGA). Adaptado de: Abraham *et al.* 2018.

El aparato tiene una báscula de alta sensibilidad y un horno programable para controlar el calor de la muestra, el cual también se puede enfriar rápidamente. La báscula se encuentra por encima del horno y está térmicamente aislada del calor para maximizar la sensibilidad, exactitud y precisión de la toma del peso. Un cable colgante de alta precisión se suspende desde la báscula hasta el interior del horno, donde al final de dicho cable está colgado el plato con la muestra. La sensibilidad de estas basculas puede alcanzar hasta 0.1 µg. Si se utiliza un espectrómetro de infrarrojos, además del TGA, se podría analizar e identificar los gases generados por la degradación de la muestra (Ebnesajjad 2014).

Otros usos del TGA son la predicción de la estabilidad térmica y oxidativa de los materiales, la composición de los sistemas multicomponente, la vida útil estimada de un producto, la cinética de descomposición de los materiales, el efecto de atmósferas reactivas o corrosivas en los materiales, el contenido de humedad y contenido de volátiles de los materiales (Abraham *et al.* 2018).

Análisis Térmico Diferencial (DTA, por sus siglas en inglés). Se basa en el principio de que la sustancia al calentarse sufre reacciones y cambios de fase que implican absorción o emisión de calor. La identificación de las sustancias se logra al comparar las curvas de DTA obtenidas de una sustancia desconocida con las curvas de DTA proporcionadas por elementos (referencia) (Martínez-Rivas *et al.* 2017). Tanto la muestra y la referencia se calientan en un horno, donde se registra la temperatura de ellos en diferentes ciclos programados de calentamiento y enfriamiento. Se forma una curva DTA, que consiste en la diferencia de temperatura de la muestra con la referencia en función de la temperatura o el tiempo del ciclo (Abraham *et al.* 2018). Los cambios en la muestra que conducen a la absorción o evolución de calor pueden detectarse con respecto a la referencia inerte (Tanzi *et al.* 2019).

Las mediciones típicas por DTA se realizan con una tasa de calentamiento constante (entre 1 y 100 °C/min) con cantidades mínimas de muestra (menos de 10 mg) (Willard y Daniil 2013). El DTA es ampliamente usado en la industria farmacéutica y de alimentos (Abraham *et al.* 2018). Las primeras aplicaciones importantes de este método fueron en el estudio de diagramas de fase y temperaturas de transición, así como en análisis cualitativos de metales, óxidos, sales, cerámicas, vidrios, minerales y suelos (Tanzi *et al.* 2019). En la Figura 35 se puede observar la gráfica obtenida de un TGA y de un DTA de nanocompuestos de quitosano.

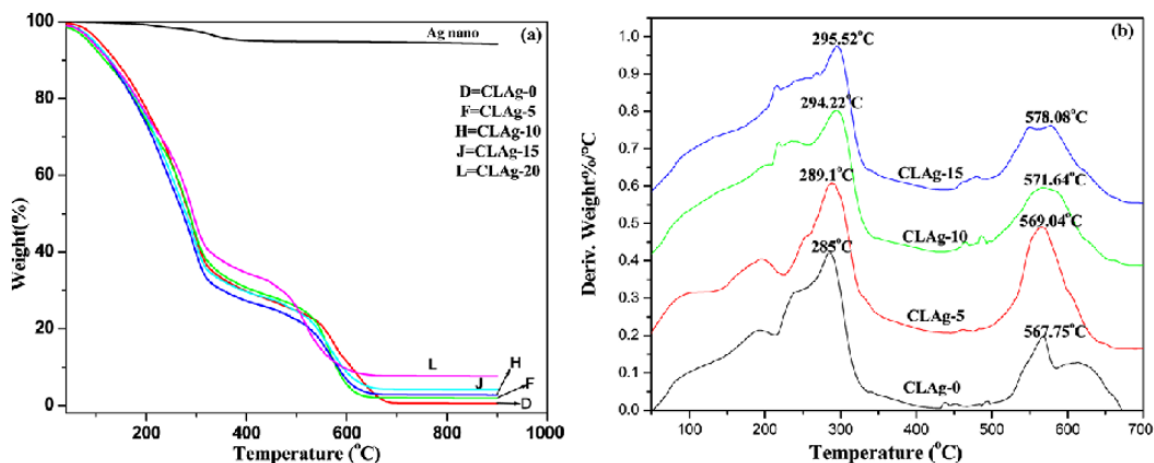


Figura 35. Curvas (a) TGA y b) DTA de nanocompuestos de quitosano-plata.

Fuente: Rana *et al.* 2010.

En el estudio de la Figura 35, Rana *et al.* (2010), formaron nanocompuestos de quitosano usando nanopartículas de plata como relleno nanométrico (menores a 100 nm) y con ayuda del gráfico TGA y DTA determinaron que la estabilidad térmica aumenta con el aumento de nanopartículas de plata. Tanto el DTA como la calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés) son técnicas estándar que se han utilizado con éxito para identificar temperaturas de cristalización y transiciones vítreas (Willard y Daniil 2013).

Calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés). La calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés) es una técnica empleada para cuantificar la energía necesaria para establecer una diferencia de temperatura de casi cero, entre una sustancia y un material de referencia inerte. Para ellos, se someten ambas muestras a regímenes de temperatura idénticos en un ambiente calentado o enfriado a una velocidad controlada (Rajisha *et al.* 2011). La energía de activación para cristalización se estima fácilmente mediante un método isoconvensional, a partir de una serie de picos de DSC medidos a varias velocidades de enfriamiento o calentamiento (Vyazovkin *et al.* 2020).

El principio básico de esta técnica se basa en que, cuando la muestra se somete a una transformación física, como las transiciones de fase, es necesario que fluya más (o menos) calor que la referencia para mantener ambos a la misma temperatura. La DSC generalmente se utiliza para medir varios parámetros térmicos como la transición vítrea, la fusión y la cristalización (Rajisha *et al.* 2011). Durante un cambio de temperatura, el DSC mide el calor irradiado o absorbido por la muestra basándose en la diferencia de temperatura entre la muestra y el material de referencia inerte (Gill *et al.* 2010).

La DSC en el campo de la nanociencia se aplica en la cuantificación de nanosólidos farmacéuticos, características térmicas de portadores de lípidos nanoestructurados, termoanálisis de nanopartículas coloidales, medición de la transición vítrea de macromoléculas en nanofases, caracterización de nanoportadores quelantes de iones y estudio de autoensamblaje de nanoestructuras supramoleculares (Abraham *et al.* 2018). La DSC puede ser clasificado en 2 categorías, dependiendo del mecanismo de operación del proceso: DSC de Flujo de calor y DSC de potencia compensada (Danley 2002; Zucca *et al.* 2004).

DSC de flujo de calor. En este método, es necesario colocar un recipiente con la muestra y un recipiente vacío (como referencia) sobre un disco termoeléctrico encerrado por un horno, y mientras que el horno se calienta a una velocidad de calentamiento lineal, el calor se transmite a la muestra y al plato de referencia a través del disco termoeléctrico (Danley 2002). La diferencia de temperatura de la muestra y el plato de referencia es consecuencia del calor específico (C_p) de la muestra, esta se mide mediante termopares de área.

En la Figura 36 se puede apreciar un sensor calorímetro gemelo de marca Tzero™, usado para el DSC de flujo de calor. Este se diseña para que el flujo de calor de un sensor no afecte al otro sensor. El cuerpo de dicho instrumento está hecho de constantán (aleación con 55% de cobre y un 45% de níquel), los discos del área de detección de cromel (aleación de 90% de níquel y 10% de cromo) y alambres de cromel y alambres de constantán. La sección de pared delgada crea la resistencia térmica y las superficies planas de los extremos sostienen la muestra y la referencia. La diferencia de temperatura se toma de los cables de cromel unidos a los discos de cromel de la muestra y de la referencia; y del cable de cromel con el cable de constantán en el centro del equipo (Danley 2002).

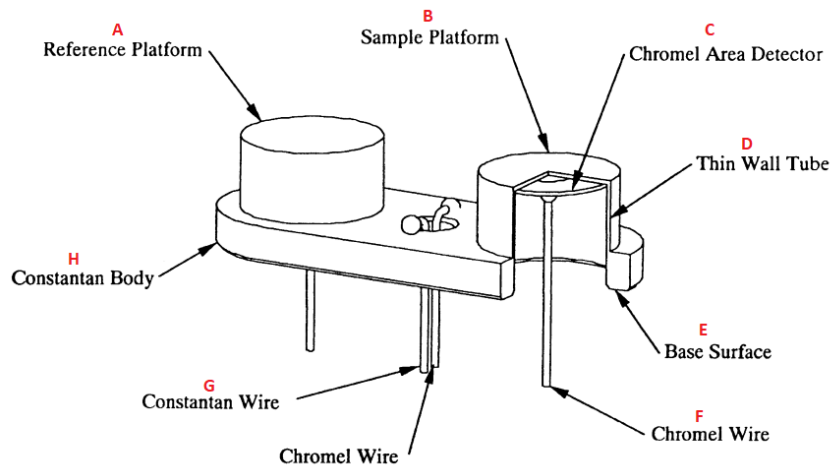


Figura 36. Sensor DSC Tzero™; A) Plataforma de muestra de referencia; B) Plataforma de la muestra; C) Discos de cromel (área de detección); D) Pared fina de Constantán; E) Superficie de la base; F) Alambre de cromel; G) Alambre de Constantán; H) Cuerpo de Constantán. Adaptado de: Danley 2002.

DSC de potencia compensada. En el DSC de potencia compensada, los platos de muestra y de referencia se ubican en microhornos separados, y son calentados por separado para que las temperaturas de la muestra y la referencia se mantengan iguales entre sí; ambas temperaturas aumentan o disminuyen linealmente (Abraham *et al.* 2018). En la Figura 37 se puede observar un ejemplo de estos microhornos. La DSC de potencia compensada está diseñada para medir directa y exactamente el cambio de entalpía del portamuestras en función del tiempo (Tanaka 1992). El calor a medir se compensa (casi totalmente) con energía eléctrica, aumentando o disminuyendo el calor de un Joule ajustable (Höhne *et al.* 2003).

Si hay una simetría térmica entre ambos microhornos (muestra y referencia) la temperatura en ellos será igual, pero si hay una asimetría estos tendrán diferentes temperaturas. Una asimetría puede ser causada por la reacción de la muestra dentro del horno durante su calentamiento (Höhne *et al.* 2003). La pequeña escala del proceso permite menor volumen de muestra lo que resulta en mayor precisión al momento de obtener resultados (Wang *et al.* 2017). El método DSC de potencia compensada tiene un corto tiempo de respuesta debido a su pequeña zona de calentamiento, por lo que se recomienda su uso en estudios térmicos que se requieran a la brevedad (Tanaka 1992).

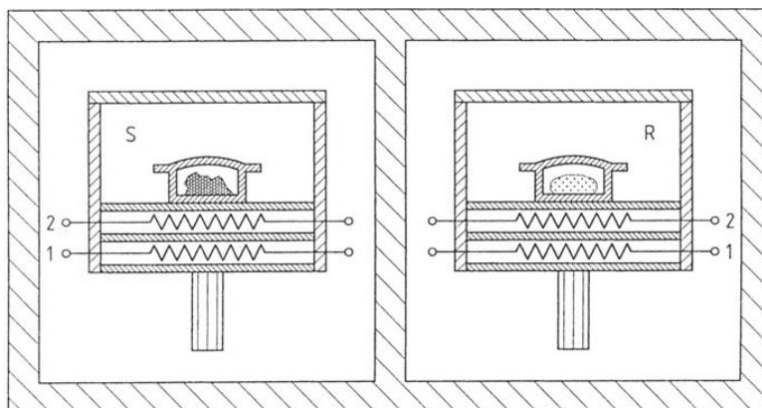


Figura 37. DSC de potencia compensada. Sistema de medición y microhorno de la muestra (izquierda), y sistema de medición y microhorno de la referencia (derecha). 1) resistencia de calentamiento; 2) sensor de temperatura. Ambos sistemas de medición, separados entre sí, se colocan en un bloque de aluminio a temperatura constante.

Fuente: Höhne *et al.* 2003.

Con el DSC de potencia compensada se puede lograr un mayor rendimiento como resultado de un tiempo más corto de escaneo y un funcionamiento en paralelo. Esto es vital para industrias como la farmacéutica, tomando en cuenta que la prueba de millones de candidatos a fármacos podría tardar años en completarse, incluso si se instalan sistemas automatizados para realizar la tarea de manera consistente (Wang *et al.* 2017).

Calorimetría de titulación isoterma (ITC, por sus siglas en inglés). Este método, se rige del principio básico de la termodinámica donde el contacto entre dos moléculas resulta en la generación o absorción del calor, dependiendo del tipo de unión (exotérmica o endotérmica) (Srivastava y Yadav 2019). La ITC (por sus siglas en inglés) mide los cambios de calor en la unión de dos o más moléculas en solución (a temperatura y presión constantes), y puede determinar la constante de asociación, la estequiometría de la reacción, la capacidad calorífica (C_p) de la reacción, la energía libre de unión, la entropía, entalpía y la estequiometría de la interacción (Fotticchia *et al.* 2016; Hevener *et al.* 2018).

Específicamente, la ITC mide el calor liberado o absorbido durante una reacción química, y sirve para caracterizar cualquier proceso químico que cause cambios de calor en la solución y que ocurren espontáneamente durante la reacción (Mazzei *et al.* 2016). La técnica ITC no está limitada por el tamaño de la biomolécula y no es influido por ninguna propiedad óptica potencial de las muestras, lo que la convierte en una técnica valiosa en el descubrimiento de fármacos, pero requiere relativamente altas concentraciones de muestra (Hevener *et al.* 2018). El instrumento ITC tiene de dos celdas (Figura 38); la celda principal para la macromolécula en cuestión y la celda de referencia que está destinada al solvente (Srivastava y Yadav 2019).

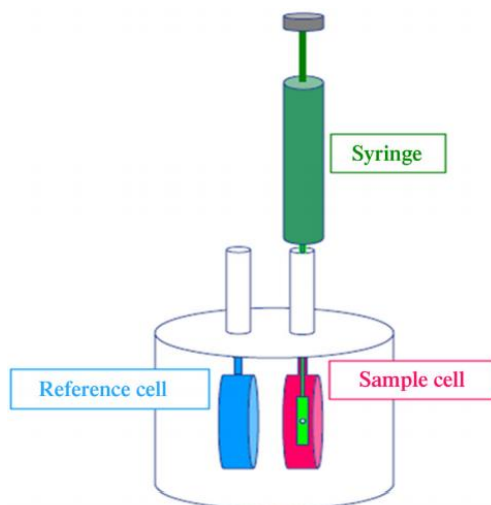


Figura 38. Esquema del instrumento de calorimetría isoterma de titulación. La jeringa (verde) es por donde se inyecta el ligando, la celda rosa es donde se coloca la muestra y la celda azul es la referencia (se mantiene la celda de referencia y de la muestra a la misma temperatura).

Fuente: Srivastava y Yadav 2019.

La ITC registra la energía requerida para mantener la misma temperatura en ambas celdas. Consecuentemente, el cambio de calor se calcula integrando la energía sobre tiempo (segundos), lo que resulta en la entalpía de la reacción. El calor generado o absorbido durante la reacción corresponde a la fracción de ligando unido, y el aumento de la concentración de ligando causa la saturación del sustrato y finalmente se descarga o consume menos calor (Srivastava y Yadav 2019).

El ITC por sí solo no es útil, pues simplemente mide el intercambio de calor, por lo que a menudo se usa con estudios complementarios para determinar o confirmar qué reacción está sucediendo realmente (Tsvetkov *et al.* 2013). Maurstad *et al.* (2011) determinaron por ITC que, la reticulación xantano-quitosano se divide en dos etapas. En la primera etapa el calor generado aumenta con el número de inyecciones (hasta la inyección #14), y la segunda etapa (a partir de la inyección #17) donde el calor generado va disminuyendo a pesar de aumentar el número de inyecciones, además de requerir un mayor tiempo para alcanzar el equilibrio (véase Figura 39). Las inyecciones de quitosano fueron de 7 μL y el cambio de la fase 1 a la 2 ocurría al alcanzar una proporción quitosano/xantano de 1.5:1.75 (para el tratamiento de xantano con peso molecular de 0.31×10^6 g/mol) (Maurstad *et al.* 2011).

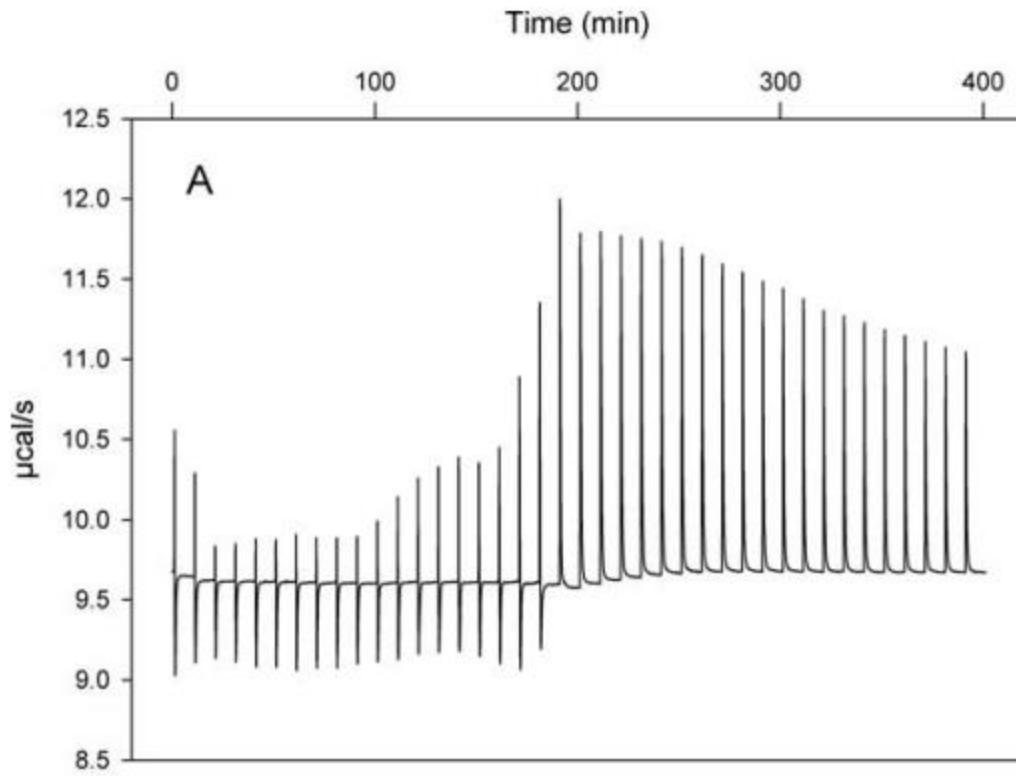


Figura 39. Termograma ITC obtenido de la titulación de quitosano una solución de xantano.
Fuente: Maurstad *et al.* 2011.

Cuadro 2. Resumen de la técnica de nanoprecipitación empleada para la fabricación de partículas de quitosano y la encapsulación de compuestos bioactivos.

Método	Materiales encapsulantes	Resumen	Técnica de secado	Rango de tamaños de partícula	Compuestos bioactivos encapsulados	Autor (es)
Nano precipitación	Quitosano con metanol (no solvente)	Relación no solvente y solvente de 10:1, quitosano en ácido acético y agua, citral (0.04-0.24 µg/mL), fase dispersa fue metanol	N/A	980-1900 nm	Citral, EE= 88%	Luque-Alcaraz <i>et al.</i> 2016
	Quitosano con ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA)	Agua desionizada (400 mL), poloxámero 188 (0.3%), ácido acético (4 mL), quitosano (40, 80 y 160 mg), PLGA (200 mg), paclitaxel (20 mg)	Liofilización	133-172 nm	Paclitaxel EE= 65.8-87.1%	Lu <i>et al.</i> 2019
	Quitosano con PLGA	PLGA (150 mg) en acetona, metformina HCl 75 mg (3%), quitosano (30 mg)	Liofilización	507-516 nm	Metformina HCl, EE= 4%	Gundogdu y Cetin 2014
	Quitosano con metanol	Relación no solvente y solvente de 10:1 y 40:1, Quitosano en ácido acético (2%), nobiletina (0.01%).	N/A	280-500 nm	Nobiletina, EE=69.1%	Luque-Alcaraz <i>et al.</i> 2012
	Quitosano con metanol	Quitosano (0.5%) en ácido acético (2%), aceites esenciales en metanol	N/A	117-250 nm	Aceites esenciales (aceite de lima y tomillo)	Sotelo <i>et al.</i> 2015
	Quitosano con policaprolactona (PCL)	Policaprolactona (100 mg), acetona (30 mL), aceite Myritol 318 (200 mg), Span 60 (40 mg), atrazina (10 mg), solución de quitosano @pH 4.	N/A	300-400 nm	Atrazina (herbicida) EE= 84 %	Grillo <i>et al.</i> 2013

Cuadro 3. Resumen de la técnica de coacervación compleja empleada para la fabricación de partículas de quitosano y la encapsulación de compuestos bioactivos.

Método	Materiales encapsulantes	Resumen	Técnica de secado	Rango de tamaños de partícula	Compuestos bioactivos encapsulados	Autor (es)
Coacervación compleja	Quitosano con pectina	Quitosano en ácido clorhídrico (0.1M), pH ajustado a 5.6 con hidróxido de sodio (0.2M), pectina (5mg/mL)	Liofilización	Tamaños irregulares menores a 5 µm	Aceite de palma con alto % de carotenoides EE = 52.2%	Rutz et al. 2017
	Quitosano aislado de proteína de suero	Buffer de acetato (0.1M) a pH 5.5, GD quitosano 83, 94 y 96%, 1% quitosano y 1% WPI	Secado por atomización	765 nm	Extracto acuoso de ajo	Tavares y Zapata 2019
	Quitosano con goma arábica y STPP	Quitosano (2%) en ácido acético @45°C, goma arábica (1-10%) @pH 4.5-5, STPP 2%	N/A	5–10 µm	Mezcla de triglicéridos	de Butstrae n y Salaün 2014
	Quitosano con NaOH	Quitosano (0.5%) en agua destilada y NaOH (0.12, 0.25, 0.36 M)	Horno @30°C por 15 horas	2-12 µm	Limoneno	Souza et al. 2014
	Quitosano con NaOH	Quitosano (1%) con ácido acético (1%) en agua destilada, NaOH (1%), pH final 10.5.	N/A	2.6 µm	Nitrato de miconazol EE= 77.58–96.81%	Yuen et al. 2012
	Quitosano con NaOH	Quitosano (0.2, 0.5, 1 y 1.5%), NaOH (0.1-1.5%)	Horno de vacío @30°C	11-225 µm	Aceite de citronela EE=94.7-98.2%	Hsieh et al. 2006

Cuadro 4. Resumen de la técnica de ensamblaje capa por capa empleada para la fabricación de partículas de quitosano y la encapsulación de compuestos bioactivos.

Método	Materiales encapsulantes	Resumen	Técnica de secado	Rango de tamaños de partícula	Compuestos bioactivos encapsulados	Autor (es)
Ensamblaje capa por capa	Quitosano con tripolifosfato	Quitosano (1 g) en hidróxido de sodio (10 ml, 1 M), ácido acético (1%), TPP (1 mg/ml). Relación quitosano: TPP 3:1	Liofilización	194 nm	N/A	Sydow <i>et al.</i> 2019
	Quitosano con alginato	Quitosano (0.1-1%) en ácido láctico (1%), alginato (0.1-1%) en ácido láctico (1%), pH ajustado de 3 a 11 con NaOH (1 M)	N/A	700 nm	N/A	Acevedo-Fani <i>et al.</i> 2017
	Quitosano con alginato	Plantilla: Fe ₃ O ₄ , 20 ml de etanol en 10 ml de agua y 0.25 g de Fe ₃ O ₄ , 40 ml de solución de alginato (50%), quitosano (10 mg/ml) en ácido acético (1%)	N/A	120-200 nm	Curcumina EE= 67.5%	Song <i>et al.</i> 2018
	Quitosano con glutaraldehído	Plantilla; sílice, sal sódica (0,025 M), NaCl (0.5 M), buffer acetato (0.2 M) de pH 3,5, quitosano (0.5%) en ácido acético (1%), glutaraldehído (2.5%)	N/A	150 nm	Pectinasa	Lei y Bi 2007
	Quitosano con STPP	Plantilla: Lignina, quitosano (1%) en ácido acético (0.1 M), STPP (6%), ciprofloxacina (20 mg/ml) en aceite de oliva (2 mg/ml)	N/A	97 nm	ciprofloxacina	Zou <i>et al.</i> 2019
	Quitosano con glutaraldehído	Quitosano (2%) en ácido acético y 40 mg de cloruro de metileno, glutaraldehído en parafina líquida, 10 ml dextrano sódico (6 mg/ml)	Liofilización	292.1 nm	Paclitaxel EE= 66.3%	Wang <i>et al.</i> 2020

Oportunidades para la producción de encapsulados en Zamorano

La producción de micro o nanopartículas para la encapsulación de compuestos bioactivos supone una gran oportunidad de investigación y desarrollo para Zamorano. El desarrollo de enfoques de investigación, tesis, prácticas e incluso algún día, aprender haciendo basado en esta temática supone un gran avance en el desarrollo de la universidad. La técnica de encapsulación puede utilizarse para el mejor aprovechamiento de residuos orgánicos producidos en plantas de procesamiento.

Con el uso de micro y nanopartículas se puede encapsular compuestos como: aceites esenciales, enzimas, probióticos y prebióticos, vitaminas, sabores, antioxidantes, pigmentos, entre otros. La importancia del uso de micro o nanopartículas para la encapsulación de estos compuestos reside en que, podemos protegerlos de condiciones externas adversas (temperatura, pH, luz, oxígeno, iones metálicos, enzimas, y exposición al agua) y prolongar su vida útil. Actualmente, residuos orgánicos de diferentes áreas productivas en Zamorano podrían aprovecharse para generar valor utilizando dichos residuos en la extracción de compuestos de interés.

Se podrían extraer compuestos bioactivos como la bromelina presente en el corazón de la piña que generalmente se desecha en planta de hortofrutícola. La bromelina obtenida podría encapsularse (para prolongar vida útil en almacenamiento) y usarse en salmuera para el ablandamiento de carne en la planta de cárnicos. Además, a partir de los residuos de la papaya se podría extraer la enzima papaína, que también tiene la misma función de ablandar la carne en la industria cárnica. También, se podría extraer el pigmento antocianina de los desechos (flores, frutas, hojas, tallos) de frutas como la Jamaica, arándano, sandía, entre otras. Este pigmento podría utilizarse para la coloración de diferentes productos que lo requieran en Zamorano, como por ejemplo el yogurt de fresa en la planta de Lácteos.

La extracción de terpenoides (aceites esenciales como limoneno, linalool, decanal y octanal, y carotenoides como carotenos y xantofilas) y vitaminas liposolubles (A, D, E, K) presentes en las cascara de algunas frutas también supone una oportunidad para el aprovechamiento de residuos para la generación de valor. El uso de compuestos bioactivos encapsulados, como probióticos, terpenoides, vitaminas y antioxidantes, en la formulación de alimentos supone una orientación funcional, al mejorar las propiedades saludables de dichos alimentos, respondiendo a la tendencia salud. El desarrollo de nuevas líneas de investigación de micro/nano-encapsulación en Zamorano es una gran oportunidad del desarrollo de conocimientos en los estudiantes, adaptados al panorama actual del sector agroindustrial, tanto para su futuro lejano como cercano.

Limitaciones para producción a gran escala en Zamorano

Honduras es un gran productor de mariscos y los residuos generados de esta industria es grande, lo cual constituiría una gran oportunidad para Zamorano para obtener dichos residuos y procesarlos para la obtención de quitosano a partir de la quitina. Sin embargo, a pesar de la gran oportunidad de Zamorano para la obtención de quitosano y de que, este tema de investigación tiene una amplia gama de aplicaciones en diferentes ramas, existen diferentes limitantes en el campus al momento de producir y caracterizar a grandes escalas dichas micro/nanopartículas. Empezando por la producción a gran escala, Zamorano no cuenta con una gran fuente de residuos de los cuales extraer compuestos bioactivos útiles para su aprovechamiento mediante la encapsulación. La planta

hortofrutícola constituye actualmente la mayor fuente de residuos de este tipo en Zamorano, pero no es suficiente para una producción a gran escala.

Otra limitante es la obtención de los reactivos necesarios para extraer dichos compuestos bioactivos de los residuos a una gran escala. Se necesitarían grandes cantidades de solvente (diferente para cada tipo de compuesto bioactivo) para extraer grandes cantidades de compuestos bioactivos, tomando en cuenta la baja concentración que suelen encontrarse en dichos residuos. Otra limitante es el secador por aspersion que se encuentra en la planta PIA, debido a que este es un secador a nivel de laboratorio, no es un secador industrial, lo cual limita el secado de grandes cantidades de material. Dicho secador está más enfocado a la investigación que a la producción a gran escala a nivel industrial.

Como desarrollé en el documento, al momento de caracterizar las micro/nanopartículas fabricadas se necesitan diferentes equipos, que en su mayoría no se tienen en Zamorano. Para determinar el potencial zeta se requiere un equipo llamado “Zetasizer Nano ZS”, el cual no se tiene en Zamorano. Para determinar la morfología y tamaño de partícula se pueden usar varios equipos, pero para determinar tamaños a escala nanométrica se requiere un microscopio electrónico de barrido y en Zamorano solo se cuenta con un microscopio óptico a 400x que podría servir a escala micrométrica pero no nanométrica. Para determinar estabilidad térmica se necesitan diferentes equipos que indico en el documento (TGA, DTA, ITC, DSC), los cuales no están en Zamorano.

En base a las oportunidades y las limitantes en Zamorano se puede crear un plan a mediano o largo plazo para hacer posible el aprovechamiento de residuos y posterior encapsulación de compuestos bioactivos presentes en estos, con el objetivo de ser más eficientes y generar recursos a partir de los residuos de otros procesos.

4. CONCLUSIONES

- Se recopiló información de 205 artículos y tres libros de bases de datos confiables en inglés y español para el desarrollo de esta revisión de literatura.
- Se estableció que el quitosano es un biopolímero muy utilizado en la industria alimentaria para la producción de micro y nanopartículas para encapsular compuestos bioactivos usados en la industria alimenticia.
- Se determinó que existen diversas técnicas usadas para la fabricación de micro y nanopartículas de quitosano que, según sus características, nos pueden ayudar a formar encapsulados con diversas propiedades físicas y químicas; siendo los métodos más utilizados nanoprecipitación, coacervación y secado por aspersión.
- Considerando que las micro y nanopartículas se usan para encapsular compuestos bioactivos, aceites esenciales, probióticos, vitaminas, pigmentos o colorantes naturales, antioxidantes y sabores; esto abre las posibilidades de desarrollar una línea de investigación en Zamorano para el uso de los compuestos bioactivos presentes en algunos residuos orgánicos de algunas plantas de proceso en el campus universitario.

5. RECOMENDACIONES

- Usar los desechos orgánicos de la planta hortofrutícola para extraer sus compuestos, encapsularlos y luego usarlos como ingrediente bioactivo en productos terminados como lácteos, cárnicos y panadería.
- Investigar sobre otros biopolímeros además del quitosano, para la producción de capsulas. Por ejemplo, proteínas, gomas, y otros compuestos de grado alimenticio.
- Identificar áreas de zamorano aptas para la producción de partículas a pequeña y gran escala.

6. LITERATURA CITADA

- Abraham J, Mohammed AP, Ajith Kumar MP, George SC, Thomas S. 2018. Thermoanalytical Techniques of Nanomaterials. En: Characterization of Nanomaterials. Elsevier. p. 213-236. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-101973-3.00008-0>.
- Acevedo-Fani A, Salvia-Trujillo L, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O. 2017. Layer-by-Layer Assembly of Food-Grade Alginate/Chitosan Nanolaminates: Formation and Physicochemical Characterization. *Food Biophysics*. 12(3):299–308. <http://dx.doi.org/10.1007/s11483-017-9486-3>.
- Aloys, H., Korma, S. A., Marie Alice, T., Chantal, N., Ali, A. H., Abed, S. M., Ildephonse, H. 763 2016. Microencapsulation by complex coacervation: methods, techniques, benefits, and 764 applications-A review. *American Journal of Food Science and Nutrition Research*, 3(6), 188- 765 192. https://www.researchgate.net/publication/326186301_Microencapsulation_by_Complex_Coacervation_Methods_Techniques_Benefits_and_Applications_-_A_Review
- Amoako-Gyampah K., Acquah M. 2008. Manufacturing strategy, competitive strategy and firm performance: An empirical study in a developing economy environment. *International Journal of Production Economics*. Volume 111, Issue 2. Pages 575-592. ISSN 0925-5273. <https://doi.org/10.1016/j.ijpe.2007.02.030>.
- Andersen T, Strand BL, Formo K, Alsberg E, Christensen BE. 2011. Chapter 9. Alginates as biomaterials in tissue engineering. En: *Carbohydrate Chemistry*. Royal Society of Chemistry. p. 227–258. <http://dx.doi.org/10.1039/9781849732765-00227>.
- Antoniraj, M. G., Leena, M. M., Moses, J. A. & Anandharamakrishnan, C. 2019. Cross-linked chitosan microparticles preparation by modified three fluid nozzle spray drying approach. *International Journal of Biological Macromolecules*. ISSN 0141-8130. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.254>.
- Ariga K, Ahn E, Park M, Kim B. 2019. Layer-by-Layer Assembly: Recent Progress from Layered Assemblies to Layered Nanoarchitectonics. *Chem Asian J*. 14(15):2553–2566. <http://dx.doi.org/10.1002/asia.201900627>.
- Aronson J. Meyler L. 2016. Meyler's side effects of drugs: the international encyclopedia of adverse drug reactions and interactions. *The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions*. Pages 559-561. ISBN 9780444537164. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53717-1.00813-1>.
- Bah MG, Bilal HM, Wang J. 2020. Fabrication and application of complex microcapsules: a review. *Soft Matter*. 16(3):570–590. eng. doi:10.1039/C9SM01634A.
- Baheti A, Lokesh K, Bansal A. 2010. Excipients used in lyophilization of small molecules. En: *J. Excipients and Food Chem*. 1(1): 41-54. <https://ojs.abo.fi/ojs/index.php/jefc/article/view/21>.

- Barra A., Romero A., Beltramino J. 2012. obtención de quitosano. Escuela agropecuaria provincial de Gobernador de Gregores. Argentina. http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_peces/piscicultura/173-Quitosano.pdf.
- Bayraktar O, Erdoğan İ, Köse MD, Kalmaz G. 2017. Nanocarriers for Plant-Derived Natural Compounds. En: Nanostructures for Antimicrobial Therapy. Elsevier. p. 395–412. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-46152-8.00017-2>.
- Baysal K, Aroguz AZ, Adiguzel Z, Baysal BM. 2013. Chitosan/alginate crosslinked hydrogels: Preparation, characterization and application for cell growth purposes. *International Journal of Biological Macromolecules*. 59:342–348. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.073>.
- Butstraen C, Salaün F. 2014. Preparation of microcapsules by complex coacervation of gum Arabic and chitosan. *Carbohydrate Polymers*. 99:608–616. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.006>.
- Călinoiu L-F, Ștefănescu B, Pop I, Muntean L, Vodnar D. 2019. Chitosan Coating Applications in Probiotic Microencapsulation. *Coatings*. 9(3):194. <http://dx.doi.org/10.3390/coatings9030194>.
- Casettari L, Illum L. 2014. Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs. *Journal of Controlled Release*. 190:189–200. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.003>.
- Chandra Hembram K, Prabha S, Chandra R, Ahmed B, Nimesh S. 2014. Advances in preparation and characterization of chitosan nanoparticles for therapeutics. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 44(1):305–314. <http://dx.doi.org/10.3109/21691401.2014.948548>.
- Chávez de Paz, L. E., Resin, A., Howard, K. A., Sutherland, D. S., & Wejse, P. L. 2011. Antimicrobial effect of chitosan nanoparticles on streptococcus mutans biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 77(11), 3892–3895. <https://doi.org/10.1128/AEM.02941-10>.
- Chen H, Zhou X, Gao Y, Chen H, Zhou J. 2017. Fragment-Based Drug Design: Strategic Advances and Lessons Learned. En: *Comprehensive Medicinal Chemistry III*. Elsevier. p. 212–232. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12319-4>.
- Chiaromonti AN, Goguen JD, Garboczi EJ. 2017. Quantifying the 3-Dimensional Shape of Lunar Regolith Particles Using X-Ray Computed Tomography and Scanning Electron Microscopy at Sub- γ Resolution. *Microsc Microanal*. 23(S1):2194–2195. <https://doi.org/10.1017/s1431927617011631>.
- Chien R-C, Yen M-T, Mau J-L. 2016. Antimicrobial and antitumor activities of chitosan from shiitake stipes, compared to commercial chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers*. 138:259–264. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.061>.
- Chiu GNC, Abraham SA, Ickenstein LM, Ng R, Karlsson G, Edwards K, Wasan EK, Bally MB. 2005. Encapsulation of doxorubicin into thermosensitive liposomes via complexation with the transition metal manganese. *Journal of Controlled Release*. 104(2):271–288. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.02.009>.

- Coe J, Kupitz C, Basu S, Conrad CE, Roy-Chowdhury S, Fromme R, Fromme P. 2015. Crystallization of Photosystem II for Time-Resolved Structural Studies Using an X-ray Free Electron Laser. In: *Methods in Enzymology*. Elsevier. p. 459–482. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2015.01.011>.
- Correa S, Dreaden EC, Gu L, Hammond PT. 2016. Engineering nanolayered particles for modular drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 240:364–386. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.040>.
- Danley RL. 2002. New heat flux DSC measurement technique. *Thermochimica Acta*. 395(1-2):201–208. [http://dx.doi.org/10.1016/S0040-6031\(02\)00212-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-6031(02)00212-5).
- Das O, Kim N, Hedenqvist M, Bhattacharyya D. 2019. The flammability of biocomposites. *Durability and Life Prediction in Biocomposites, Fibre-Reinforced Composites and Hybrid Composites*. 335–365. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102290-0.00015-5>.
- Desai KGH, Jin Park H. 2005. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology*. 23(7):1361–139. <http://dx.doi.org/10.1081/DRT-200063478>.
- Díez-Pascual A, Shuttleworth P. 2014. Layer-by-Layer Assembly of Biopolyelectrolytes onto Thermo/pH-Responsive Micro/Nano-Gels. *Materials*. 7(11):7472–7512. <https://doi.org/10.3390/ma7117472>.
- Đorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A. *et al.* 2015. Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. *Food Eng Rev* 7, 452–490. <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9106-7>.
- Duarte DS, Nascimento JA de A, Britto D de. 2019. Scale-up in the synthesis of nanoparticles for encapsulation of agroindustrial active principles. *Ciênc agrotec*. 43. <http://dx.doi.org/10.1590/1413-7054201943023819>.
- Dubey S, Mody N, Sharma R, Agrawal U, Vyas SP. 2016. Nanobiomaterials. En: *Nanobiomaterials in Drug Delivery*. Elsevier. p. 111–146. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-42866-8.00004-6>.
- Ebnesajjad S. 2014. Surface and Material Characterization Techniques. *Surface Treatment of Materials for Adhesive Bonding*. 39–75. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-26435-8.00004-6>.
- Ebnesajjad S. 2016. Introduction to Plastics. En: *Chemical Resistance of Commodity Thermoplastics*. Elsevier. p. xiii–xxv. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-47358-3.00017-X>.
- Elieh-Ali-Komi D, Hamblin MR. 2016. Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials. *Int J Adv Res (Indore)*. 4(3):411–427. Obtenido de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27819009/>
- Ensign LM, Cone R, Hanes J. 2012. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 64(6):557–570. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2011.12.009>.
- Escobar D., Castro A., Vergara N. 2014. Determining the Relation between the Proportion of the Amino Group and the Degree of Deacetylation of Chitosan. *Revista de Ciencias*, 18(1), 73–88. Obtenido el 07 de Junio, 2020, desde

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-19352014000100006&lng=en&tlng=en.

- Eslamian M, Ashgriz N. 2011. Spray Drying, Spray Pyrolysis and Spray Freeze Drying. En: Handbook of Atomization and Sprays. Springer US. p. 849–860. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-7264-4_37.
- Estevinho B., Rocha F., Santos L., Alves A. 2013. Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications – A review. Trends in Food Science & Technology .Volume 31. Issue 2. Pages 138-155. ISSN 0924-2244. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.04.001>.
- Fang Z, Bhandari B. 2010. Encapsulation of polyphenols – a review. Trends in Food Science & Technology. 21(10):510–523. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003>.
- Fang Z, Bhandari B. 2012. Spray drying, freeze drying and related processes for food ingredient and nutraceutical encapsulation. En: Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals. Elsevier. p. 73–109. <http://dx.doi.org/10.1533/9780857095909.2.73>.
- FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO. 2019. The State of Food Security and Nutrition in the World 2019. Safeguarding against economic slowdowns and downturns. Rome, FAO. ISBN 978-92-5-131570-5. <http://www.fao.org/3/ca5162en/ca5162en.pdf>
- Farber L, Tardos G, Michaels JN. 2003. Use of X-ray tomography to study the porosity and morphology of granules. Powder Technology. 132(1):57–63. [https://doi.org/10.1016/s0032-5910\(03\)00043-3](https://doi.org/10.1016/s0032-5910(03)00043-3).
- Farré M, Kantiani L, Barceló D. 2012. Microfluidic Devices. En: Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications. Elsevier. p. 177–217. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384862-8.00007-8>.
- FDA. 31 de enero, 2007. 21 C.F.R. 170.30. https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf7/K070175.pdf.
- Fotticchia I, Fotticchia T, Mattia CA, Giancola C. 2016. Chitosan-based nanoparticles studied by isothermal titration calorimetry. J Therm Anal Calorim. 125(2):585–593. <http://dx.doi.org/10.1007/s10973-016-5334-9>.
- Fritsch RJ, Krause I. 2003. ELECTROPHORESIS. En: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Elsevier. p. 2055–2062. <http://dx.doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/01409-7>.
- Fuji M, Han YS, Takai C. 2013. Synthesis and Applications of Hollow Particles. KONA. 30(0):47–68. <http://dx.doi.org/10.14356/kona.2013009>.
- Gholami R, Fakhari N. 2017. Support Vector Machine: Principles, Parameters, and Applications. En: Handbook of Neural Computation. Elsevier. p. 515–535. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811318-9.00027-2>.
- Gibbs BF, Kermasha S, Alli I, Mulligan CN. 1999. Encapsulation in the food industry: a review. International Journal of Food Sciences and Nutrition. 50(3):213–224. <http://dx.doi.org/10.1080/096374899101256>.

- Gill P, Moghadam T, Ranjbar B. Differential scanning calorimetry techniques: applications in biology and nanoscience. *J Biomol Tech.* 2010;21(4):167-193. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2977967/>
- Giraldo, J.D., Campos-Requena, V.H. & Rivas, B.L. 2019. Chitosan–tripolyphosphate bead: the interactions that govern its formation. *Polym. Bull.* 76, 3879–3903. <https://doi.org/10.1007/s00289-018-2574-9>.
- Gonçalves VL, Laranjeira MCM, Fávere VT, Pedrosa RC. 2005. Effect of crosslinking agents on chitosan microspheres in controlled release of diclofenac sodium. *Polímeros.* 15(1):6–12. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-14282005000100005>.
- Grillo R, Rosa AH, Fraceto LF. 2013. Poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules carrying the herbicide atrazine: effect of chitosan-coating agent on physico-chemical stability and herbicide release profile. *Int J Environ Sci Technol.* 11(6):1691–1700. <http://dx.doi.org/10.1007/s13762-013-0358-1>.
- Gu X-L, Zhu X, Kong X-Z, Tan Y. 2010. Comparisons of simple and complex coacervations for preparation of sprayable insect sex pheromone microcapsules and release control of the encapsulated pheromone molecule. *Journal of Microencapsulation.* 27(4):355–364. <http://dx.doi.org/10.3109/02652040903221532>.
- Gulrez SK, Al-Assaf S, O G. 2011. Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications. En: *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications.* InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/24553>.
- Gundogdu N, Cetin M. 2014. Chitosan-poly (lactide-co-glycolide) (CS-PLGA) nanoparticles containing metformin HCl: preparation and in vitro evaluation. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences,* 27(6), 1923–1929. https://applications.emro.who.int/imemrf/Pak_J_Pharm_Sci/Pak_J_Pharm_Sci_2014_27_6_1923_1929.pdf
- Hartman F. 2018. El potencial Zeta y la química coloidal. International Association for Biologically Closed Electric Circuits (BCEC). <https://seryactuar.files.wordpress.com/2018/05/a-3-el-potencial-zeta-y-la-quimica-coloidal.pdf>
- Hermanson GT. 2013. Enzyme Modification and Conjugation. En: *Bioconjugate Techniques.* Elsevier. p. 951–957. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-382239-0.00022-4>.
- Herrera F., Betancur D., Segura M. 2014. Compuestos bioactivos de la dieta con potencial en la prevención de patologías relacionadas con sobrepeso y obesidad: péptidos biológicamente activos. *Nutrición Hospitalaria,* 29(1), 10-20. <https://dx.doi.org/10.3305/nh.2014.29.1.6990>.
- Höhne GWH, Hemminger WF, Flammersheim H-J. 2003. Types of Differential Scanning Calorimeters and Modes of Operation. En: *Differential Scanning Calorimetry.* Springer Berlin Heidelberg. p. 9–30. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-06710-9_2.
- 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):209–214. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.09.008>.

- Islam N, Dmour I, Taha MO. 2019. Degradability of chitosan micro/nanoparticles for pulmonary drug delivery. *Heliyon*. 5(5):e01684. <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01684>.
- Israelachvili, J. 2011. *Intermolecular and Surface Forces*, 3rd Edition. London, Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-21560-1>.
- Itoh Y, Matsusaki M, Kida T, Akashi M. 2004. Preparation of Biodegradable Hollow Nanocapsules by Silica Template Method. *Chem Lett*. 33(12):1552–1553. <http://dx.doi.org/10.1246/cl.2004.1552>.
- Jafari S. M. 2017. 1 - An overview of nanoencapsulation techniques and their classification. Editor(s): Seid Mahdi Jafari. *Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries*. Academic Press. Pages 1-34. ISBN 9780128094365. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809436-5.00001-X>.
- Jana Sougata, Jana Subrata. 2017. Natural polymeric biodegradable nanoblend for macromolecules delivery. En: *Recent Developments in Polymer Macro, Micro and Nano Blends*. Elsevier. p. 289–312. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100408-1.00010-8>.
- Jayanudin, Fahrurrozi Moh, Wirawan SK, Rochmadi. 2019. Preparation of Chitosan Microcapsules Containing Red Ginger Oleoresin Using Emulsion Crosslinking Method. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*. 17(1):228080001880991. <http://dx.doi.org/10.1177/2280800018809917>.
- Jeon YO, Lee J-S, Lee HG. 2016. Improving solubility, stability, and cellular uptake of resveratrol by nanoencapsulation with chitosan and γ -poly (glutamic acid). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 147:224–233. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.07.062>.
- Jin W, Xu W, Liang H, Li Y, Liu S, Li B. 2016. Nanoemulsions for food: properties, production, characterization, and applications. En: *Emulsions*. Elsevier. p. 1–36. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-804306-6.00001-5>.
- Jose AJ, Mohan K, Vavachan A. 2019. Alginate Hydrogel and Aerogel. En: *Alginates*. John Wiley & Sons, Inc. p. 59–77. <http://dx.doi.org/10.1002/9781119487999.ch4>.
- Joy D, Bradbury S, Ford B. 2019. Scanning electron microscope. *Encyclopædia Britannica*. <https://www.britannica.com/technology/scanning-electron-microscope>
- Joye IJ, McClements DJ. 2013. Production of nanoparticles by anti-solvent precipitation for use in food systems. *Trends in Food Science & Technology*. 34(2):109–123. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2013.10.002>.
- Kadu PJ, Kushare SS, Thacker DD, Gattani SG. 2010. Enhancement of oral bioavailability of atorvastatin calcium by self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS). *Pharmaceutical Development and Technology*. 16(1):65–74. <http://dx.doi.org/10.3109/10837450903499333>.
- Kailasapathy, K. 2015. Bioencapsulation Technologies for Incorporating Bioactive Components into Functional Foods. In *Advances in Food Biotechnology*, R. Rai V (Ed.). <https://doi.org/10.1002/9781118864463.ch19>.
- Kangama A, Zeng D, Tian X, Fang J. 2018. Application of Chitosan Composite Flocculant in Tap Water Treatment. *Journal of Chemistry*. 2018:1–9. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/2768474>.

- Kantak C, Beyer S, Yobas L, Bansal T, Trau D. 2011. A ‘microfluidic pinball’ for on-chip generation of Layer-by-Layer polyelectrolyte microcapsules. *Lab Chip*. 11(6):1030. <http://dx.doi.org/10.1039/c0lc00381f>.
- Kašpar O, Jakubec M, Štěpánek F. 2013. Characterization of spray dried chitosan–TPP microparticles formed by two- and three-fluid nozzles. *Powder Technology*. 240:31–40. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2012.07.010>.
- Khan I, Elhissi A, Shah M, Alhnan MA, Ahmed W. 2013. Liposome-based carrier systems and devices used for pulmonary drug delivery. En: *Biomaterials and Medical Tribology*. Elsevier. p. 395–443. <http://dx.doi.org/10.1533/9780857092205.395>.
- Khatke V, Rathi M, Bhanavase V, Patil A. 2017. Effect of Nanoparticle Size on Heat Transfer Intensification. *ICIIME*. 5. 520-526. https://ijritcc.org/download/conferences/ICIIME_2017/ICIIME_2017_Track/1497591298_16-06-2017.pdf
- Kienzle-Sterzer, C.A., Rodriguez-Sanchez, D., Rha, C. 1982. Mechanical properties of chitosan films: Effect of solvent acid. *Makromol. Chem.* 183, 1353–1359. <https://doi.org/10.1002/macp.1982.021830528>.
- Kildeeva NR, Perminov PA, Vladimirov LV, Novikov VV, Mikhailov SN. 2009. About mechanism of chitosan cross-linking with glutaraldehyde. *Russ J Bioorg Chem*. 35(3):360–369. <http://dx.doi.org/10.1134/S106816200903011X>.
- Krstić M, Medarević Đ, Đuriš J, Ibrić S. 2018. Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) and self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) as lipid nanocarriers for improving dissolution rate and bioavailability of poorly soluble drugs. En: *Lipid Nanocarriers for Drug Targeting*. Elsevier. p. 473–508. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-813687-4.00012-8>.
- Kubota R, Nakamura K, Torigoe S, Hamachi I. 2020. The Power of Confocal Laser Scanning Microscopy in Supramolecular Chemistry: In situ Real-time Imaging of Stimuli-Responsive Multicomponent Supramolecular Hydrogels. *ChemistryOpen*. 9(1):67–79. <http://dx.doi.org/10.1002/open.201900328>.
- Kumar A, Dixit CK. 2017. Methods for characterization of nanoparticles. En: *Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids*. Elsevier. p. 43–58. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100557-6.00003-1>.
- Kurita, K., Tomita, K., Tada, T., Ishii, S., Nishimura, S.-I., Shimoda, K. 1993. Squid chitin as a potential alternative chitin source: Deacetylation behavior and characteristic properties. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* 31, 485–491. <https://doi.org/10.1002/pola.1993.080310220>.
- Labhassetwar V, Dorle A. 1991. A study on the zeta potential of microcapsules during ageing. *Journal of Microencapsulation*, 8(1), 83–85. <https://doi.org/10.3109/02652049109021861>.
- Lam RSH, Rogers MA. 2011. Activation Energy of Crystallization for Trihydroxystearin, Stearic Acid, and 12-Hydroxystearic Acid under Nonisothermal Cooling Conditions. *Crystal Growth & Design*. 11(8):3593–3599. <http://dx.doi.org/10.1021/cg200553t>.

- Lee M, Li W, Siu RK, Whang J, Zhang X, Soo C, Ting K, Wu BM. 2009. Biomimetic apatite-coated alginate/chitosan microparticles as osteogenic protein carriers. *Biomaterials*. 30(30):6094–6101. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.046>.
- Lei Z, Bi S. 2007. The silica-coated chitosan particle from a layer-by-layer approach for pectinase immobilization. *Enzyme and Microbial Technology*. 40(5):1442–1447. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.10.027>.
- Li J., Revol, J.-F., Marchessault, R. h. 1997. Effect of degree of deacetylation of chitin on the properties of chitin crystallites. *J. Appl. Polym. Sci.* 65, 373–380. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19970711\)65:2<373::AID-APP18>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19970711)65:2<373::AID-APP18>3.0.CO;2-0).
- Liu H, Nakagawa K, Kato D, Chaudhary D, Tadé MO. 2011. Enzyme encapsulation in freeze-dried bionanocomposites prepared from chitosan and xanthan gum blend. *Materials Chemistry and Physics*. 129(1–2):488–494. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matchemphys.2011.04.043>.
- Liu Q, Yao L, Shen Q, Nie Z, Guo M, Yao S. 2009. Layer-by-Layer Assembly of Polyelectrolyte and Nanoparticles, Monitored by Capillary Electrophoresis. *Chem Eur J*. 15(46):12828–12836. <http://dx.doi.org/10.1002/chem.200901998>.
- Liu Y, Chen G, Yang X, Deng H. 2019. Preparation of Layer-by-Layer Nanofiltration Membranes by Dynamic Deposition and Crosslinking. *Membranes*. 9(2):20. <http://dx.doi.org/10.3390/membranes9020020>.
- Loh JW, Schneider J, Carter M, Saunders M, Lim L-Y. 2010. Spinning Disc Processing Technology: Potential for Large-Scale Manufacture of Chitosan Nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 99(10):4326–4336. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.22145>.
- Lu B, Lv X, Le Y. 2019. Chitosan-Modified PLGA Nanoparticles for Control-Released Drug Delivery. *Polymers*. 11(2):304. <http://dx.doi.org/10.3390/polym11020304>.
- Luna J., López J., Jiménez O., Luna L. 2016. Microencapsulación de algunos compuestos bioactivos mediante secado por aspersion. *Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*, 5(10). Obtenido de: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5738794.pdf>.
- Luque-Alcaraz AG, Lizardi-Mendoza J, Goycoolea FM, Higuera-Ciajara I, Argüelles-Monal W. 2016. Preparation of chitosan nanoparticles by nanoprecipitation and their ability as a drug nanocarrier. *RSC Adv*. 6(64):59250–59256. <http://dx.doi.org/10.1039/C6RA06563E>.
- Luzzi LA, Gerraughty RJ. 1964. Effects of Selected Variables on the Extractability of Oils from Coacervate Capsules. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 53(4):429–431. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.2600530419>.
- Madalena DA, Pereira RN, Vicente AA, Ramos ÓL. 2019. New Insights on Bio-Based Micro- and Nanosystems in Food. En: *Encyclopedia of Food Chemistry*. Elsevier. p. 708–714. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21859-3>.
- Mansfield E. 2015. Recent advances in thermal analysis of nanoparticles. En: *Modeling, Characterization, and Production of Nanomaterials*. Elsevier. p. 167–178. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-78242-228-0.00006-5>.
- Martínez Rivas CJ, Tarhini M, Badri W, Miladi K, Greige-Gerges H, Nazari QA, Galindo Rodríguez SA, Román RÁ, Fessi H, Elaissari A. 2017. Nanoprecipitation process: From

- encapsulation to drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 532(1):66–81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.064>.
- Maurstad G, Kitamura S, Stokke BT. 2011. Isothermal titration calorimetry study of the polyelectrolyte complexation of xanthan and chitosan samples of different degree of polymerization. *Biopolymers*. 97(1):1–10. <http://dx.doi.org/10.1002/bip.21691>.
- Mayeen A, Shaji LK, Nair AK, Kalarikkal N. 2018. Morphological Characterization of Nanomaterials. En: *Characterization of Nanomaterials*. Elsevier. p. 335–364. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-101973-3.00012-2>
- Mazzei L, Ciurli S, Zambelli B. 2016. Isothermal Titration Calorimetry to Characterize Enzymatic Reactions. En: *Methods in Enzymology*. Elsevier. p. 215–236. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.mie.2015.07.022>.
- McClements D. 2015. *Nanoparticle- and Microparticle-based Delivery Systems*. Boca Raton: CRC Press, <https://doi.org/10.1201/b17280>.
- McShane MJ, Lvov YM. 2014. Electrostatic Self-Assembly: Layer-by-Layer. En: *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology, Third Edition*. Taylor & Francis. p. 1342–1358. <http://dx.doi.org/10.1081/E-ENN3-120013616>.
- Merriam-Webster. (n.d.). Sodium tripolyphosphate. In Merriam-Webster.com dictionary. Retrieved February 24, 2020, from <https://www.merriam-webster.com/dictionary/sodium%20tripolyphosphate>.
- Miladi K, Sfar S, Fessi H, Elaissari A. 2015. Encapsulation of alendronate sodium by nanoprecipitation and double emulsion: From preparation to *in vitro* studies. *Industrial Crops and Products*. 72:24–33. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.079>.
- Miladi K, Sfar S, Fessi H, Elaissari A. 2016. Nanoprecipitation Process: From Particle Preparation to In Vivo Applications. En: *Polymer Nanoparticles for Nanomedicines*. Springer International Publishing. p. 17–53. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-41421-8_2.
- Mitra A, Dey B. 2011. Chitosan microspheres in novel drug delivery systems. *Indian journal of pharmaceutical sciences*. 73(4):355–366. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3374549/> <https://doi.org/10.4103/0250-474X.95607>
- Monteiro OAC Jr, Airoidi C. 1999. Some studies of crosslinking chitosan–glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. *International Journal of Biological Macromolecules*. 26(2–3):119–128. [http://dx.doi.org/10.1016/s0141-8130\(99\)00068-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0141-8130(99)00068-9).
- Morales M. E., Ruiz M. A. 2016. 16 - Microencapsulation of probiotic cells: applications in nutraceutical and food industry. Editor(s): Alexandru Mihai Grumezescu. In *Nanotechnology in the Agri-Food Industry. Nutraceuticals*. Academic Press. Pages 627-668. ISBN 9780128043059. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804305-9.00016-6>.
- Moreno M, Domínguez M, Ambrosio R, Torres Arturo, Torres Alfonso, Rosales P, Itzmoyotl A. 2016. Amorphous, Polymorphous, and Microcrystalline Silicon Thin Films Deposited by Plasma at Low Temperatures. En: *Crystalline and Non-crystalline Solids*. InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/63522>.

- Morganti P, Danti S, Coltelli MB. 2018. Chitin and lignin to produce biocompatible tissues. *clinical-dermatology*. 01(01). <http://dx.doi.org/10.35841/clinical-dermatology.1.1.5-11>.
- Mukhopadhyay P, Chakraborty S, Bhattacharya S, Mishra R, Kundu PP. 2015. pH-sensitive chitosan/alginate core-shell nanoparticles for efficient and safe oral insulin delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*. 72:640–648. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.08.040>.
- Nagpal K, Singh SK, Mishra DN. 2010. Chitosan Nanoparticles: A Promising System in Novel Drug Delivery. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*. 58(11):1423–1430. <http://dx.doi.org/10.1248/cpb.58.1423>.
- Naskar S, Kuotsu K, Sharma S. 2018. Chitosan-based nanoparticles as drug delivery systems: a review on two decades of research. *Journal of Drug Targeting*. 27(4):379–393. <http://dx.doi.org/10.1080/1061186X.2018.1512112>.
- Nedovic V., Kalusevic A., Manojlovic V., Levic S., Bugarski B. 2011. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*. Volume 1. Pages 1806-1815. ISSN 2211-601X. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.265>.
- O’Sullivan JDB, Behnsen J, Starborg T, MacDonald AS, Phythian-Adams AT, Else KJ, Cruickshank SM, Withers PJ. 2017. X-ray micro-computed tomography (μ CT): an emerging opportunity in parasite imaging. *Parasitology*. 145(7):848–854. <https://doi.org/10.1017/s0031182017002074>.
- Orive G, Carcaboso AM, Hernández RM, Gascón AR, Pedraz JL. 2005. Biocompatibility Evaluation of Different Alginates and Alginate-Based Microcapsules. *Biomacromolecules*. 6(2):927–931. <http://dx.doi.org/10.1021/bm049380x>.
- Oyinloye TM, Yoon WB. 2020. Effect of Freeze-Drying on Quality and Grinding Process of Food Produce: A Review. *Processes*. 8(3):354. <http://dx.doi.org/10.3390/pr8030354>.
- Parra-Huertas R. 2011. Revisión: microencapsulación de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63(2), 5669-5684. ISSN 0304-2847 http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472010000200020&lng=en&tlng=es.
- Pereda M, Dufresne A, Aranguren MI, Marcovich NE. 2014. Polyelectrolyte films based on chitosan/olive oil and reinforced with cellulose nanocrystals. *Carbohydrate Polymers*. 101:1018–1026. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.046>.
- Peruzzi A, Mendez-Lango E, Zhang J, Kalemci M. 2015. Triple Point of Water. En: *Guide to the Realization of the ITS-90*. https://www.researchgate.net/publication/281118134_Triple_Point_of_Water.
- Piacentini E. 2016. Coacervation. En: *Encyclopedia of Membranes*. Springer Berlin Heidelberg. p. 422–424. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-44324-8_2019.
- Piacentini E. 2016. Coacervation. En: *Encyclopedia of Membranes*. Springer Berlin Heidelberg. p. 422–424. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-44324-8_2019.
- Poon L, Wilson LD, Headley JV. 2014. Chitosan-glutaraldehyde copolymers and their sorption properties. *Carbohydrate Polymers*. 109:92–101. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.086>.

- Poornima, K & Sinthiya, R. 2017. Application of Various Encapsulation Techniques in Food Industries. 2. 37-41. <http://www.ijlera.com/papers/v2-i10/18.201710515.pdf>
- R.C. Ropp. 2013 Chapter 2 - Group 17 (H, F, Cl, Br, I) Alkaline Earth Compounds. Editor(s): R.C. Ropp. Encyclopedia of the Alkaline Earth Compounds. Elsevier. Pages 25-104. ISBN 9780444595508. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59550-8.00002-8>.
- Rabea, E.I., Badawy, M.E.-T., Stevens, C.V., Smaghe, G., Steurbaut, W. 2003. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromolecules* 4, 1457–1465. <https://doi.org/10.1021/bm034130m>.
- Rajisha KR, Deepa B, Pothan LA, Thomas S. 2011. Thermomechanical and spectroscopic characterization of natural fibre composites. En: *Interface Engineering of Natural Fibre Composites for Maximum Performance*. Elsevier. p. 241-274. <http://dx.doi.org/10.1533/9780857092281.2.241>.
- Ramirez C., Delgado E., Andrade A. 2016. Determinación del grado de desacetilación de quitosana mediante titulación potenciométrica, FTIR y Raman. *Journal CIM*. 4. 769-776. Obtenido de: https://www.researchgate.net/publication/309493340_Determinacion_del_grado_de_desacetilacion_de_quitosana_mediante_titulacion_potenciometrica_FTIR_y_Raman#fullTextFileContent
- Rana VK, Pandey AK, Singh RP, Kumar B, Mishra S, Ha C-S. 2010. Enhancement of thermal stability and phase relaxation behavior of chitosan dissolved in aqueous l-lactic acid: Using ‘silver nanoparticles’ as nano filler. *Macromol Res*. 18(8):713–720. <http://dx.doi.org/10.1007/s13233-010-0801-9>.
- Rattanasak U, Kendall K. 2005. Pore structure of cement/pozzolan composites by X-ray microtomography. *Cement and Concrete Research*. 35(4):637–640. <https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2004.04.022>.
- Raval N, Maheshwari R, Kalyane D, Youngren-Ortiz SR, Chougule MB, Tekade RK. 2019. Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development. En: *Basic Fundamentals of Drug Delivery*. Elsevier. p. 369–400. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-817909-3.00010-8>.
- Rawat K, Bohidar H. 2014. Coacervation in Biopolymers. *Journal of Physical Chemistry & Biophysics*, 4, 1-21. <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0398.1000165>.
- Richardson JJ, Ejima H, Lörcher SL, Liang K, Senn P, Cui J, Caruso F. 2013. Preparation of Nano- and Microcapsules by Electrophoretic Polymer Assembly. *Angew Chem Int Ed*. 52(25):6455–6458. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201302092>.
- Rinaudo M, Pavlov G, Desbrières J. 1999. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polymer*. 40(25):7029–7032. [http://dx.doi.org/10.1016/S0032-3861\(99\)00056-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-3861(99)00056-7).
- Rossetti FC, Depieri LV, Bentley VLBM. 2013. Confocal Laser Scanning Microscopy as a Tool for the Investigation of Skin Drug Delivery Systems and Diagnosis of Skin Disorders. En: *Confocal Laser Microscopy - Principles and Applications in Medicine, Biology, and the Food Sciences*. InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/55995>.

- Ruiz Canizales J, Velderrain Rodríguez GR, Domínguez Avila JA, Preciado Saldaña AM, Alvarez Parrilla E, Villegas Ochoa MA, González Aguilar GA. 2018. Encapsulation to Protect Different Bioactives to Be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients. En: Reference Series in Phytochemistry. Springer International Publishing. p. 1–20. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-54528-8_84-1.
- Rutz JK, Borges CD, Zambiasi RC, Crizel-Cardozo MM, Kuck LS, Noreña CPZ. 2017. Microencapsulation of palm oil by complex coacervation for application in food systems. *Food Chemistry*. 220:59–66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.194>.
- Santos, D., Maurício, A. C., Sencadas, V., Santos, J. D., Fernandes, M. H., and Gomes, P. S. 2017. Spray Drying: An Overview. *Biomaterials - Physics and Chemistry - New Edition*. Rosario Pignatello and Teresa Musumeci. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72247>.
- Schiller R. 1991. The Stokes-Einstein law by macroscopic arguments. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation Part C Radiation Physics and Chemistry*. 37(3):549–550. [http://doi.org/10.1016/1359-0197\(91\)90033-X](http://doi.org/10.1016/1359-0197(91)90033-X).
- Schneider A, Feussner H. 2017. Diagnostic Procedures. En: *Biomedical Engineering in Gastrointestinal Surgery*. Elsevier. p. 87–220. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803230-5.00005-1>.
- Schubert S, Delaney, Jr JT, Schubert US. 2011. Nanoprecipitation and nanoformulation of polymers: from history to powerful possibilities beyond poly(lactic acid). *Soft Matter*. 7(5):1581–1588. <http://dx.doi.org/10.1039/C0SM00862A>.
- Serna L, Vallejo-Castillo V. 2013. Probiotic encapsulation. *Afr J Microbiol Res*. 7(40):4743–4753. <http://dx.doi.org/10.5897/AJMR2013.5718>.
- Sharma A, Sood K, Kaur J, Khatri M. 2019. Agrochemical loaded biocompatible chitosan nanoparticles for insect pest management. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 18:101079. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101079>.
- Shishir M.R.I., Xie L., Sun C., Zheng X., Chen W. 2018. Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends in Food Science & Technology*, 78, pp. 34-60. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.018>.
- Shrivastava A. 2018. Introduction to Plastics Engineering. En: *Introduction to Plastics Engineering*. Elsevier. p. 1–16. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-39500-7.00001-0>.
- silv O., Jakubec M., Štěpánek F. 2013. Characterization of spray dried chitosan–TPP microparticles formed by two- and three-fluid nozzles. *Powder Technology*. Volume 240. Pages 31-40. ISSN 0032-5910. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2012.07.010>.
- Silva, P. T., *et al.* 2014. Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. *Ciência Rural*, 44(7), 1304-1311. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20130971>.
- Silva-Espinoza MA, Ayed C, Foster T, Camacho M del M, Martínez-Navarrete N. 2019. The Impact of Freeze-Drying Conditions on the Physico-Chemical Properties and Bioactive Compounds of a Freeze-Dried Orange Puree. *Foods*. 9(1):32. <http://dx.doi.org/10.3390/foods9010032>.

- Slika L, Patra D. 2019. A short review on chemical properties, stability and nano-technological advances for curcumin delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 17(1):61–75. <http://dx.doi.org/10.1080/17425247.2020.1702644>.
- Smith D. 2012. Culture Collections. En: *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier. p. 73–118. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394318-7.00004-8>.
- Smith N, Raston C, Saunders M, Woodward R. 2006. *Synthesis of Magnetic Nanoparticles Using Spinning Disc Processing*. Boston Mass: Nano Science and Technology Institute. Vol. 1. <https://pdfs.semanticscholar.org/59eb/c79662e77cf7aa5022e2d11382f4ae1a2990.pdf>
- Song Q, Li D, Zhou Y, Yang J, Yang W, Zhou G, Wen J. 2014 may. Enhanced uptake and transport of (+)-catechin and (-)-epigallocatechin gallate in niosomal formulation by human intestinal Caco-2 cells. *IJN*.:2157. <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S59331>.
- Song W, Su X, Gregory D, Li W, Cai Z, Zhao X. 2018. Magnetic Alginate/Chitosan Nanoparticles for Targeted Delivery of Curcumin into Human Breast Cancer Cells. *Nanomaterials*. 8(11):907. <http://dx.doi.org/10.3390/nano8110907>.
- Sotelo M, Valverde G, Plascencia M, Correa Z, Jiménez A, Solorza J, Barrera L, Bautista S. 2015. Characterization of chitosan nanoparticles added with essential oils: In vitro effect on *Pectobacterium carotovorum*. *Revista mexicana de ingeniería química*. 14(3), 589-599. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382015000300003&lng=es&tlng=en.
- South AB, Whitmire RE, García AJ, Lyon LA. 2009. Centrifugal Deposition of Microgels for the Rapid Assembly of Nonfouling Thin Films. *ACS Appl Mater Interfaces*. 1(12):2747–2754. <http://dx.doi.org/10.1021/am9005435>.
- Souza JM, Caldas AL, Tohidi SD, Molina J, Souto AP, Fangueiro R, Zille A. 2014. Properties and controlled release of chitosan microencapsulated limonene oil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 24(6):691–698. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2014.11.007>.
- Srivastava VK, Yadav R. 2019. Isothermal titration calorimetry. En: *Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources*. Elsevier. p. 125–137. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-816548-5.00009-5>.
- Strobel SA, Scher HB, Nitin N, Jeoh T. 2016. In situ cross-linking of alginate during spray-drying to microencapsulate lipids in powder. *Food Hydrocolloids*. 58:141–149. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.02.031>.
- Sudarshan, N.R., Hoover, D.G., Knorr, D., 1992. Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnol*. 6, 257–272. <https://doi.org/10.1080/08905439209549838>.
- Sukhodub LB, Yanovska GO, V.M. VM, Martynyuk OO, Sukhodub LF, *et al.* 2016. Injectable Biopolymer-hydroxyapatite Hydrogels: Obtaining and their Characterization. *J Nano-Electron Phys*. 8(1):01032-1-01032–8. [http://dx.doi.org/10.21272/jnep.8\(1\).01032](http://dx.doi.org/10.21272/jnep.8(1).01032).
- Sydow S, de Cassan D, Hänsch R, Gengenbach TR, Easton CD, Thissen H, Menzel H. 2019. Layer-by-layer deposition of chitosan nanoparticles as drug-release coatings for PCL nanofibers. *Biomater Sci*. 7(1):233–246. <http://dx.doi.org/10.1039/C8BM00657A>.
- Szekalska M, Sosnowska K, Czajkowska-Kośnik A, Winnicka K. 2018. Calcium Chloride Modified Alginate Microparticles Formulated by the Spray Drying Process: A Strategy to

- Prolong the Release of Freely Soluble Drugs. *Materials*. 11(9):1522. doi:10.3390/ma11091522. <http://dx.doi.org/10.3390/ma11091522>.
- Szymańska E, Winnicka K. 2015. Stability of Chitosan—A Challenge for Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Marine Drugs*. 13(4):1819–1846. <http://dx.doi.org/10.3390/md13041819>.
- Tahara K, Sakai T, Yamamoto H, Takeuchi H, Kawashima Y. 2008. Establishing chitosan coated PLGA nanosphere platform loaded with wide variety of nucleic acid by complexation with cationic compound for gene delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 354(1–2):210–216. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.11.002>.
- Tanaka S. 1992. Theory of power-compensated DSC. *Thermochimica Acta*. 210:67–76. [http://dx.doi.org/10.1016/0040-6031\(92\)80277-4](http://dx.doi.org/10.1016/0040-6031(92)80277-4).
- Tanzi MC, Farè S, Candiani G. 2019. Techniques of Analysis. En: *Foundations of Biomaterials Engineering*. Elsevier. p. 393–469. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-101034-1.00007-4>.
- Tavares L, Zapata Noreña CP. 2019. Encapsulation of garlic extract using complex coacervation with whey protein isolate and chitosan as wall materials followed by spray drying. *Food Hydrocolloids*. 89:360–369. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.052>.
- Thai H, Thuy Nguyen C, Thi Thach L, Thi Tran M, Duc Mai H, Thi Thu Nguyen T, Duc Le G, Van Can M, Dai Tran L, Long Bach G, *et al.* 2020. Characterization of chitosan/alginate/lovastatin nanoparticles and investigation of their toxic effects in vitro and in vivo. *Sci Rep*. 10(1). <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-57666-8>.
- Tolaimate, A., Desbrières, J., Rhazi, M., Alagui, A., Vincendon, M., Vottero, P., 2000. On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. *Polymer* 41, 2463–2469. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(99\)00400-0](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(99)00400-0).
- Tsaih M., Chen R. 2003. The effect of reaction time and temperature during heterogenous alkali deacetylation on degree of deacetylation and molecular weight of resulting chitosan. *J. Appl. Polym. Sci.*, 88: 2917-2923. <https://doi.org/10.1002/app.11986>.
- Tsigos, I., Martinou, A., Kafetzopoulos, D., Bouriotis, V. 2000. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Trends Biotechnol.* 18, 305–312. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)01462-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01462-1).
- Turasan H, Bonilla J, Bozkurt F, Maldonado L, Li X, Yilmaz T, Sadeghi R, Kokini J. 2020. Comparison of the fabrication methods, formation dynamics, structure, and delivery performance of solid nanoparticles and hollow layer-by-layer edible/biodegradable nanodelivery systems. *Journal of Food Process Engineering*. 43(5). <http://doi.org/10.1111/jfpe.13413>.
- Vessal B. 1997. Amorphous Solids. En: *Computer Modeling in Inorganic Crystallography*. Elsevier. p. 295–332. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-012164135-1/50013-7>.
- Vyazovkin S. 2020. Activation Energies and Temperature Dependencies of the Rates of Crystallization and Melting of Polymers. *Polymers*. 12(5):1070. <http://dx.doi.org/10.3390/polym12051070>.

- Wandrey C., Bartkowiak A., Harding S.E. 2010. Materials for Encapsulation. In: Zuidam N., Nedovic V. (eds) Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1008-0_3.
- Wang F, Li J, Tang X, Huang K, Chen L. 2020. Polyelectrolyte three layer nanoparticles of chitosan/dextran sulfate/chitosan for dual drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 190:110925. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110925>.
- Wang L, Yang T, Ma G. 2015. Particle Design of Membrane Emulsification for Protein Drug and Vaccine Delivery. *CPD*. 21(19):2563–2598. <http://dx.doi.org/10.2174/1381612821666150416100031>.
- Wang S, Yu S, Siedler M, Ihnat PM, Filoti DI, Lu M, Zuo L. 2018. A power compensated differential scanning calorimeter for protein stability characterization. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 256:946–952. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2017.10.034>.
- Weinhold, M.X., Sauvageau, J.C.M., Keddig, N., Matzke, M., Tartsch, B., Grunwald, I., Kübel, C., Jastorff, B., Thöming, J. 2009. Strategy to improve the characterization of chitosan for sustainable biomedical applications: SAR guided multi-dimensional analysis. *Green Chem*. 11, 498–509. <https://doi.org/10.1039/B809941C>.
- Willard MA, Daniil M. 2013. Nanocrystalline Soft Magnetic Alloys Two Decades of Progress. En: *Handbook of Magnetic Materials*. Elsevier. p. 173–342. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-59593-5.00004-0>.
- Wisniewski, R. 2015. Spray drying technology review. 45th International Conference on Environmental Systems. <https://ttu-ir.tdl.org/handle/2346/64598>
- Wong TW, John P. 2016. Advances in Spray Drying Technology for Nanoparticle Formation. En: *Handbook of Nanoparticles*. Springer International Publishing. p. 329–346. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-15338-4_18.
- Xiao Z, Xu Z, Zhu G. 2017. Production and characterization of nanocapsules encapsulated linalool by ionic gelation method using chitosan as wall material. *Food Sci Technol*. 37(4):613–619. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457x.27616>.
- Xing N, Tian F, Yang J, Li YK. 2012. Preparation and Basic Characterizations of Alginate-Chitosan Hydrogel. *AMR*. 490–495:3396–3400. <http://dx.doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.490-495.3396>.
- Xu Y, Du Y. 2003. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 250(1):215–226. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(02\)00548-3](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(02)00548-3).
- Yadegari A, Fahimipour F, Rasoulianboroujeni M, Dashtimoghaddarm E, Omidi M, Golzar H, Tahriri M, Tayebi L. 2017. Specific considerations in scaffold design for oral tissue engineering. En: *Biomaterials for Oral and Dental Tissue Engineering*. Elsevier. p. 157–183. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100961-1.00010-4>.
- Yan N, Zhang M, Ni P. 1992. Size distribution and zeta-potential of polyamide microcapsules. *Journal of Membrane Science*, 72(2), 163–169. [https://doi.org/10.1016/0376-7388\(92\)80196-q](https://doi.org/10.1016/0376-7388(92)80196-q).

- Yan Y, Björnmalm M, Caruso F. 2013. Assembly of Layer-by-Layer Particles and Their Interactions with Biological Systems. *Chem Mater.* 26(1):452–460. <http://dx.doi.org/10.1021/cm402126n>.
- Yaneva Z, Ivanova D, Nikolova N, Tzanova M. 2020. The 21st century revival of chitosan in service to bio-organic chemistry. *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* 34(1):221–237. <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2020.1731333>.
- Yang W, Fu J, Wang T, He N. 2009. Chitosan/Sodium Tripolyphosphate Nanoparticles: Preparation, Characterization and Application as Drug Carrier. *j biomed nanotechnol.* 5(5):591–595. <http://dx.doi.org/10.1166/jbn.2009.1067>.
- Yang Y-X, Song Z-M, Cheng B, Xiang K, Chen X-X, Liu J-H, Cao A, Wang Y, Liu Y, Wang H. 2013. Evaluation of the toxicity of food additive silica nanoparticles on gastrointestinal cells. *J Appl Toxicol.* 34(4):424–435. <http://dx.doi.org/10.1002/jat.2962>.
- Yilmaz T, Maldonado L, Turasan H, Kokini J. 2019. Thermodynamic mechanism of particulation of sodium alginate and chitosan polyelectrolyte complexes as a function of charge ratio and order of addition. *Journal of Food Engineering.* 254:42–50. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.03.002>.
- Younes, I., Rinaudo, M., 2015. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Mar. Drugs* 13, 1133–1174. <https://doi.org/10.3390/md13031133>.
- Yuen C-WM, Yip J, Liu L, Cheuk K, Kan C-W, Cheung H-C, Cheng S-Y. 2012. Chitosan microcapsules loaded with either miconazole nitrate or clotrimazole, prepared via emulsion technique. *Carbohydrate Polymers.* 89(3):795–801. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.013>.
- Zhang F, Liu T-Y, Hou G-H, Guan R-F, Zhang J-H. 2018. Preparation of Paraffin@Poly(styrene-co-acrylic acid) Phase Change Nanocapsules via Combined Miniemulsion/Emulsion Polymerization. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology.* 18(6):4413–4417. <https://doi.org/10.1166/jnn.2018.15199>.
- Zhang Z., Law D., Lian G. 2010. Characterization method of encapsulates. En: *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing* (editado por N.J. Zuidam & V.A. Nedovic). Pp. 101–125. New York, USA: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1008-0_4.
- Zhang Z., Ortiz O., Goyal R., Kohn J. 2014. Chapter 23 - Biodegradable Polymers. Editor(s): Robert Lanza, Robert Langer, Joseph Vacanti. *Principles of Tissue Engineering* (Fourth Edition). Academic Press. Pages 441-473. ISBN 9780123983589. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398358-9.00023-9>.
- Zhao W, Nugroho RWN, Odellius K, Edlund U, Zhao C, Albertsson A-C. 2015. In Situ Cross-Linking of Stimuli-Responsive Hemicellulose Microgels during Spray Drying. *ACS Appl Mater Interfaces.* 7(7):4202–4215. <http://dx.doi.org/10.1021/am5084732>.
- Ziaee A, Albadarin AB, Padrela L, Femmer T, O'Reilly E, Walker G. 2019. Spray drying of pharmaceuticals and biopharmaceuticals: Critical parameters and experimental process

- optimization approaches. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 127:300–318. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2018.10.026>.
- Zou T, Sipponen MH, Österberg M. 2019. Natural Shape-Retaining Microcapsules With Shells Made of Chitosan-Coated Colloidal Lignin Particles. *Front Chem*. 7. <http://dx.doi.org/10.3389/fchem.2019.00370>.
- Zucca N, Erriu G, Onnis S, Longoni A. 2004. An analytical expression of the output of a power-compensated DSC in a wide temperature range. *Thermochimica Acta*. 413(1-2):117-125. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tca.2003.10.006>.
- Zuidam NJ. 2012. An industry perspective on the advantages and disadvantages of iron micronutrient delivery systems. En: *Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals*. Elsevier. p. 505–540. <http://dx.doi.org/10.1533/9780857095909.4.505>.