

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingeniería

**Evaluación de la microencapsulación de curcumina
empleando cera de abeja y manteca de cacao como
materiales encapsulantes**

Else Abigail Salcedo García

Ingeniería Química

Trabajo de fin de carrera presentado como
requisito para la obtención del título de
Ingeniero Químico

Quito, 20 de diciembre de 2021

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingeniería

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Evaluación de microencapsulación de curcumina empleando cera de
abeja y manteca de cacao como materiales encapsulantes**

Elsa Abigail Salcedo García

**Nombre del profesor, Título académico José Francisco Álvarez Barreto, Ph.D.
Juan Diego Fonseca Ashton, Ph.D.**

Quito, 20 de diciembre de 2021

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Else Abigail Salcedo García

Código: 00201314

Cédula de identidad: 1719672139

Lugar y fecha: Quito, de diciembre de 2021

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

La curcumina es una sustancia polifenólica lipofílica que ha tenido un gran impacto al ser un alimento funcional, debido a sus variadas actividades biológicas, como antioxidante y antimicrobiana, se ha convertido en un compuesto cotizado por la industria farmacéutica. Sin embargo, la lipofilidad extrema, la inestabilidad y su escasa biodisponibilidad son desafíos importantes que se deben controlar para poder optimizar las propiedades de este compuesto. Se han estudiado diversos métodos para proteger y aumentar la biodisponibilidad de la curcumina, siendo uno de estos métodos la microencapsulación. En este estudio se evaluó el uso de la manteca de cacao y la cera de abeja, materiales asequibles en el territorio ecuatoriano, como agentes microencapsulantes de la curcumina. Se estudiaron 3 variables de entrada: agente microencapsulante, relación fase acuosa/fase orgánica (FAc:FO), y la temperatura de emulsión de la cera de abeja. Como variables de respuesta se analizaron: morfología, tamaño de partícula y distribución, FTIR, eficiencia de encapsulación y liberación abrupta. Mediante los análisis se determinó que el tratamiento CA 3:1 (80°C) obtiene los mejores resultados teniendo un 98% de eficiencia de encapsulación y una liberación abrupta en promedio de 4% siendo esta estadísticamente igual al tratamiento CA 5:1 (80°C) y MC 5:1, tratamientos prometedores para encapsular curcumina.

Palabras clave: microencapsulación, curcumina, manteca de cacao, cera de abeja, relación fase acuosa/fase orgánica, emulsión.

ABSTRACT

Curcumin is a lipophilic polyphenolic substance that has had a great impact as a functional food, due to its various biological activities, as an antioxidant and antimicrobial, it has become a compound valued by the pharmaceutical industry. However, extreme lipophilicity, instability, and poor bioavailability are major challenges that must be controlled to optimize the properties of this compound. Various methods have been studied to protect and increase the bioavailability of curcumin, one of these methods is microencapsulation. In this study, the use of cocoa butter and beeswax, affordable materials in Ecuadorian territory, as microencapsulating agents for curcumin was evaluated. 3 input variables were studied: microencapsulating agent, aqueous phase/organic phase ratio (FAc:FO), and beeswax emulsion temperature. As response variables, the following were analyzed: morphology, particle size and distribution, FTIR, encapsulation efficiency, and abrupt release. Through the analyzes, it was determined that the CA 3:1 (80°C) treatment obtains the best results, having a 98% encapsulation efficiency and an abrupt release on average of 4%, this being statistically equal to the CA 5:1 treatment (80°C) and MC 5:1, promising treatments for encapsulating curcumin.

Keywords: microencapsulation, curcumin, cocoa butter, beeswax, aqueous phase/organic phase ratio, emulsion.

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	10
2. METODOLOGÍA	14
2.1. Materiales y reactivos	14
2.2. Diseño experimental	14
2.2.1. Variables de entrada.....	14
2.2.2. Variables de respuesta.....	15
2.2.3. Ponderación de las variables de respuesta	15
2.3. Método de elaboración.....	16
Obtención de micropartículas	16
2.4. Caracterización de micropartículas.....	17
2.4.1. Morfología	17
2.4.2. Diámetro y distribución del tamaño de partícula.....	17
2.4.3. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	17
2.4.4. Eficiencia de encapsulación (%EE).....	18
2.4.5. Liberación abrupta o liberación “burst”	19
2.4.6. Análisis estadístico.....	19
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
3.1. Morfología de micropartículas	20
3.2. Diámetro de partícula.....	23
3.3. Distribución de tamaño de partícula	25
3.4. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	27
3.5. Eficiencia de encapsulación (%EE)	28
3.6. Liberación abrupta “Burst”	30
3.7. Ponderación de variables	33
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	34
REFERENCIAS.....	35
ANEXOS	40
ANEXO A: Ficha técnica de la oleoresina de cúrcuma	40
ANEXO B: Certificado de análisis de la oleoresina de cúrcuma.....	41
ANEXO C: Certificado de calidad de cera de abeja.....	42
ANEXO D: Preparación de micropartículas con distinta relación fase acuosa/fase orgánica.....	43
ANEXO E: Curva de calibración de curcumina (Bentacourt, 2021).....	43
ANEXO F: Tabla 6. Tamaño de partículas.....	44
ANEXO G: Estructuras químicas	44
ANEXO H: Resultados Minitab %EE	45
ANEXO I: Resultados Minitab Liberación.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de obtención de micropartículas (Bentacourt, 2021). -----	17
Figura 2. Microscopía electrónica de barrido (SEM) de las distintas micropartículas liofilizadas. -----	20
Figura 3. Microscopía electrónica de barrido (SEM) de las distintas micropartículas liofilizadas. -----	21
Figura 4. Micrografías de micropartículas de cera de abeja con curcumina. Lente objetivo: 40X.-----	22
Figura 5. Micrografías de micropartículas de manteca de cacao con curcumina. Lente objetivo: 40X. -----	23
Figura 6. Tamaño de micropartículas hechas con cera de abeja como material microencapsulante. -----	24
Figura 7. Tamaño de micropartículas hechas con manteca de cacao como material microencapsulante. -----	25
Figura 8. Distribución de tamaño de partículas. -----	26
Figura 9. Distribución de tamaño de partículas. -----	27

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tabla 1. Descripción de los tratamientos	15
Tabla 2. Descripción de las variables de entrada.....	16
Tabla 3. Descripción de las variables de respuesta.....	16
Tabla 4. Eficiencia de microencapsulación de los tratamientos.....	30
Tabla 5. Calificación ponderada de variables de respuesta de los tratamientos.....	34

1. INTRODUCCIÓN

La cúrcuma se adquiere de *Curcuma long L.*, una planta herbácea perenne (Kocaadam & ŞAnlier, 2015). La cúrcuma se usa para agregar sabor y color a diferentes platos, siendo una especia bastante importante en países asiáticos y se ha utilizado ampliamente para tratamientos médicos de diversas enfermedades durante al menos 2500 años (Nebbioso., et al, 2021), por lo tanto, la cúrcuma es considerada un alimento funcional. Los componentes de la cúrcuma incluyen los tres curcuminoides: curcumina, demetoxicurcumina y bisdemetoxicurcumina, así como aceites volátiles (tumerona, atlantona y zingiberona), azúcares, proteínas y resinas (Jurenka, 2009). La importancia de la cúrcuma en el tratamiento médico se debe principalmente a la curcumina, el componente más activo (Moballegh., et al, 2020).

La curcumina es una sustancia polifenólica lipofílica de color amarillo anaranjado que constituye del 2-5% de la cúrcuma en polvo (Kocaadam & ŞAnlier, 2015), y se produce industrialmente a partir de oleorresina de cúrcuma. Diversos estudios clínicos realizados han determinado que la estructura química de esta sustancia polifenólica presenta propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias, antiangiogénicas, antimutagénicas y antiagregantes plaquetarios. Gracias a estas propiedades, la curcumina tiene un efecto protector y preventivo frente a diversas enfermedades como el cáncer, enfermedades autoinmunes, neurológicas, metabólicas, pulmonares, hepáticas y cardiovascular (Moballegh., et al, 2020). En base a resultados altamente prometedores de los experimentos in vitro e in vivo, se determinó que se puede consumir dosis entre 4 y 8 g/día y dosis hasta 12 g/día de concentración del 95% de los tres curcuminoides (Hewlings & Kalman, 2017). La curcumina presenta inestabilidad química, fotodegradación, absorción insuficiente por parte del cuerpo, alta velocidad de metabolismo y alta eliminación del cuerpo, la curcumina por consiguiente tiene una biodisponibilidad limitada en el cuerpo (Goel, Kunnumakkara & Aggarwal, 2008). La curcumina es conocida por su baja biodisponibilidad (<0.01%), debido a la destrucción de

enzimas como UGT (UDP glucuronosiltransferasa), sulfotransferasa, alcohol deshidrogenasa y p450 (Shoba., et al, 1998). Algunos compuestos naturales, como piperina, quercetina y genisteína, pueden inhibir estas enzimas, lo que puede mejorar la biodisponibilidad (Sharma, Steward & Gescher, 2007). Por ejemplo, la piperina, un potenciador de la biodisponibilidad conocido, es el principal componente activo de la pimienta negra, y se asocia a un aumento del 2000% en la biodisponibilidad de la curcumina (Hewlings & Kalman, 2017). De igual manera se estudia la mejora de la biodisponibilidad a través de nuevas estrategias de administración, como nanopartículas, micropartículas, liposomas y complejos de fosfolípidos definidos (Patil., et al, 2009).

La microencapsulación es una técnica que propone superar las dificultades presentes en la curcumina, puesto que, retrasa los procesos de degradación, aumenta la biodisponibilidad, protege contra la evaporación y reacciones, incrementa la estabilidad del compuesto y corrige la solubilidad en medios acuosos (Gómez-Mascaraque., et al, 2017). La microencapsulación se puede definir como la tecnología de encapsular materiales con recubrimientos poliméricos delgados, que forman pequeñas partículas llamadas microcápsulas. El polímero actúa como película protectora aislando el núcleo y evitando el efecto de su exposición inadecuada, manteniendo las características funcionales y sensoriales del material encapsulado (Nata, Chen & Lee, 2014). Esta membrana se disuelve a través de un estímulo específico, liberando el núcleo en el momento ideal (Silva., et al, 2014). Las cápsulas se pueden clasificar según su tamaño: macrocápsulas ($> 5.000 \mu\text{m}$), microcápsulas ($0,2$ a $5.000 \mu\text{m}$) y nanocápsulas ($<0,2 \mu\text{m}$) (Silva., et al, 2014). La liberación en el momento y lugar adecuados es una propiedad sumamente importante en el proceso de encapsulación, mejorando la efectividad, reduciendo la dosis requerida de aditivos y ampliando las aplicaciones de compuestos de interés. Los principales factores que afectan las tasas de liberación están relacionados con las interacciones entre el material de la pared y el núcleo. Además, otros factores influyen en la liberación, como

la volatilidad del núcleo, la relación entre el núcleo y el material de la pared, el tamaño de partícula y el grado de viscosidad del material de la pared (Lu., et al, 2021).

La elección correcta del material de la pared o agente encapsulante es muy importante porque influye en la eficacia de encapsulación y la estabilidad de la microcápsula. El agente encapsulante ideal debe tener las siguientes características: no reactivo con el núcleo, capacidad para sellar y mantener el núcleo dentro de la cápsula, capacidad para proporcionar la máxima protección al núcleo contra condiciones adversas, carecer de un sabor desagradable en el caso de la aplicación en alimentos y viabilidad económica (Gharsallaoui., et al, 2007). La mayoría de los materiales de pared no tienen todas las propiedades deseadas, por lo que, una práctica común implica mezclar dos o más materiales (Lu., et al, 2021). Dichos materiales pueden seleccionarse entre una amplia variedad de polímeros naturales y sintéticos.

Se han realizado diferentes investigaciones de la microencapsulación de curcumina empleando diferentes agentes encapsulantes como carbohidratos, gomas, lípidos, aceites y grasas, materiales inorgánicos (sulfato de calcio y silicatos) y proteínas, siendo las matrices grasas las que han presentado mayor biodisponibilidad y resistencia fisiológicas (Dulbecco & Savarino, 2013). Los materiales más investigados para la microencapsulación de la curcumina han sido la goma arábica, almidón de maíz modificado, inulina y manteca de karité (Hajj Ali., et al, 2016)., estos materiales han mostrado prometedores resultados empleando secado por pulverización, y se han realizado diversos estudios de estos, por lo que no habría interés de seguir investigándolos. La cera de carnauba de igual manera ha mostrado prometedores resultados como agente microencapsulante, pero este material ha causado diversas dificultades puesto que emplea altas temperaturas para su emulsión y debido a que la curcumina tiene una temperatura de degradación de 180°C (Esatbeyoglu., et al, 2015), no resulta un material adecuado. Por lo tanto, en el presente estudio se busca implementar agentes encapsulantes asequibles en el territorio ecuatoriano, bajo costo y sencillo manejo, como son la cera de abeja

y la manteca de cacao, materias primas locales que han mostrado favorables resultados en la microencapsulación.

En este estudio se eligió la manteca de cacao por su disponibilidad en Ecuador, ya que el país es uno de los mayores productores y exportadores de cacao (Vega & Beillard, 2015). La manteca de cacao es una grasa natural procedente del haba de cacao. Su textura, dureza, tiempo de vida y su punto de fusión son valiosos en las industrias farmacéutica, alimentaria y cosmética. Sus propiedades lo convierten en un producto con un alto potencial para la elaboración de micropartículas (Bocanegra., et al, 2005). De igual manera se eligió la cera de abeja por su biodisponibilidad en Ecuador y por sus características, puesto que es una cera muy cristalina y se utiliza con frecuencia en la microencapsulación de fármacos para obtener una liberación controlada (Ranjha, Khan & Naseem, 2010).

El objetivo del presente estudio es evaluar el uso de la manteca de cacao y la cera de abeja como agentes microencapsulantes de la curcumina empleando el método de emulsión-evaporación de solvente, usando como surfactante Tween 80. El estudio es un trabajo complementario al trabajo de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos de Susana Bentacourt (2021) en la USFQ, por lo que, a partir de esta experiencia previa se establecieron las condiciones de elaboración de las micropartículas. Se evaluará la morfología, diámetro de partícula, eficiencia de microencapsulación (%EE) y liberación abrupta del uso de cada agente microencapsulante, modificando la variable de temperatura y manejando diferentes relaciones de fase acuosa/fase orgánica.

2. METODOLOGÍA

2.1. Materiales y reactivos

- Oleorresina de cúrcuma: Ecom Food Industries Corporation (Anexo A y B)
- Manteca de cacao 100% natural
- Cera de abeja premium: Apícola del Ecuador
- Tween 80: Polisorbato 80
- Acetato de etilo: Fisher Chemical
- Etanol potable 96%

2.2. Diseño experimental

Se aplicó un diseño al azar con arreglo factorial 2^2 que corresponde a la combinación de dos factores (agente encapsulante y relación fase acuosa/fase orgánica), propuesto por Bentacourt (2021). Se realizaron 9 tratamientos (Tabla 1), y 27 unidades experimentales, puesto que se realizó por triplicado.

Tabla 1. Descripción de los tratamientos.

Tratamientos	Temperatura (°C)	Agente encapsulante	Relación fase acuosa/fase orgánica
CA 3:1	65	Cera de abeja	3:1
CA 3:1	80	Cera de abeja	3:1
MC 3:1	40	Manteca de cacao	3:1
CA 5:1	65	Cera de abeja	5:1
CA 5:1	80	Cera de abeja	5:1
MC 5:1	40	Manteca de cacao	5:1
CA 7:1	65	Cera de abeja	7:1
CA 7:1	80	Cera de abeja	7:1
MC 7:1	40	Manteca de cacao	7:1

2.2.1. Variables de entrada

Se evaluaron 3 variables de entrada (Tabla 2), las matrices lipídicas como agentes microencapsulantes, la relación entre la fase acuosa y la fase orgánica (FAc:FO), siendo la fase

orgánica en la emulsión la solución del agente microencapsulante con el material a encapsular (curcumina) disuelta en un solvente orgánico, y la fase acuosa es la solución del surfactante o tensioactivo, que dispersa a la fase orgánica, permite la formación de las micropartículas y evita la dilución de FO. La tercera variante es la temperatura, al emplear la cera de abeja se debe calentar la solución acuosa, por lo que se estudia el uso de la solución acuosa a 65°C y 80°C.

Tabla 2. Descripción de las variables de entrada.

Variable de entrada	Especificaciones
Agente encapsulante	2 niveles: cera de abeja, manteca de caco
Relación fase acuosa/fase orgánica (FAc:FO)	3 niveles: 3:1 - 5:1 - 7:1
Temperatura	2 niveles: 65 – 80° C

2.2.2. Variables de respuesta

Se establecieron tres variables de respuesta (Tabla 3).

Tabla 3. Descripción de las variables de respuesta.

Variable de respuesta	Especificación
Eficiencia de encapsulación (%EE)	Mayor eficiencia
Liberación abrupta o “burst release”	Menor liberación
Tamaño de partícula	Depende de la aplicación

2.2.3. Ponderación de las variables de respuesta

Se recopilaron los resultados de respuesta de cada tratamiento, siendo la eficiencia de encapsulación (%EE) la más importante, con una puntuación de 2, puesto que esta nos indica la efectividad y rendimiento de la microencapsulación. Mientras que, la liberación abrupta nos

indica la vida útil que tendría la micropartícula, y tendrá una puntuación de 1.

2.3. Método de elaboración

Obtención de micropartículas

Se empleó el método de emulsión- evaporación de solvente, donde la matriz lipídica (manteca de cacao o cera de abeja) que contiene al compuesto activo (curcumina) es disuelto en un solvente orgánico, en este caso acetato de etilo (5% p/v) y la emulsificación se generó en una fase acuosa de Tween 80 al 0,5%. Las condiciones de experimentación se determinaron mediante pruebas preliminares desarrolladas en el laboratorio de Biomateriales de la Universidad San Francisco de Quito.

La fase orgánica se desarrolló al mezclar 1g de la matriz lipídica 5% p/v con 0,1 g de la oleorresina de cúrcuma, 10% p/v, en 20 mL de acetato de etilo. Para disolver la matriz lipídica se calentó la solución a 40°C para MC y 65°C para CA (Anexo C), la solución se cubrió con parafilm para evitar la evaporación del acetato. Para la fase acuosa se agregó la cantidad de surfactante dependiendo del tratamiento (ANEXO D), para el caso de MC se mantuvo la fase acuosa a temperatura ambiente, y para CA se calentó a 65°C y 80°C. Considerando la fotosensibilidad de la curcumina, las soluciones fueron protegidas de la luz con papel aluminio.

Para la emulsión se empleó el homogeneizador de alta velocidad (High Speed Homogenizer – Adjustable XFK Modelo FSH-2A 0719018), se agregó primero la fase acuosa hasta alcanzar 1200 rpm y posteriormente se agregó la fase orgánica agitándose por 1 minuto, finalmente se agregó 50 ml de agua destilada a 4°C y se homogenizó por 10 segundos.

La evaporación de solvente es de 24 horas, por lo que se deja la solución cubierta con papel aluminio con huecos a 400 rpm. Finalmente se realiza un proceso de secado por liofilización por 49 horas (liofilizador BIOBASE, modelo BK-FD 10P).

En la figura 1 se presenta gráficamente el proceso de obtención de micropartículas.



Figura 1. Proceso de obtención de micropartículas (Bentacourt, 2021).

2.4. Caracterización de micropartículas

2.4.1. Morfología

Para obtener un mayor conocimiento sobre la morfología de las micropartículas, se realizó un análisis mediante la microscopía electrónica de barrido (SEM), JSM -IT300 Scanning Electron Microscope (Tokyo – Japón). Las micropartículas liofilizadas se colocaron con cinta de carbono sobre topes metálicos y se colocaron en celdas peltier. Se trabajó a -10°C y las imágenes se obtuvieron a 20 kV 50 Pa, con diferentes aumentos: 200X, 500X, 1000X y 2000X.

2.4.2. Diámetro y distribución del tamaño de partícula

Se tomaron micrografías con el microscopio LEICA DM 500 utilizando el programa Leice Application Suite (LAS EZ) empleando un aumento de 40X. Se procesaron las micrografías con el programa Image J, el cual permite caracterizar de manera sistemática diferentes características de una imagen (González, 2018), para analizar el tamaño y la distribución del tamaño de partícula. Se analizaron 5 fotos por cada tratamiento, para generar el promedio del diámetro y diagrama de distribución de partículas.

2.4.3. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los grupos funcionales de las muestras se analizaron utilizando un espectrómetro infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR). Se empleó el espectrómetro FTIR Agilent Cary 630,

empleando el método análisis_usfq establecido en el laboratorio de micro de la USFQ, y con rango de 650-4000. Los diagramas obtenidos fueron procesados mediante el programa Origin8, el cual permitió realizar una línea de base para los diagramas y poder modificar estos para una mejor lectura.

2.4.4. Eficiencia de encapsulación (%EE)

La eficiencia de encapsulación se define por la concentración del material incorporado detectado en la formulación sobre la concentración inicial utilizada para elaborar la formulación (Piacentini, 2016). El objetivo es determinar la concentración de curcumina en el sobrenadante que no se encapsulo, para eso se lee la concentración empleando la espectroscopia UV-Vis (Hanon Instruments). Se aplicó una curva de calibración empleando soluciones estándar con concentraciones conocidas de curcumina en etanol potable al 96% (ANEXO E). La longitud de onda de la curcumina en etanol se obtuvo experimentalmente por Ariyaratna & Karunaratne, obteniendo que la longitud de máxima absorción (λ max) se observó a 427 nm (2016).

Se tomo una alícuota de 5 mL de la solución de micropartículas, después de las 24 horas de evaporación, y se filtró empleando un filtro PTFE 0,45 μ m. En tubos falcón que contenían 4500 μ L de etanol potable al 96% se agregó 500 μ L del filtrado, homogenizando la mezcla en vórtex durante 10 segundos.

Se empleo etanol potable al 96% como blanco en UV-Vis. Se midió la absorbancia de una solución de micropartículas sin curcumina como blanco, para restar esa concentración de la concentración con curcumina. Con la ecuación obtenida en la curva de calibración, fue calculada la concentración curcumina sin encapsular.

Se empleo la ecuación 1 para determinar %EE.

$$\%EE = \frac{\text{curcumina inicial total (g)} - \text{curcumina sin encapsular (g)}}{\text{curcumina inicial total (g)}} \times 100 \quad (1)$$

2.4.5. Liberación abrupta o liberación “burst”

En liberaciones controladas inmediatamente después de la colocación en el medio de liberación se libera una gran cantidad de la sustancia antes de que la velocidad de liberación alcance un perfil estable, a esto se conoce como liberación abrupta o “burst release”, y reduce la vida útil efectiva de la matriz (Cam., et al, 2020). Mostrando así el desarrollo de la matriz en las primeras horas con la explosión inicial, con lo que ayudará a determinar la tasa de liberación que se tendrá a partir de ese punto.

Para el estudio de liberación *in vitro* se preparó una suspensión de 2mg/mL de micropartículas liofilizadas en una solución de buffer fosfato salino (PBS) a pH 7.4 con 0.5% de Tween 80. Las suspensiones se dejaron en la incubadora a temperatura y velocidad de agitación constante de 37°C y 80 rpm respectivamente, por un periodo de 5 horas. Posteriormente al tiempo de liberación las muestras extraídas se filtraron con un tamaño de poro de 0,45 µm, colocando 500 µL del filtrado en 4500 µL de etanol potable al 96% y homogenizando en vórtex por 10 segundos. Se leyó la absorbancia en UV-Vis empleando como blanco etanol potable al 96%, con una longitud de onda de 427 nm. Se leyó la absorbancia de muestras con y sin curcumina.

Para calcular la concentración de curcumina liberada a las se empleó la ecuación 2:

$$\text{Concentración de curcumina (\%p/p)} = \frac{\text{masa de curcumina liberada (g)}}{\text{masa de curcumina inicial (g)}} \quad (2)$$

2.4.6. Análisis estadístico

El experimento se realizó por triplicado y los datos se utilizaron para análisis estadístico. La diferencia significativa se evaluó mediante ANOVA empleando el software Minitab® 20.2, 2021. Se trabajo con un nivel de confianza de 95% ($p \leq 0,05$), y con el método Tukey de múltiple comparación.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Morfología de micropartículas

Las estructuras morfológicas de las micropartículas examinadas por SEM se presentan en la figura 2 y 3. Para su estudio se trabajó con celdas peltier a -10°C para evitar la degradación de las partículas. Como se puede observar en las micrografías de la figura 2, la morfología de las microcápsulas con cera de abeja presenta una forma de hojuela achatada con bordes pronunciados y delgados, teniendo formas irregulares. Mientras que en la figura 3, podemos observar que las microcápsulas de manteca de cacao tienen una forma esférica lisa, formando claramente las esferas uniformes.

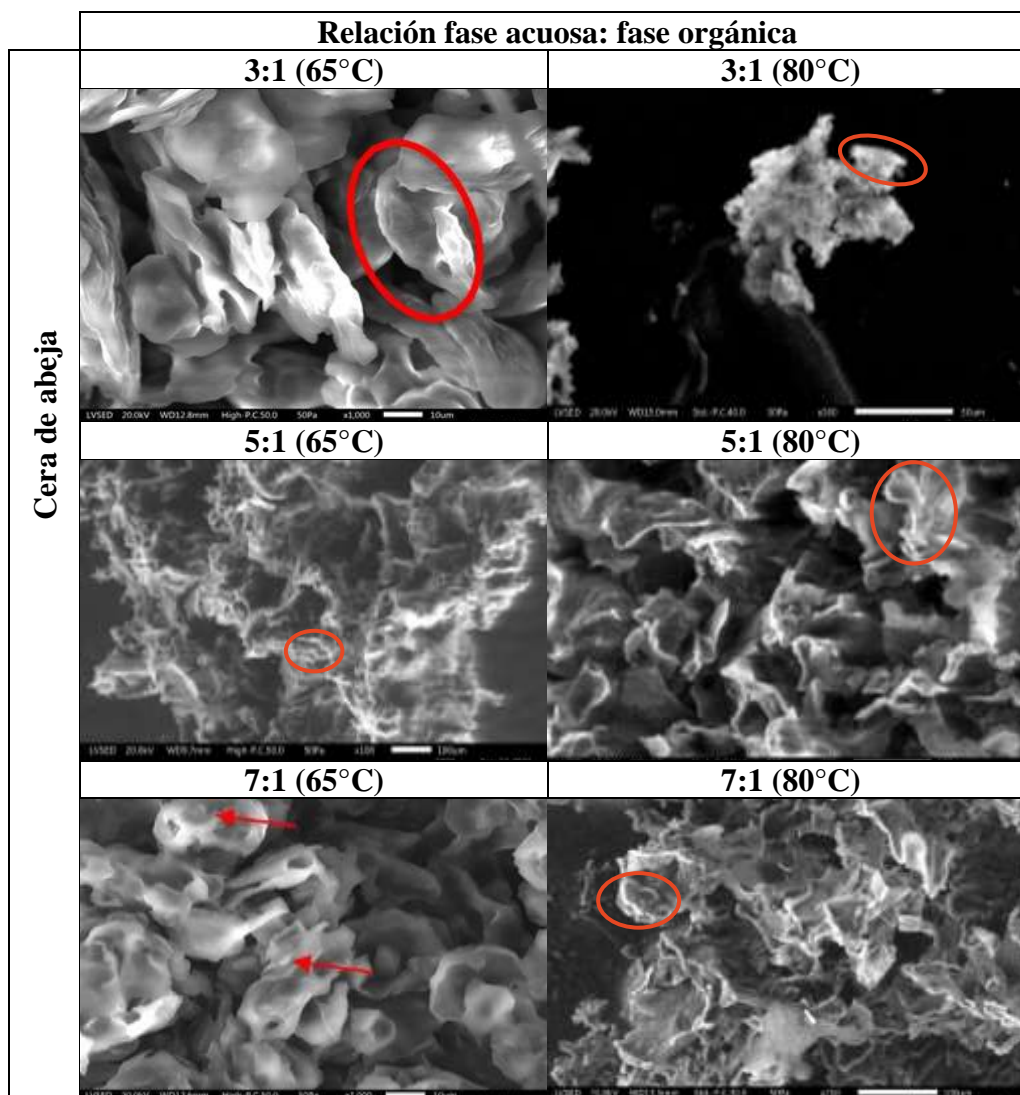


Figura 2. Microscopía electrónica de barrido (SEM) de las distintas micropartículas liofilizadas.

En la figura 2 tenemos que las figuras para los tratamientos 5:1, 3:1 (80°C) y 7:1 (80°C), no se logra apreciar de manera correcta la forma de las partículas sino solo su superficie filosa. Esto se debió a una degradación prematura de las partículas debido al aumento de calor en el proceso de lectura de SEM.

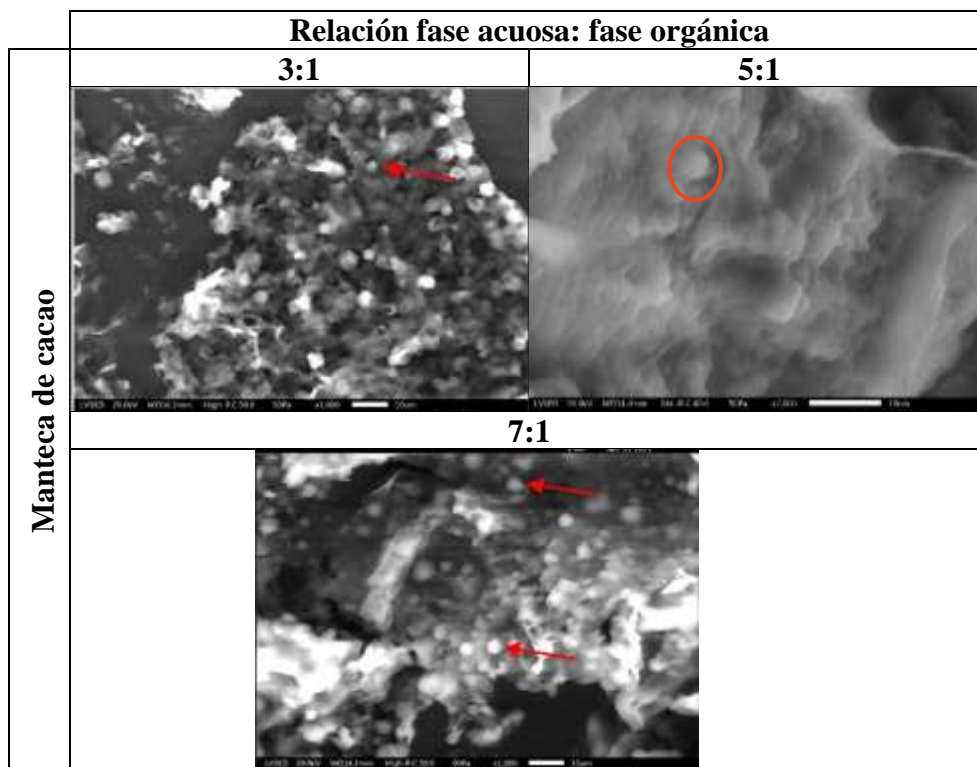


Figura 3. Microscopía electrónica de barrido (SEM) de las distintas micropartículas liofilizadas.

En la figura 3 de igual forma se observó un problema en la lectura del tratamiento 5:1, si bien se logra apreciar superficialmente que se formaron las esferas de partículas estas se encuentran degradadas por la temperatura, por lo que se observa que se están derritiendo.

En las figuras 4 y 5 se presentan las micrografías de las partículas empleando cada agente encapsulante. En primera instancia se puede observar cómo al emplear manteca de cacao se consiguen esferas con bordes lisos y uniformes, mientras que, al emplear cera de abeja se obtienen partículas achatadas, con irregularidades, como se analizó en SEM.

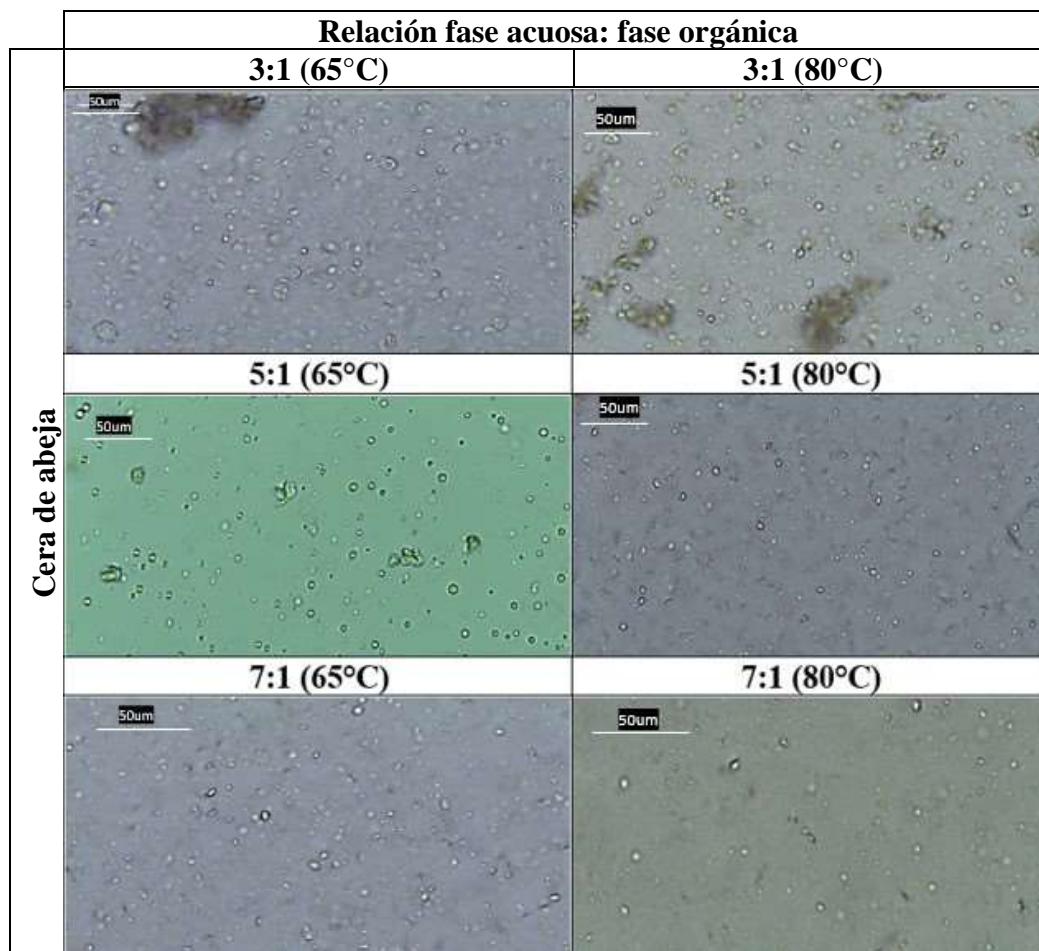


Figura 4. Micrografías de micropartículas de cera de abeja con curcumina. Lente objetivo: 40X.

Al emplear cera de abeja se obtuvieron aglomeración de micropartículas, las cuales no son deseadas, puesto que se necesitan partículas sueltas para su análisis. Podemos observar que estas aglomeraciones disminuyen conforme se incrementa la relación FAc:FO, esto se debe, a que a un mayor volumen de fase acuosa que se maneje se logra una emulsión más eficiente logrando desarrollar mejor las partículas. Varios estudios que han implementado ceras como agentes encapsulantes sugieren homogenizar las fases a temperaturas superiores a la temperatura de fusión de la matriz lipídica, puesto que, a una mayor temperatura se podría reducir la presencia de grumos (Nahum & Domb, 2021), y como podemos observar en la figura 4, con un aumento de la temperatura se logran partículas más sueltas. El aumento de temperatura previene una solidificación prematura de la cera de abeja, la cual evita que forme microcápsulas, y como indica Haghghat-Kharazi et al, se recomienda trabajar a una temperatura de al menos 90°C (2018).

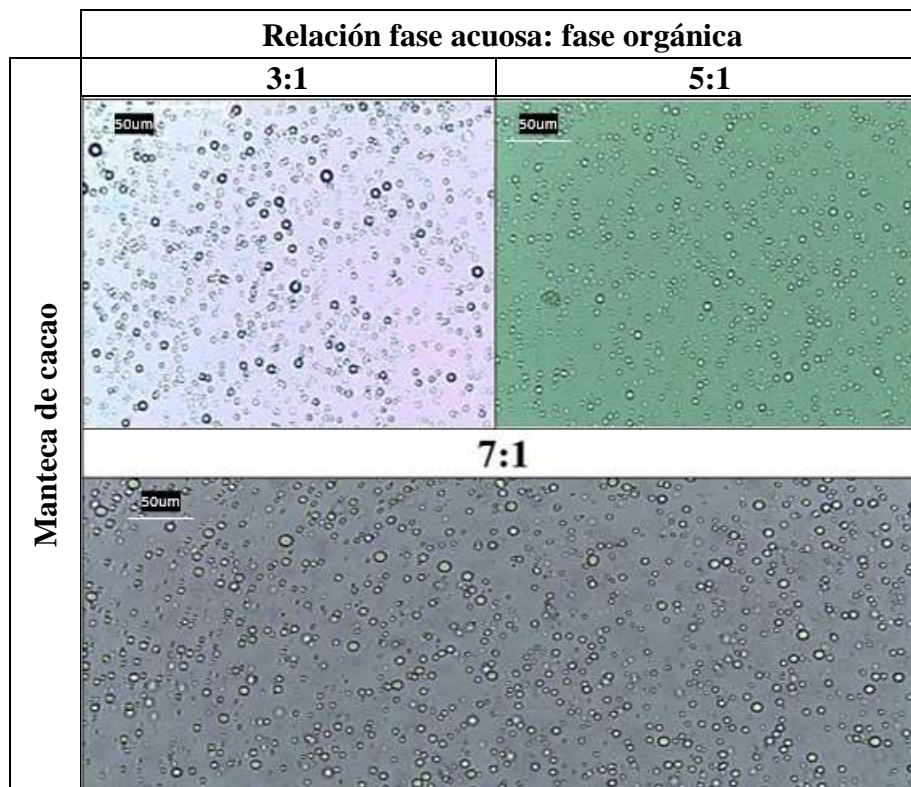


Figura 5. Micrografías de micropartículas de manteca de cacao con curcumina. Lente objetivo: 40X.

Al emplear manteca de cacao podemos observar que no se presentan aglomeraciones independientemente de la relación FAc:FO que se maneje. Investigaciones previas con manteca de cacao han obtenido resultados similares de partículas uniformes, siendo independientes al material a encapsular (Álvarez, 2020; Ponce, 2020). Con un aumento de la fase acuosa logramos apreciar la formación de más partículas, las cuales se analizarán posteriormente en el análisis de distribución.

En este análisis se puede determinar que el uso de manteca de cacao como material microencapsulante da una mejor morfología en el desarrollo de la micropartícula formando una estructura favorable para distintos análisis y para su implementación. De igual manera, este material resulta más favorable de manejar puesto que la temperatura no afecta en su desarrollo.

3.2. Diámetro de partícula

Se analizaron las fotos presentes en el apartado 3.1 en el programa ImageJ teniendo la barra de calibración de 50 (µm). Se dio un rango específico analizando visualmente la partícula

más grande que se podía observar en el microscopio, para evitar un error. En este trabajo no se desarrollaron los tratamientos CA 3:1 (65°C), CA 7:1 (65°C), MC 3:1 y MC 7:1, por lo que, para este apartado y para el 3.3 se emplearon los datos de la tesis de Betancourt (2021). En la tabla 5 (anexo F) se presenta con mayor detalle los valores obtenidos por cada tratamiento.

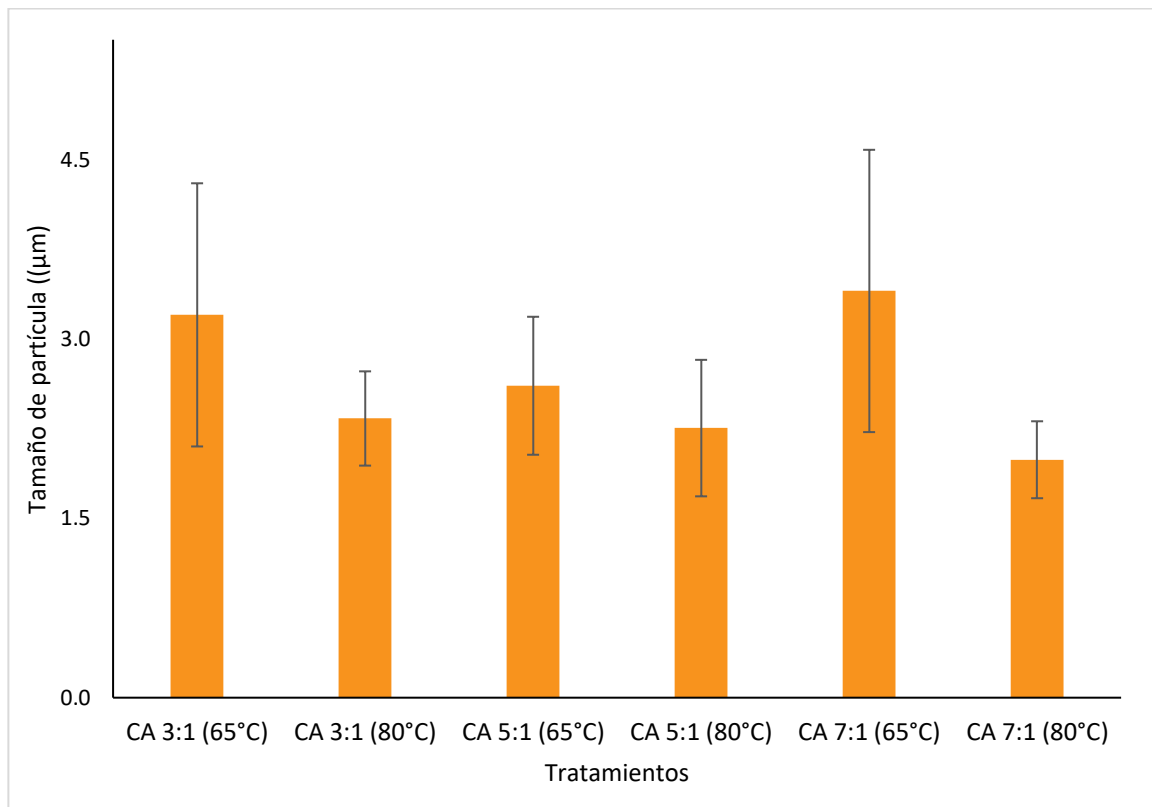


Figura 6. Tamaño de micropartículas hechas con cera de abeja como material microencapsulante.

Como se puede observar en la figura 6 se obtuvo un mayor diámetro en el tratamiento CA 7:1 (65°C) con un valor de 3.40μm. Este valor contradice el estudio de Becker, que sugiere que a un incremento de la fase acuosa se tiene un menor tamaño de partícula (2016). Sin embargo, el enunciado de Becker si se cumple para los tratamientos de temperatura de 80°C, donde el tratamiento CA 3:1 tiene un tamaño de 2.33μm y el tratamiento de CA 7:1 es 1.99μm, cumpliendo el decrecimiento conforme aumenta la relación FAc:FO. Por lo tanto, se puede inferir que el rango que se manejó para el tratamiento CA 7:1 (65°C) es erróneo, y se consideró el diámetro de aglomeraciones dentro del análisis de partículas, afectando así la media del tamaño de partícula. De igual manera mediante investigación se ha comprobado que un

incremento en la temperatura de emulsión ocasiona una disminución en el tamaño de las partículas (Zhao., et al, 2019).

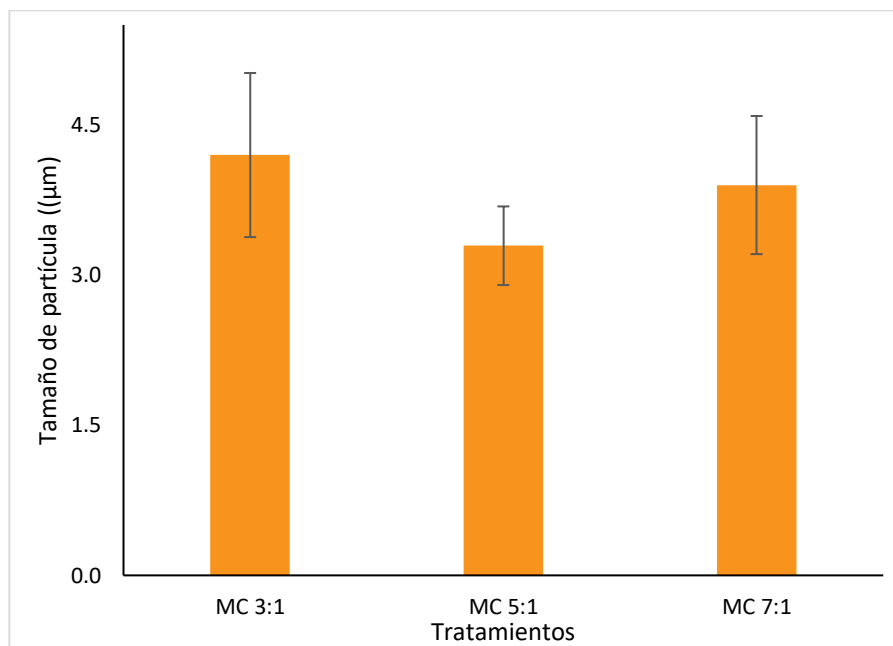


Figura 7. Tamaño de micropartículas hechas con manteca de cacao como material microencapsulante.

Como se puede observar en la figura 7 con el tratamiento MC 3:1 se obtuvo el mayor tamaño de partícula del estudio, siendo este de 4.20µm. Para la manteca de cacao podemos observar que al aumentar la relación FAc:FO se tiene una disminución en el tamaño de partícula, para el tratamiento MC 5:1 se obtuvo un tamaño promedio de 3.29µm y para MC 7:1 3.90µm, pero al analizar la desviación estándar que se obtuvo se puede inferir que no hay una diferencia destacable entre ambos tratamientos.

3.3. Distribución de tamaño de partícula

Para el análisis de distribución de partícula se tomó el histograma de ImageJ correspondiente a las imágenes analizadas en el apartado 3.1. Se debe mencionar que estos histogramas no representan los valores reportados en el inciso 3.2, puesto que, para ese caso se analizar 5 micrografías para sacar un promedio. En los histogramas se presenta el rango de

tamaño con el que se trabajó, la media y desviación estándar del tamaño de partícula, y el número de partículas presentes en la micrografía.

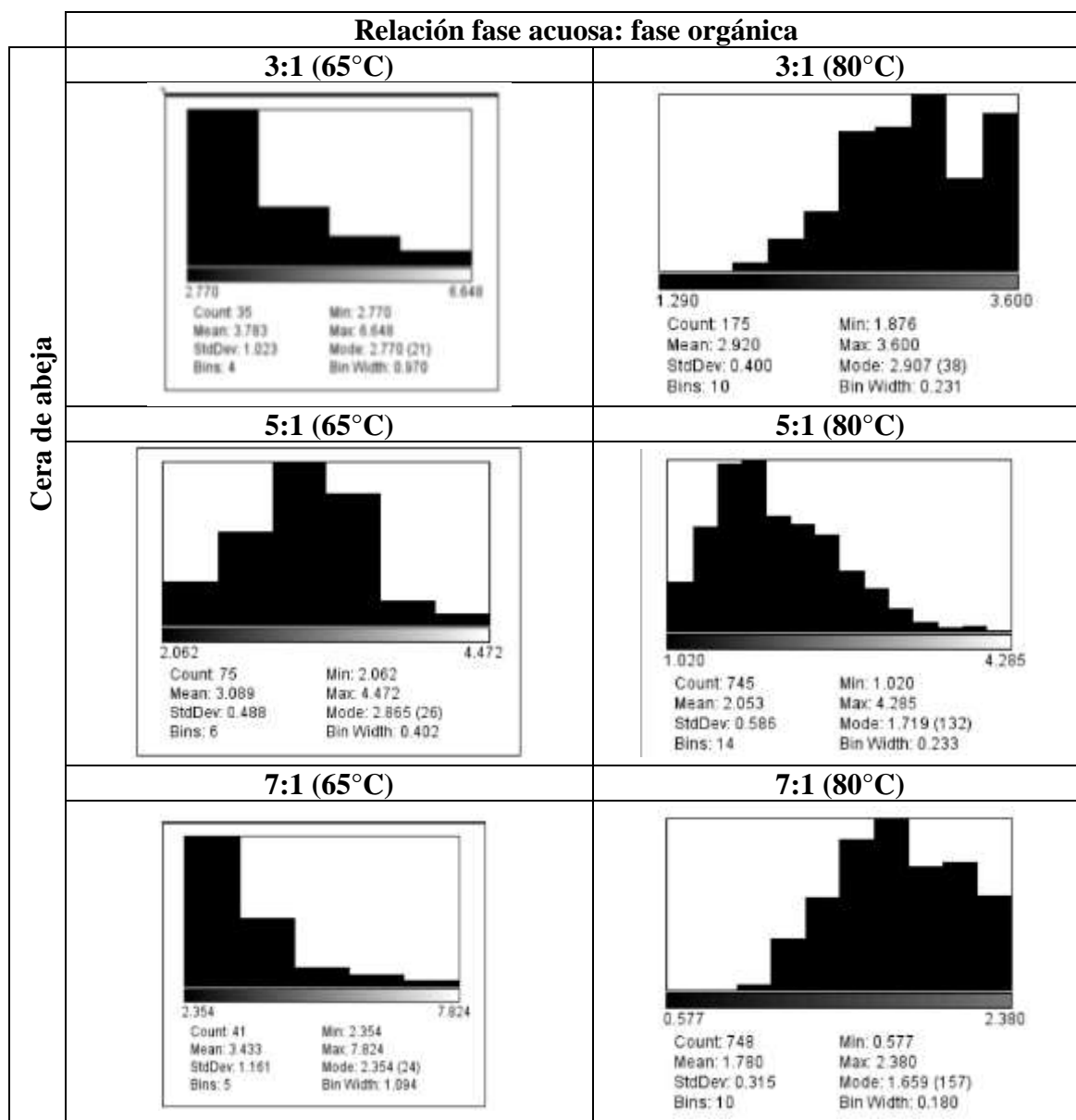


Figura 8. Distribución de tamaño de partículas.

En la figura 8 podemos analizar que los histogramas son asimétricos, mostrando una tendencia a una concentración mayor de partículas en el rango [2-3]μm, obteniendo solo en el tratamiento CA 7:1 (80°C) un rango inferior de 0.577μm. En el histograma del tratamiento CA 7:1 (65°C) se tiene un rango superior de 7.824μm, pero la distribución en este valor es mínima, por lo tanto, podemos afirmar el planteamiento que se realizó en el inciso anterior, en el cual

se infiere que en este caso se contó el diámetro de alguna aglomeración alterando así la distribución del tratamiento.

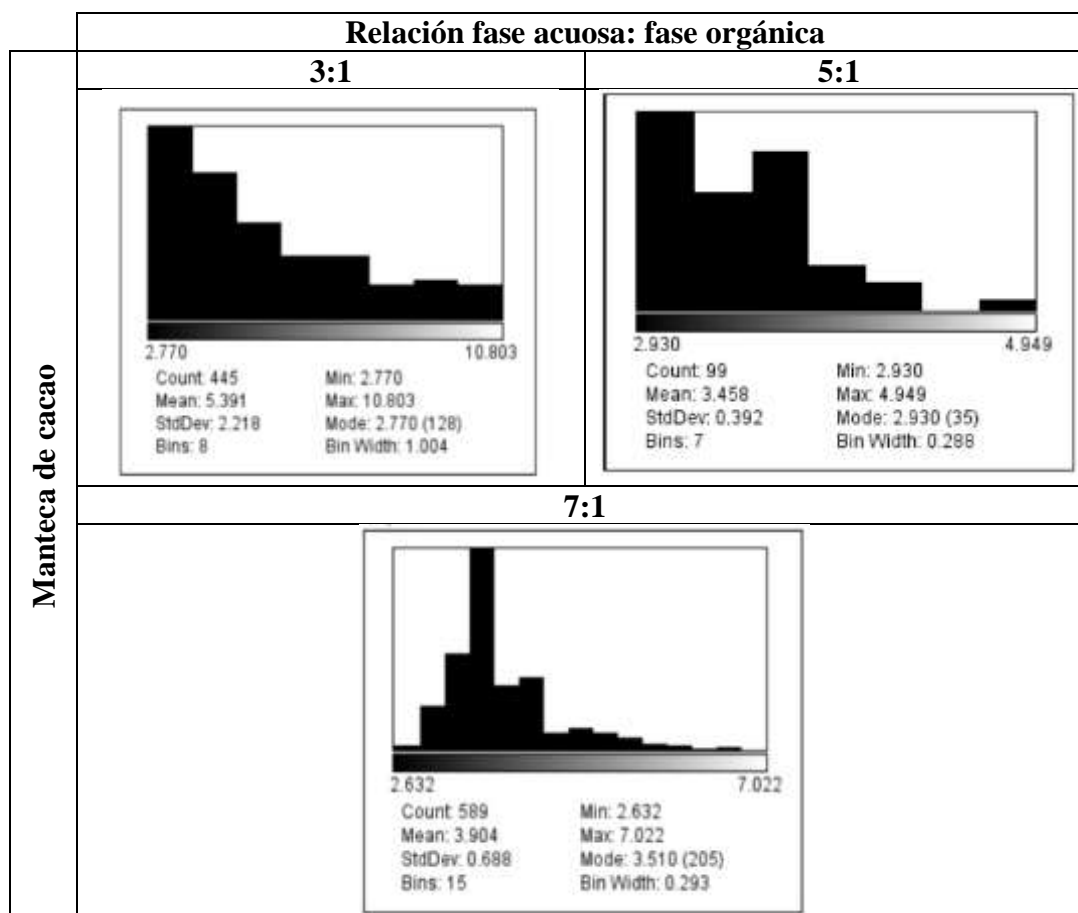


Figura 9. Distribución de tamaño de partículas.

En la figura 9 podemos observar histogramas asimétricos con una tendencia a la izquierda, y al igual que al emplear cera de abeja se tiene una distribución concentrada en el rango de [2-3] μm . Para los tratamientos MC 3:1 y MC 7:1 se tiene un rango superior elevado de 10.803 μm y 7.022 μm , respectivamente. La concentración de partículas que vemos en este caso es reducida por lo que se puede inferir que hubo un error y se contabilizó el diámetro de alguna burbuja presente en la placa del microscopio.

3.4. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Se analizaron 4 casos como se presenta en la figura 10, siendo estos los materiales encapsulantes solos y cuando contenían a la curcumina. Las estructuras químicas se encuentran en el (ANEXO G), y en ellas podemos analizar que lo que diferencia a la curcumina es la

presencia de compuestos aromáticos. Al emplear la cera de abeja se observó una banda intensa significativa entre 1110 y 1252 cm^{-1} y se lo atribuye a la vibración de flexión del grupo aromático (C - O). Se encuentra un pequeño pico en 1523 y 1517 cm^{-1} , al emplear cera de abeja y manteca de cacao, respectivamente, atribuido predominantemente anillo de benceno, puesto que la literatura nos indica que este grupo se encuentra en un número de onda entre 1620 a 1400 cm^{-1} (Smith, 2020)

Se especula que una liberación mayor implica una mayor cantidad de curcumina, por lo que teóricamente se debería presentar picos más altos en los grupos aromáticos.

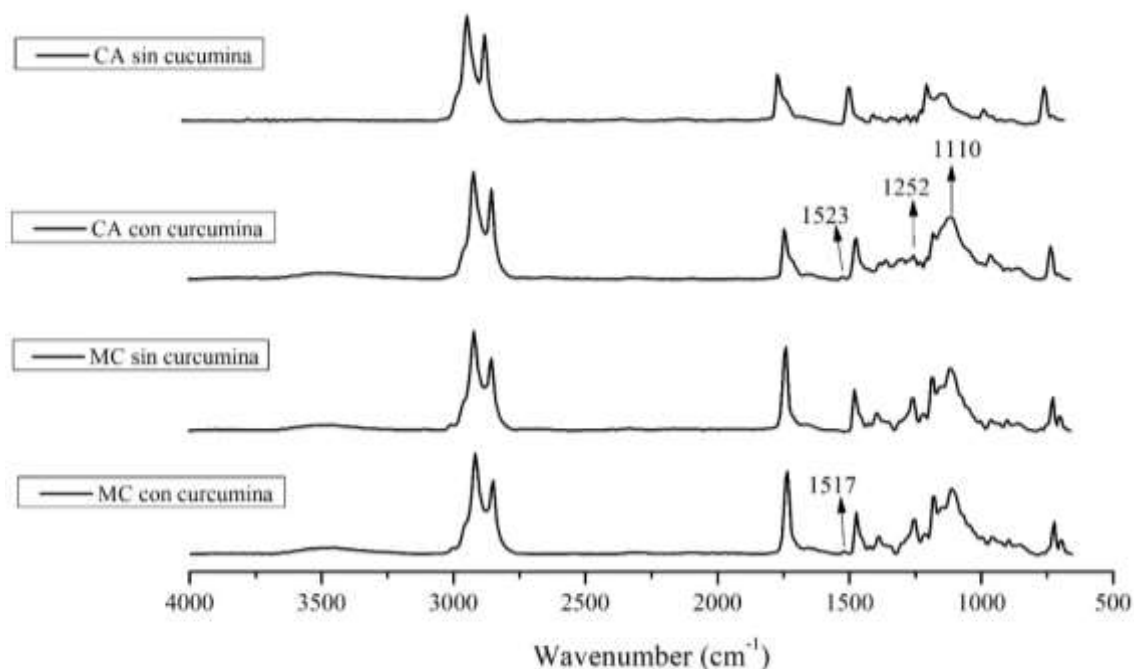


Figura 10. Espectros FTIR de diferentes formulaciones de micropartículas.

3.5. Eficiencia de encapsulación (%EE)

El análisis estadístico se encuentra detallado en (ANEXO H). Para la cera de abeja se realizó su análisis dividiendo por temperaturas, obteniendo en ambos casos un valor $p \leq 0,05$, por lo tanto, si existe una diferencia significativa en el %EE. De igual manera el método de Turkey determino que al emplear cera de abeja los resultados son significativamente diferentes

entre ellos. En el análisis de manteca de cacao también se obtuvo un valor $p \leq 0,05$, siendo resultados con diferencia significativa, sin embargo, el método de Turkey determino que el tratamiento MC 3:1 y MC 7:1 no son significativamente diferentes. Al realizar el método Turkey para todos los tratamientos se determina que CA 5:1 (65°C) es significativamente igual a MC 5:1 (65°C), y CA 7:1 (65°C) es significativamente igual a MC 7:1. Determinando de esta manera que al aumentar la relación FAc:FO, y trabajar bajo una temperatura menor de 65°C se obtiene estadísticamente la misma %EE al trabajar con cera de abeja y manteca de cacao.

La eficiencia de la encapsulación es influenciada por varios factores, incluyendo la solubilidad de una matriz en solventes orgánicos, la solubilidad del solvente orgánico en agua, la concentración de la matriz, la relación de fases y la tasa de evaporación de solventes (Hartini., et al, 2021). La formulación adecuada de la matriz y las condiciones óptimas pueden producir microcápsulas adecuadas con las características deseadas. La eficiencia de encapsulación se encuentra resumida en la tabla 5, obteniendo en el estudio un rango de %EE de 75 ± 0.40 a 98 ± 0.19 %, teniendo en general una mayor %EE al emplear cera de abeja. La mayor %EE se obtuvo a partir del tratamiento CA 3:1 (80°C), siendo este seguido por los tratamientos empleando temperatura de 80°C, determinando así, que un aumento de temperatura mejora la eficiencia de encapsulación. Y esto corresponden al mejor desarrollo de partículas que se genera con cera al aumentar la temperatura de emulsión como se analizó en el enunciado 3.1.

La menor %EE se dio para los tratamientos CA 7:1 (65°C) y MC 7:1, teniendo estos una misma %EE. Se observa en el estudio una disminución de la %EE al incrementar la relación FAc:FO, pero esto es una correlación intrínseca del estudio, puesto que, no se puede generalizar esta correlación para todos los casos, ya que falta investigación en este campo.

Tabla 4. Eficiencia de microencapsulación de los tratamientos.

Tratamientos	Eficiencia de microencapsulación (%)	Tukey
CA 3:1 (65°C)	88 ± 0.58	
CA 3:1 (80°C)	98 ± 0.19	
CA 5:1 (65°C)	82 ± 0.48	A
CA 5:1 (80°C)	93 ± 0.53	
CA 7:1 (65°C)	75 ± 0.40	C
CA 7:1 (80°C)	84 ± 0.31	
MC 3:1	78 ± 0.19	B
MC 5:1	80 ± 0.58	B - A
MC 7:1	75 ± 2.36	B - C

3.6. Liberación abrupta “Brust”

En las figuras 10 y 11 se compara la concentración de curcumina libre a un tiempo 0 y a las 5 horas de digestión en el medio PBS. En la liberación abrupta ocurre un estallido inicial, atribuible a la rápida liberación de moléculas de material encapsulado que se encuentra cerca de la superficie, seguido de una liberación de tiempo 0, atribuible a la presencia de fármaco precipitado en la matriz lipídica (Shahani & Panyam, 2011).

El análisis estadístico ANOVA se detalla en (ANEXO I). Para la cera de abeja se realizó su análisis dividiendo por temperaturas, obteniendo un valor p de 0.072 para 65°C y un valor p de 0.728 para 80°C. Siendo estos valores $p \geq 0.05$, se determina que no existe una diferencia significativa entre los tratamientos. Por lo tanto, al emplear cera de abeja la variable que afecta en su cuantificación de liberación abrupta es el incremento de la temperatura obteniendo con este un mejor resultado, es decir una liberación abrupta menor. Por lo que es posible determinar que el cambio de la relación FAc:FO es indiferente en la liberación abrupta.

Para la manteca de cacao se obtuvo un valor p de 0.005, existiendo así una diferencia significativa empleando este material, por lo tanto, el cambio en la relación FAc:FO si afecta a la liberación. Sin embargo, al emplear el método de Turkey de agrupación se determina que el tratamiento MC 5:1 y MC 7:1 comparten letra, indicando que no existe una diferencia

significativa en sus medias. Por lo tanto, se puede determinar que un incremento en la relación FAc:FO es significativo en la liberación abrupta sin embargo después de una relación 5:1 el incremento es insignificante. Se realizó el método de Turkey para todos los tratamientos determinando que el valor de liberación abrupta de los tratamientos MC 7:1 y MC 5:1 son significativamente igual al emplear cera de abeja a (80°).

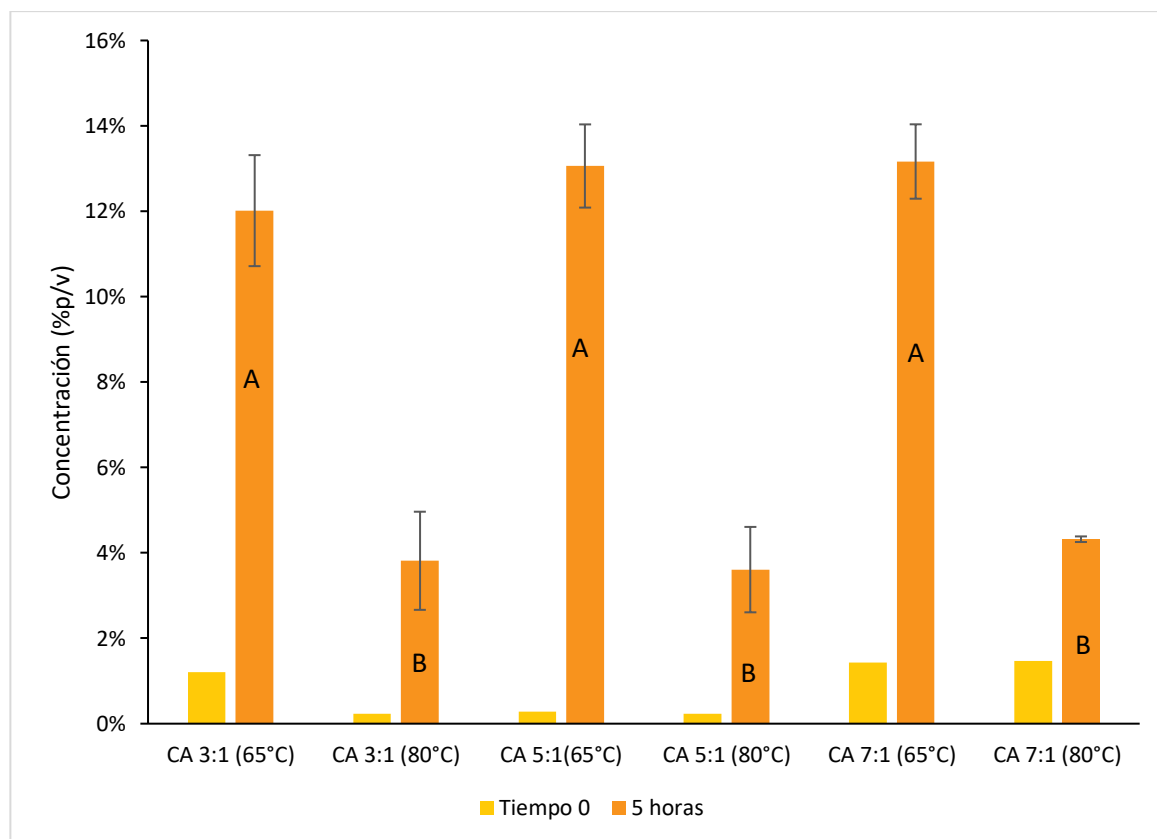


Figura 11. Liberación abrupta de curcumina a partir de micropartículas de cera de abeja. Mismas letras significa que no hay diferencia significativa.

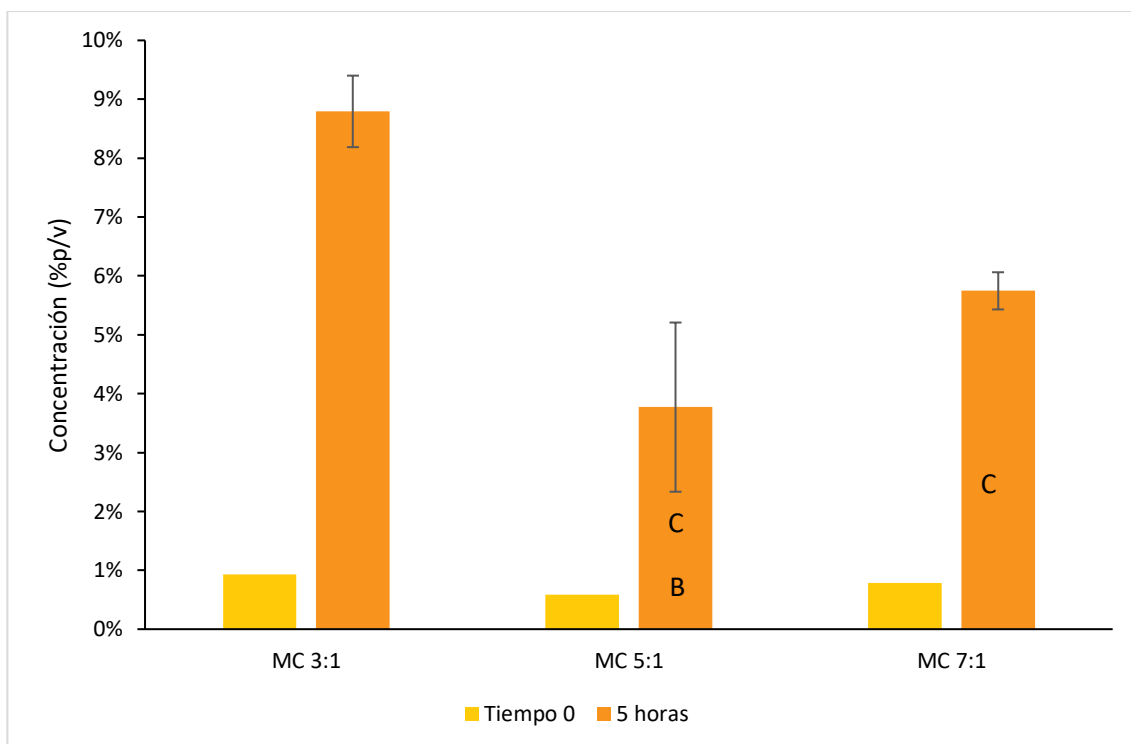


Figura 12. Liberación abrupta de curcumina a partir de micropartículas de manteca de cacao. Misma letra significa que no hay diferencia significativa

Como se observa en la figura 10 y 11 se obtuvo una mayor liberación abrupta para el tratamiento CA 7:1 (65°C), esto se pudo deber a la baja %EE de este tratamiento, liberando el 15.33% de curcumina, mientras que en el tiempo 0 se liberó 1.43%. En el tratamiento MC 7:1 también se evidenció una baja %EE pero en este caso se obtuvo una liberación menor de 7.08%. Esto se puede deber a que la morfología afecta a la liberación abrupta donde paredes lisas y uniformes reducen la liberación abrupta (Yeo & Park, 2004), teniendo así una liberación menor para la manteca de cacao.

La menor liberación abrupta se obtuvo al emplear la cera de abeja a una temperatura de 80°C, como se analizó en el análisis estadístico al aumentar la temperatura en la emulsión de la cera de abeja se obtiene una misma liberación de aproximadamente 4% para todas las relaciones de FAc:FO, volviendo esta variable independiente. Si bien con este material encapsulante se obtuvieron los valores más altos de %EE, no sé le puede acotar los resultados de la liberación a ese

análisis, puesto que, la eficiencia de encapsulación no conduce necesariamente a una reducción de la liberación abrupta, pero si permitirá controlar el perfil de liberación. (Yeo & Park, 2004).

3.7. Ponderación de variables

Se determina que el tratamiento CA 3:1 (80°C), obtiene los mejores resultados de los estudios realizados. Seguido por el tratamiento CA 5:1 (80°C), puesto que ambos obtuvieron la %EE más alta siendo superior al 90%. Y con estos tratamientos se obtuvo la menor liberación abrupta, siendo ambos estadísticamente iguales.

Por otro lado, las micropartículas con mayor diámetro, forma definida, redondas y lisas, con mejor distribución de tamaño corresponden al tratamiento MC 5:1, y teniendo este una %EE de 80% y una liberación abrupta estadísticamente igual a los tratamientos CA 5:1 (80°C) y CA 3:1 (80°C), se determina que este sería el tercer tratamiento más prometedor.

Tabla 5. Calificación ponderada de variables de respuesta de los tratamientos.

Tratamiento	% de eficiencia de encapsulación (/2)	Liberación abrupta (/1)	TOTAL
CA 3:1 (65°C)	0	0	0
CA 3:1 (80°C)	2	1	3
CA 5:1 (65°C)	0	0	0
CA 5:1 (80°C)	2	1	3
CA 7:1 (65°C)	0	0	0
CA 7:1 (80°C)	0	1	1
MC 3:1	0	0	0
MC 5:1	0	1	1
MC 7:1	0	1	1

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Al estudiar las variables de entrada se evidencio que al emplear cera de abeja el aumento de la relación FAc:FO es indiferente para algunos análisis, como en el caso de la liberación abrupta, determinando que los mejores resultados se obtienen con una relación 5:1 o inferior, y que la variable que más afecta es el incremento de temperatura obteniendo los mejores resultados a 80°C. De igual manera, al emplear manteca de cacao se obtuvieron mejores resultados con una relación FAc:FO de 5:1. El estudio determino que las mejores formulaciones para encapsular curcumina según los análisis realizados son CA 3:1 (80°C) y CA 5:1 (80°C), teniendo estas una %EE superior a 90% y una liberación abrupta significativamente igual. De igual forma se determina que el tratamiento MC 5:1 obtuvo la misma liberación abrupta que los tratamientos previamente mencionados, por lo tanto, se recomienda seguir el estudio de estas 3 formulaciones. Una de las desventajas de la curcumina es que es fotosensible, por lo que se recomendaría realizar un análisis de fotodegradación para analizar si el material encapsulante está protegiendo a la curcumina. De igual forma una de las características más importantes de la curcumina es que es antioxidante, por lo que se recomendaría realizar análisis antioxidativos. El estudio de liberación abrupta de las primeras 5 horas muestra el estallido inicial que se obtuvo, siendo este en gran medida la curcumina que se encontraba en la superficie y que no se absorbió, por lo que se recomendaría realizar un análisis de liberación prolongada (24, 48 y 72 horas) para obtener así una curva de liberación completa y dar una mejor conclusión del uso de estos materiales microencapsulantes.

REFERENCIAS

- Álvarez, K. M. (2020). Evaluación del uso de saponinas de quinua como agente emulsificante en la producción de micropartículas de manteca de cacao para la liberación controlada de fármacos. *USFQ*.
- Ariyaratna, I. R., & Karunaratne, D. N. (2016). Microencapsulation stabilizes curcumin for efficient delivery in food applications. *Food Packaging and Shelf Life*, *10*, 79–86.
<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.10.005>
- Ariyaratna, I. R., & Karunaratne, D. N. (2016). Microencapsulation stabilizes curcumin for efficient delivery in food applications. *Food Packaging and Shelf Life*, *10*, 79–86.
<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.10.005>
- Becker, L., et al. (2016). Solid lipid nanoparticles for encapsulation of hydrophilic drugs by an organic solvent free double emulsion technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *140*, 317–323. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.12.033>
- Bentacourt, S. (2021). Evaluación de la microencapsulación de oleorresina de cúrcuma (*Curcuma longa*) utilizando distintos agentes encapsulantes grasos. *USFQ*.
- Bocanegra, R., et al. (2005). Production of Cocoa Butter Microcapsules Using an Electrospray Process. *Journal of Food Science*, *70*(8), e492-e497. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb11520.x>
- Cam, M., et al. (2020). Evaluation of burst release and sustained release of pioglitazone-loaded fibrous mats on diabetic wound healing: an in vitro and in vivo comparison study. *Journal of The Royal Society Interface*, *17*(162), 20190712. <https://doi.org/10.1098/rsif.2019.0712>
- Cam, M., et al. (2020). Evaluation of burst release and sustained release of pioglitazone-loaded fibrous mats on diabetic wound healing: An in vitro and in vivo comparison study. *Journal of the Royal Society Interface*, *17*(162). <https://doi.org/10.1098/rsif.2019.0712>

- Cam, M., et al. (2020). Evaluation of burst release and sustained release of pioglitazone-loaded fibrous mats on diabetic wound healing: an in vitro and in vivo comparison study. *Journal of The Royal Society Interface*, 17(162), 20190712. <https://doi.org/10.1098/rsif.2019.0712>
- Dulbecco, P., & Savarino, V. (2013). Therapeutic potential of curcumin in digestive diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 19(48), 9256–9270.
- Esatbeyoglu, T., et al. (2015). Thermal stability, antioxidant, and anti-inflammatory activity of curcumin and its degradation product 4-vinyl guaiacol. *Food & Function*, 6(3), 887–893. <https://doi.org/10.1039/c4fo00790e>
- Gharsallaoui, A., et al. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107–1121. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>
- Gómez-Mascaraque, L., et al. (2017). Microencapsulation structures based on protein-coated liposomes obtained through electrospraying for the stabilization and improved bioaccessibility of curcumin. *Food Chemistry*, 233, 343–350. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.133>
- González, A. (2018). ImageJ: una herramienta indispensable para medir el mundo biológico. Sociedad Argentina de Botánica. Folium. Obtenido de <https://botanicaargentina.org.ar/wp-content/uploads/2018/09/AR-Folium-Issu.pdf>
- Haghighat-Kharazi, S., et al. (2018). Microencapsulation of α -amylase in beeswax and its application in gluten-free bread as an anti-staling agent. *Lwt*, 92, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.049>
- Hajj Ali, H., et al. (2016). Shea butter solid nanoparticles for curcumin encapsulation: Influence of nanoparticles size on drug loading. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(8), 1168–1178. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201500348>

- Hartini, N., et al. (2021). Microencapsulation of Curcumin in Crosslinked Jelly Fig Pectin Using Vacuum Spray Drying Technique for Effective Drug Delivery. *Polymers*, 13(16), 2583. <https://doi.org/10.3390/polym13162583>
- Jurenka J. S. (2009). Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic*, 14(2), 141–153.
- Kocaadam, B., & ŞAnlier, N. (2015). Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(13), 2889–2895. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1077195>
- Lu, W., et al. (2021). Choosing the appropriate wall materials for spray-drying microencapsulation of natural bioactive ingredients: Taking phenolic compounds as examples. *Powder Technology*, 394, 562–574. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2021.08.082>
- Moballeggh, M., et al. (2020). Curcumin Delivery Mediated by Bio-Based Nanoparticles: A Review. *Molecules*, 25(3), 689. <https://doi.org/10.3390/molecules25030689>
- Nahum, V., & Domb, A. J. (2021). Recent developments in solid lipid microparticles for food ingredients delivery. *Foods*, 10(2), 1–25. <https://doi.org/10.3390/foods10020400>
- Nata, I., Chen, K., & Lee, C. (2014). Facile microencapsulation of curcumin in acetylated starch microparticles. *Journal of Microencapsulation*, 31(4), 344–349. <https://doi.org/10.3109/02652048.2013.858789>
- Nebbioso, M., et al. (2021). Recent Advances and Disputes About Curcumin in Retinal Diseases. *Clinical Ophthalmology, Volume 15*, 2553–2571. <https://doi.org/10.2147/opth.s306706>
- Patil, B., et al. (2009). Bioactive Compounds: Historical Perspectives, Opportunities, and Challenges. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8142–8160. <https://doi.org/10.1021/jf9000132>

Piacentini, E. (2016). Encapsulation Efficiency. *Encyclopedia of Membranes*, 706–707.

https://doi.org/10.1007/978-3-662-44324-8_1945

Ponce, M. M. (2020). Desarrollo de micropartículas de manteca de cacao para la encapsulación y liberación controlada de fármacos. *USFQ*.

Pradesh, A. (2018). Notice to US Food and Drug Administration of the Conclusion that the Intended Use of Curcumin is Generally Recognized as Safe. AIMBR Life Sciences, Inc. Laurus Labd Private Ltd. Banjara Hills, Hyderabad. Obtenido de

<https://www.fda.gov/media/132575/download>

Ranjha, N., Khan, H., & Naseem, S. (2010). Encapsulation and characterization of controlled release flurbiprofen loaded microspheres using beeswax as an encapsulating agent. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21(5), 1621–1630. <https://doi.org/10.1007/s10856-010-4034-4>

Shahani, K., & Panyam, J. (2011). Highly Loaded, Sustained-Release Microparticles of Curcumin for Chemoprevention. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(7), 2599–2609.

<https://doi.org/10.1002/jps.22475>

Sharma, R., Steward, W., & Gescher, A. (2007). PHARMACOKINETICS AND PHARMACODYNAMICS OF CURCUMIN. *ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY*, 453–470. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46401-5_20

Shoba, G., et al. (1998). Influence of Piperine on the Pharmacokinetics of Curcumin in Animals and Human Volunteers. *Planta Medica*, 64(04), 353–356. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957450>

Silva, P., 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>

- Smith, B. (2020). Group Wavenumbers and an Introduction to the Spectroscopy of Benzene Rings. Spectroscopy Online. <https://www.spectroscopyonline.com/view/group-wavenumbers-and-introduction-spectroscopy-benzene-rings>
- Vega, H., & Beillard, M. (2015). Ecuador Cocoa Update and Outlook. Obteniedo de USDA Foreign Agricultural Service website:
https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Ecuador%20Cocoa%20Update%20and%20Outlook_Quito_Ecuador_2-18-2015.pdf
- Yeo, Y., & Park, K. (2004). Control of Ee% and Burst. *Archives of Pharmacal Research*, 27(1), 1–12.
- Zhao, H., et al. (2019). Changes in microcapsules under heating: the effect of particle size on thermal stability and breakability. *Journal of Materials Science*, 55(9), 3902–3911.
<https://doi.org/10.1007/s10853-019-04297-8>

ANEXOS
ANEXO A: Ficha técnica de la oleoresina de cúrcuma

Ecom Food Industries Corporation

PRODUCT SPECIFICATION SHEET

Product	OLEORESIN TURMERIC
Code	NR 3709
Classification	Spice Extract
Date Issued	June 2015

PRODUCT DESCRIPTION

OLEORESIN TURMERIC is a red-brown, viscous liquid containing extractives of *Curcuma longa* L, propylene glycol, and benzyl alcohol.

PHYSICAL & CHEMICAL PROPERTIES	LIMITS
RESIDUAL SOLVENT	<25 ppm
CURCUMIN CONTENT	6.18 - 8.83%
COLOR VALUE	8180 - 8830
INSOLUBLE MATTER	Nil
SOLUBILITY	Oil & Water Dispersible
FLASH POINT	>72°C

STORAGE CONDITIONS AND SHELF LIFE

Store in original tightly closed container in a cool, dark and dry place.
 Shelf life 12 months minimum under above conditions.

THE INFORMATION CONTAINED HEREIN IS TRUE AND ACCURATE TO THE BEST OF OUR KNOWLEDGE. RECOMMENDATIONS ARE MADE WITHOUT GUARANTEE AND WE MUST NECESSARILY DISCLAIM ALL LIABILITY WITH RESPECT TO THE USE OF MATERIALS SUPPLIED BY ECOM MANUFACTURING CORPORATION, SINCE THE CONDITIONS OF USE ARE BEYOND OUR CONTROL.

80 Telson Road, Markham, Ontario Canada L3R 1E5
 Phone: 905 477 2441 Fax: 905 477 2551 www.ecomcanada.com

ANEXO B: Certificado de análisis de la oleoresina de cúrcuma

Ecom Food Industries Corporation

Certificate of Analysis

Product TURMERIC OLEORESIN NR3708 NR3709
Customer ADITMAQ ADITIVOS Y MAQUINARIAS
Customer Order Nbr ECOM-P-06-20
Lot EB015703

	<u>Analysis</u>	<u>Specification</u>
Residual Solvent	<25ppm	<25ppm
Solvent	Ethyl acetate/hex/ac	Ethyl acetate/hex/ac
Volatile oil	0.00%	
Solubility	Water and oil dispersible	Water and oil dispersible
Method	ASTA-UV	ASTA-UV
Colour Value	6273	6180-6830
Curcumin	6.27%	6.18-6.83%

Date of issue 14-Jul-20

Mfg: Jun/20
Expiry: Jun/21

80 Telson Rd. Markham, Ont. Canada. L3R 1E5
 Phone 905-477-2441 Fax:905-477-2551 E mail lab@ecomcanada.com
 Website www.ecomcanada.com

ANEXO C: Certificado de calidad de cera de abeja



INFORME DE RESULTADOS

INF LASA 18-03-19-00744
ORDEN DE TRABAJO No. 00984-19

DATOS DEL CLIENTE		
SOLICITADO POR: APÍCOLA DEL ECUADOR	DIRECCIÓN: AMAGUANA - AV. GENERAL RUMIÑAHUI Y LOS SAUCES N13-128	
TELÉFONO/FAX: 2875794	TIPO DE MUESTRA: ESPECIAL	PROCEDENCIA: PLANTA
IDENTIFICACIÓN: CERA DE ABEJA PREMIUM	CODIGO INICIAL: M1 - LOTE: 002 - F.ELAB: 11/03/2019 - F.EXP: 11/03/2021	

DATOS DEL LABORATORIO		
MUESTREO POR: SOLICITANTE	FECHA DE MUESTREO: -	INGRESO AL LABORATORIO: 12/03/2019
FECHA DE ANÁLISIS: 12/03-18/03/2019	FECHA DE ENTREGA: 18/03/2019	NÚMERO DE MUESTRAS: Una (1)
CÓDIGO DE MUESTRA: 3355-19	REALIZACIÓN DE ENSAYOS: LABORATORIO	

REPORTE DE ANÁLISIS FÍSICO - QUÍMICO

ITEM	PARÁMETROS	UNIDADES	RESULTADOS	VALORES DE REFERENCIA	INCERTIDUMBRE U (k=2)	MÉTODO DE ENSAYO
1	COLOR	-	Ligeramente amarilla	Característico	N.A.	SENSORIAL
2	ÍNDICE DE ACIDEZ	mg KOH/g	17,1	17 - 24	N.A.	VOLUMETRIA
3	ÍNDICE DE ESTERIFICACIÓN	mg KOH/g	77,58	72 - 79	N.A.	USP 41
4	ÍNDICE DE SAPONIFICACIÓN	mg KOH/g	80,06	80 - 110	N.A.	NTE INEN 40
5	OLOR	-	Característico	Característico	N.A.	SENSORIAL
6	PUNTO DE FUSIÓN	°C	64,6	62 - 65	N.A.	NTE INEN ISO 6321

LAS OPINIONES E INTERPRETACIONES ESTÁN FUERA DEL ALCANCE DE ACREDITACIÓN DEL SAE
N.A.: No Aplica

Dr. Marco Guaparo Ruales
GERENTE DEL LABORATORIO

Prohibida la reproducción parcial por cualquier medio sin permiso por escrito del laboratorio.
LASA se responsabiliza exclusivamente de los análisis, el resultado se refiere únicamente a la muestra recibida o tomada por el laboratorio.
Cuando se emitan criterios de conformidad y aplica, se tendrá en cuenta el valor de la incertidumbre asociada al resultado y declarada por el método específico.
El laboratorio se compromete con la Imparcialidad y Confidencialidad de la información y los resultados (la aceptación de este informe implica la aceptación de la política relativa al tema y declarada en www.laboratoriolasa.com)
⁽¹⁾ Valores de referencia tomados de Especificación del cliente.

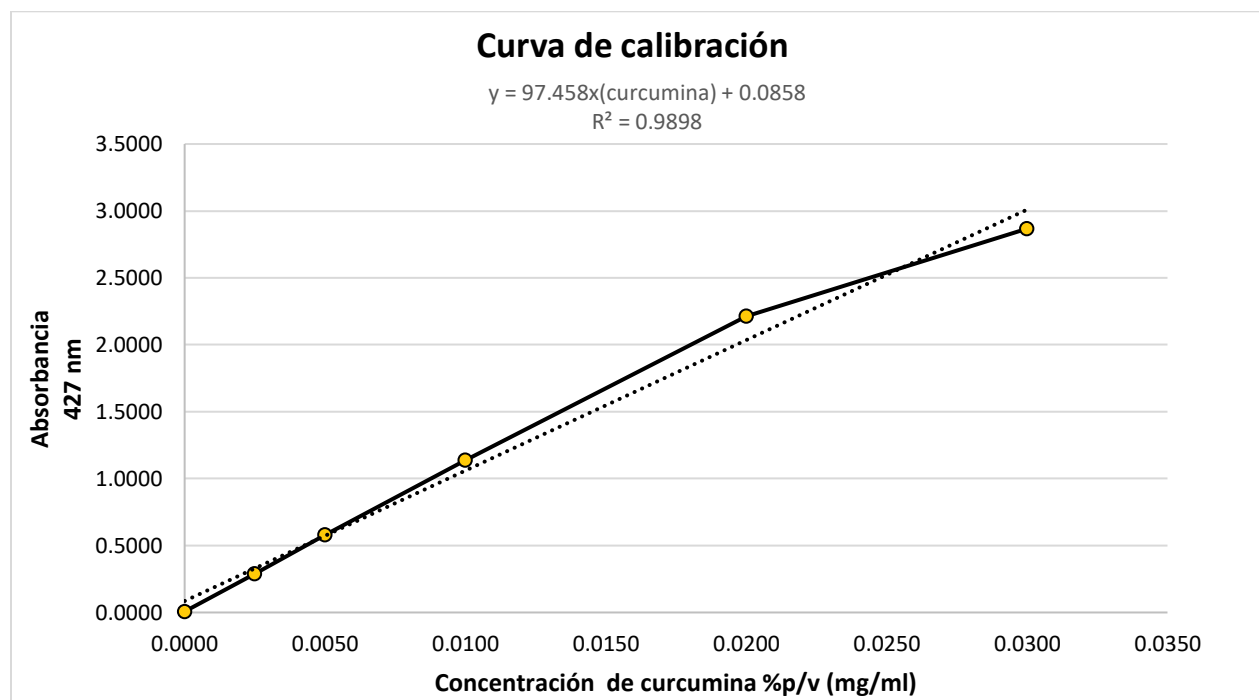
Av. de la Prensa N53-113 y Gonzalo Gallo • Teléfonos: 2469- 814 / 2269-012
Juan Ignacio Pareja OES-97 y Simón Cárdenas • Teléfono: 2290-815 • Celular: 099 9236 287
e-mail: info@laboratoriolasa.com • web: www.laboratoriolasa.com • Quito - Ecuador



ANEXO D: Preparación de micropartículas con distinta relación fase acuosa/fase orgánica

Relación	Fase acuosa (Tween 80)	Fase orgánica
3:1	60 mL	Totalidad – 20 mL de solvente + 1 g de matriz lipídica + 0,1 g de oleorresina
5:1	100 mL	Totalidad – 20 mL de solvente + 1 g de matriz lipídica + 0,1 g de oleorresina
7:1	140 mL	Totalidad – 20 mL de solvente + 1 g de matriz lipídica + 0,1 g de oleorresina

ANEXO E: Curva de calibración de curcumina (Bentacourt, 2021)



ANEXO F: Tabla 6. Tamaño de partículas

	Tratamiento	Diametro	SD	N
Cera de Abeja	CA 3:1 (65°C)	3.20	1.10	105
Cera de Abeja	CA 3:1 (80°C)	2.33	0.39	119
Cera de Abeja	CA 5:1 (65°C)	2.61	0.58	272
Cera de Abeja	CA 5:1 (80°C)	2.25	0.57	636
Cera de Abeja	CA 7:1 (65°C)	3.40	1.18	105
Cera de Abeja	CA 7:1 (80°C)	1.99	0.32	550
Manteca de cacao	MC 3:1	4.20	0.82	445
Manteca de cacao	MC 5:1	3.29	0.39	179
Manteca de cacao	MC 7:1	3.90	0.69	589

ANEXO G: Estructuras químicas

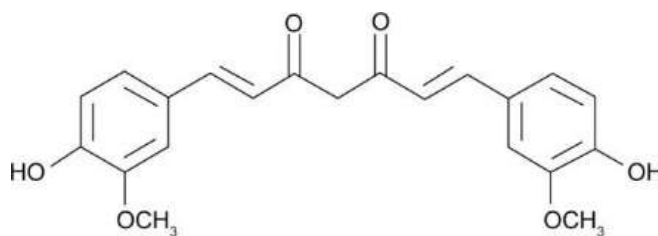


Figura 13. Estructura química de la curcumina.

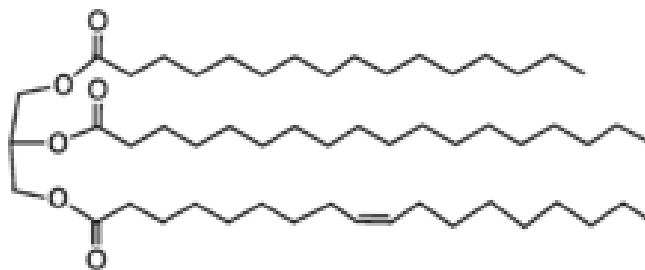


Figura 14. Estructura química de la manteca de cacao.

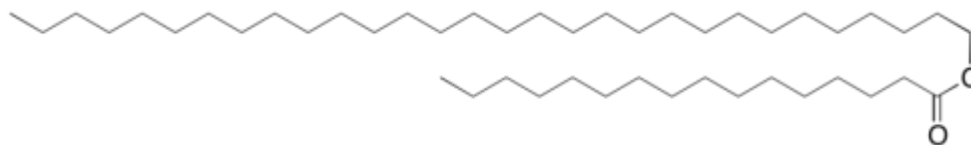


Figura 15. Estructura química de la cera de abeja.

ANEXO H: Resultados Minitab %EE

Tabla 7. Resultados de ANOVA en Minitab para los tratamientos CA a 65°C.

			F-	P-	
<u>Source</u>	<u>DF</u>	<u>Adj SS</u>	<u>Adj MS</u>	<u>Value</u>	<u>Value</u>
Factor	2	264.100	132.050	551.19	0.000
Error	6	1.437	0.240		
Total	8	265.538			

Tabla 8. Resultados de ANOVA en Minitab para los tratamientos CA a 80°C.

<u>Source</u>	<u>DF</u>	<u>Adj SS</u>	<u>Adj MS</u>	<u>F-Value</u>	<u>P-Value</u>
Factor	2	289.537	144.768	1056.99	0.000
Error	6	0.822	0.137		
Total	8	290.359			

Tabla 9. Resultados del método de Turkey en Minitab para los tratamientos CA.

<u>Factor</u>	<u>N</u>	<u>Mean</u>	<u>Grouping</u>
CA 3:1 (80°C)	3	97.856	A
CA 5:1 (80°C)	3	93.319	B
CA 3:1 (65°C)	3	88.458	C
CA 7:1 (80°C)	3	84.215	D
CA 5:1 (65°C)	3	81.853	E
CA 7:1 (65°C)	3	75.190	F

Means that do not share a letter are significantly different.

Tabla 10. Resultados de ANOVA en Minitab para los tratamientos MC.

<u>Source</u>	<u>DF</u>	<u>Adj SS</u>	<u>Adj MS</u>	<u>F-Value</u>	<u>P-Value</u>
Factor	2	34.22	17.111	8.65	0.017
Error	6	11.88	1.979		
Total	8	46.10			

Tabla 11. Resultados del método de Turkey en Minitab para los tratamientos MC.

<u>Factor</u>	<u>N</u>	<u>Mean</u>	<u>Grouping</u>
MC 5:1	3	79.605	A
MC 3:1	3	78.480	A B
MC 7:1	3	75.02	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tabla 12. Resultados del método de Turkey en Minitab para todos los tratamientos.

Factor	N	Mean	Grouping
CA 3:1 (80°C)	3	97.856	A
CA 5:1 (80°C)	3	93.319	B
CA 3:1 (65°C)	3	88.458	C
CA 7:1 (80°C)	3	84.215	D
CA 5:1 (65°C)	3	81.853	E
MC 5:1	3	79.605	E F
MC 3:1	3	78.480	F
CA 7:1 (65°C)	3	75.190	G
MC 7:1	3	75.02	G

Means that do not share a letter are significantly different.

ANEXO I: Resultados Minitab Liberación

Tabla 13. Resultados de ANOVA en Minitab para los tratamientos CA a 65°C.

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	2	0.001195	0.000597	4.22	0.072
Error	6	0.000850	0.000142		
Total	8	0.002044			

Tabla 14. Resultados de ANOVA en Minitab para los tratamientos CA a 80°C.

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	2	0.000080	0.000040	0.34	0.728
Error	6	0.000720	0.000120		
Total	8	0.000801			

Tabla 15. Resultados del método de Turkey en Minitab para los tratamientos CA.

Factor	N	Mean	Grouping
CA 5:1 (65°C)	3	0.1306	A
CA 3:1 (65°C)	3	0.12015	A
CA 7:1 (65°C)	3	0.10268	A
CA 7:1 (80°C)	3	0.04320	B
CA 3:1 (80°C)	3	0.03815	B
CA 5:1 (80°C)	3	0.03608	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tabla 16. Resultados de ANOVA en Minitab para los tratamientos MC.

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	2	0.003842	0.001921	15.17	0.005
Error	6	0.000760	0.000127		
Total	8	0.004602			

Tabla 17. Resultados del método de Turkey en Minitab para los tratamientos MC.

Factor	N	Mean	Grouping
MC 3:1	3	0.08794	A
MC 7:1	3	0.05746	B
MC 5:1	3	0.0377	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Tabla 18. Resultados del método de Turkey en Minitab para todos los tratamientos.

Factor	N	Mean	Grouping
CA 5:1 (65°C)	3	0.1306	A
CA 3:1 (65°C)	3	0.12015	A B
CA 7:1 (65°C)	3	0.10268	A B
MC 3:1	3	0.08794	B C
MC 7:1	3	0.05746	C
CA 7:1 (80°C)	3	0.04320	D
CA 3:1 (80°C)	3	0.03815	D
MC 5:1	3	0.0377	D
CA 5:1 (80°C)	3	0.03608	D

Means that do not share a letter are significantly different.