

MASTER EN TECNOLOGÍAS
AVANZADAS PARA EL
DESARROLLO
AGROFORESTAL

TRABAJO FIN DE MASTER

MICROENCAPSULACIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE SEMILLAS DE CHÍA (*Salvia hispanica*), LINO (*Linum lusitatissimum*) Y CALABAZA (*Cucurbita maxima*) POR EL MÉTODO DE COACERVACIÓN USANDO EL COMPLEJO QUITOSANO/AGAR/TWEEN-20



Universidad de Valladolid

Nombre del alumno:
Juan Pablo Ospina Yepes

Tutor:
Jesús Martín Gil

Directores:
Iosody Silva Castro
Pablo Martin Ramos



Universidad de Valladolid

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS

**MASTER EN TECNOLOGÍAS AVANZADAS PARA EL DESARROLLO
AGROFORESTAL**

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

**MICROENCAPSULACIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE SEMILLAS DE CHÍA
(*SALVIA HISPANICA*), LINO (*LINUM IUSITATISSIMUM*) Y CALABAZA
(*CUCURBITA MAXIMA*) POR EL MÉTODO DE COACERVACIÓN USANDO EL
COMPLEJO QUITOSANO/AGAR/TWEEN-20**

POR: JUAN PABLO OSPINA YEPES

TUTOR: JESÚS MARTIN GIL

**DIRECTORES: IOSODY SILVA CASTRO
 PABLO MARTIN RAMOS**

PALENCIA · JUNIO DE 2016



CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. OBJETIVOS.....	6
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	6
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
3. MATERIAL Y MÉTODOS	7
3.1 CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS PRESENTES EN SEMILLAS Y FLUIDO DE CHÍA Y LINO AL ADICIONAR QUITOSANO Y TWEEN-20.....	7
3.1.1. Sustancias químicas utilizadas	7
3.1.2. Diseño de los tratamientos	7
3.1.3. Preparación de los tratamientos	8
3.1.4. Caracterización de las muestras	10
3.2 MICROENCAPSULACIÓN DE ACEITES ESENCIALES PRESENTES EN SEMILLAS DE CHÍA (<i>SALVIA HISPANICA</i>), LINO (<i>LINUM USITATISSIMUM</i>) Y CALABAZA (<i>CUCURBITA MAXIMA</i>) POR EL MÉTODO DE COACERVACIÓN USANDO EL COMPLEJO QUITOSANO / AGAR / TWEEN-20.....	11
3.2.1. Sustancias químicas utilizadas	11
3.2.2. Preparación de las microesferas	11
3.2.3. Formación de las microesferas	12
3.2.4. Utilización del espectrómetro ATR-FTIR	12
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
4.1. ESPECTROMETRIA FT-IR DE LOS TRATAMIENTOS CORRESPONDIENTES A LA CARACTERIZACIÓN DE SEMILLAS Y FLUIDOS DE CHÍA AL INTERACTUAR CON QUITOSANO Y TWEEN-20.....	13
4.1.2. Análisis ATR-FTIR de los productos que no han interactuado con las otras sustancias (tratamientos 1,5,9)	15
4.1.3. Análisis ATR-FTIR de la interacción de los productos con tween 20 (tratamientos 2,6,10)	17
4.1.4. Análisis ATR-FTIR de la interacción de las mezclas ternaria de los productos más quitosano y tween-20 (tratamientos 4,8 y 12)	19
4.1.5. Replicación de la metodología usada con las semillas de chía utilizando semillas de lino (<i>linum lusitatissimum</i>)	20



4.2. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE MICROESFERAS FORMADAS CON ACEITES DE LINO, CALABAZA Y CHIA.	22
5. CONCLUSIONES	23
6. AGRADECIMIENTOS	24
7. BIBLIOGRAFÍA.....	24
8. ANEJOS.....	31

RESUMEN

El Trabajo de Fin de Máster realizado consiste en la formación de composites de semillas y fluidos de chía (*Salvia hispanica*) y la caracterización de su interacción con quitosano y Tween-20® mediante tecnologías de ultrasonidos y microondas. A través de espectrometría ATR-FTIR se ha comprobado la existencia de la unión del grupo NH₂ (amino) del quitosano con los grupos funcionales presentes en la chía (y principalmente, los que corresponden a la región de números de onda entre 1650 y 1500 cm⁻¹). Adicionalmente, se ha llevado a cabo una microencapsulación de aceites esenciales de semillas de chía, lino (*Linum usitatissimum*) y calabaza (*Cucurbita maxima*) por el método de coacervación usando el complejo quitosano/agar. Ha podido constatarse que el aumento del contenido de quitosano en la formación de esferas mejora la eficiencia de encapsulación debido a sus propiedades poliméricas y que la aplicación de polisorbato (Tween 20) disminuye la tensión interfacial y da lugar a la formación de gotas de tamaño óptimo para la encapsulación. Los composites y las microesferas han sido caracterizados por técnicas de espectrometría (ATR-FTIR) y microscopía (SEM y TEM).

Palabras clave: quitosano, microencapsulación, aceites esenciales, chía.

ABSTRACT

This Master's Thesis consists of the formation of composites from chia (*Salvia hispanica*) fluids and seeds and the characterization of their interaction with chitosan and Tween-20® by ultrasonic and microwave technologies. Through ATR-FTIR spectrometry it has proven the existence of the union of the NH₂ (amino) from chitosan with the functional groups present in chia (and mainly those corresponding to the region of wavenumbers between 1650 and 1500 cm⁻¹). Additionally, it has carried out a microencapsulation of essential oils from chia seeds, flax (*Linum usitatissimum*) and pumpkin (*Cucurbita maxima*) with the chitosan/chia complex by the coacervation method. It has been found that an increased content of chitosan in the formation of spheres enhances encapsulation efficiency due to its polymeric properties and that the polysorbate (Tween 20) application decreases the interfacial tension with result of the formation of droplets of optimum size for encapsulation. Composites and microspheres were characterized by spectrometric techniques (ATR-FTIR) and microscopy (SEM, TEM).

Keywords: chitosan, microencapsulation, essential oils, chia.



1. INTRODUCCIÓN

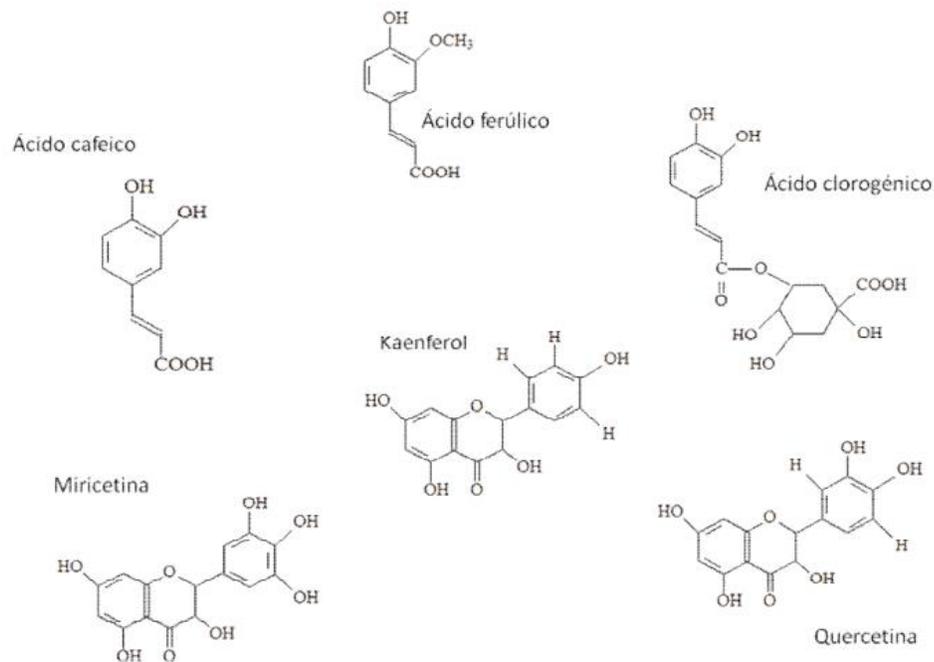
La mayoría de los micronutrientes, incluyendo las vitaminas y minerales, son altamente inestables en la naturaleza. De hecho, pueden degradarse durante el procesamiento y almacenamiento así como por el efecto de diferentes condiciones ambientales como la humedad relativa, el pH y la temperatura [1].

La encapsulación es una tecnología que permite atrapar componentes sensibles en una matriz homogénea o heterogénea para su protección [2]. En este proceso se forman películas delgadas o membranas semipermeables, utilizando diversos materiales como los biopolímeros [3]. Los sistemas de encapsulación son de gran utilidad para proteger micronutrientes o microorganismos probióticos porque reducen la interacción que tienen con el exterior, proporcionando estabilidad a pH ácidos y condiciones extremas de humedad [2]. Diversos compuestos han sido encapsulados en la industria alimentaria tales como: aminoácidos, vitaminas, minerales, antioxidantes, enzimas, edulcorantes, colorantes y microorganismos probióticos [4]. Los aceites esenciales son microencapsulados con el objetivo de impedir su pérdida, para protegerlos de la reacción con otros compuestos presentes en el medio, o para impedir que sufran reacciones de oxidación debido a la luz o al oxígeno. Una ventaja adicional es que un compuesto encapsulado se libera gradualmente del compuesto que lo ha englobado o atrapado y, así, se obtienen productos con mejores características.

La chía (*Salvia hispanica*) es una semilla originaria de la región oeste de México hasta el norte de Guatemala cuyo consumo ha aumentado durante las últimas décadas debido a sus múltiples propiedades beneficiosas para la salud humana. La semilla contiene altos niveles de ácidos grasos esenciales, especialmente los ácidos linoleico (omega 6) y α -linolénico (omega 3), indispensables para el mantenimiento de las funciones celulares normales y con actividades antiinflamatorias y cardioprotectoras [5]. La chía es también una fuente importante de compuestos fenólicos, que actúan como antioxidantes naturales y poseen propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas y antitumorales [6]. El kaempferol, los ácidos cafeico y clorogénico, la quercetina y la miricetina son los principales compuestos fenólicos presentes en las semillas de chía, siendo responsables de su actividad antioxidante [7]. Estos compuestos son primaria y sinérgicamente antioxidantes y contribuyen a la fuerte actividad antioxidante de la chía [8]. Algunas investigaciones han demostrado que el poder antioxidante de la quercetina, susceptible de impedir la oxidación de lípidos, proteínas y ADN, es significativamente más efectivo que el de los flavonoides no-ortohidroxidos [9]. Asimismo, el ácido cafeico y el ácido clorogénico contenidos en la semilla de chía han demostrado tener una actividad contra los radicales libres y los procesos oxidativos en general (inhibición de la peroxidación lipídica) superior a la exhibida

por el ácido ferúlico y los antioxidantes comunes como la vitamina C (ácido ascórbico) y la vitamina E (α -tocoferol). La chía, cuya oxidación es mínima o no existe, ofrece un significativo potencial dentro de la industria alimentaria, dado que las otras fuentes de omega 3 (EPA y DHA principalmente) como los productos marinos y de ácido α -linolénico como el lino, experimentan una descomposición rápida debido a la ausencia de antioxidantes adecuados [10] (Ver figura 1).

Figura 1. Estructura química de los compuestos fenoles presentes en la chía



El lino (*Linum usitatissimum* L.) es una semilla oleaginosa comercial rica en aceites esenciales. Muchas especies de *Linum* están relacionados con la linaza, pero sólo *L. usitatissimum* L. se cultiva para la producción comercial del aceite. La mayoría de los aceites de linaza exceden un 45% de ácido linolénico pero, además, existen líneas específicas que pueden dar lugar a aceites que habitualmente superan el 70% de ácido linolénico [11]. Estos aceites están comercialmente disponibles y han recibido el estatus GRAS (generalmente reconocidos como seguros) [12]. Debido a las propiedades nutricionales y funcionales conferidas por el alto contenido de ácido linolénico, las semillas de lino se cultivan para aplicaciones industriales, alimentos y piensos.

Mientras que el aceite derivado de la semilla es el producto principal del comercio, durante las últimas dos décadas una serie de nuevos productos de la linaza han sido desarrollados a cuenta de sus propiedades únicas. Actualmente, la linaza es



considerada como una excelente fuente de fibra dietética soluble gracias a sus lignanos y sus péptidos cíclicos [13]. Una variada oferta de productos de la linaza está ahora comercialmente disponible.

El extracto de semilla de calabaza (*Cucúrbita máxima*) es una fuente rica en ácidos grasos y proteínas. Los informes sobre la semilla de calabaza son coincidentes en destacar su alto contenido en aminoácidos esenciales y su potencial en sistemas alimentarios no sólo como un suplemento nutricional, sino también como un agente funcional [14]. En países como Alemania, Austria, Hungría y partes del sur de Rusia, la semilla de calabaza se utiliza principalmente para la producción de aceite, como aderezo para ensaladas y en la medicina alternativa, para la eliminación de la mucosidad respiratoria y como antiparasitario [15,16].

Las propiedades fisicoquímicas y perfil de ácidos grasos de aceite de semilla de calabaza resultan idóneos para la fabricación de recubrimientos comestibles en base a su alta eficiencia y estabilidad. Estos materiales se pueden producir usando el aceite de semilla de calabaza en combinación con polisacáridos, proteínas, lípidos o resinas [17]

El quitosano, polisacárido compuesto de la distribución aleatoria de cadenas de D-glucosamina (unidad desacetilada) enlazadas β -(1-4) a N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada), es uno de los productos naturales más ampliamente utilizado en la producción de recubrimientos comestibles debido a sus características de alta actividad antimicrobiana, biocompatibilidad, biodegradabilidad y no toxicidad. Este polisacárido ha mostrado su aplicación en diferentes áreas, con énfasis principal en las industrias alimentaria y farmacéutica pero también en Medicina, Agricultura y Medio Ambiente [18]. Los recubrimientos de quitosano son un excelente portador de otras sustancias funcionales, tales como antimicrobianos y antioxidantes [19].

Dado que la Unión Europea ha impuesto restricciones severas a la obtención de productos químicos convencionales a partir de plantas y semillas, se ha producido un creciente interés en el desarrollo de productos biodegradables que pueden ser utilizados como alternativa siempre que no generen una amenaza para la salud de los seres humanos, animales y medio ambiente [20]. El uso de biopolímeros es ecológicamente viable y seguro en términos generales, y se sabe que tienen efectos antimicóticos, inducen la resistencia natural de las plantas y también puede proporcionar protección de cultivos a largo plazo [21]. El quitosano natural, biodegradable y biocompatible, formado por la N-desacetilación química (en medio alcalino) o enzimático de la quitina, es uno de los candidatos más prometedores para sintetizar *films* de bajo costo, debido a su capacidad para formar películas, su transparencia, su ausencia de toxicidad y sus excelentes características de adsorción [22]. En Agricultura, los polímeros de quitosano han sido utilizados para promover la tolerancia [23] y activar la respuesta frente a microorganismos patógenos [24] de especies como pepino (*Cucumis sativus* L.), trigo (*Triticum*

aestivum L.), guisantes (*Pisum sativum* L.), cacahuete (*Arachis hypogaea* L.) y arroz (*Oryza sativa* L.) [25].

El quitosano, como segundo polímero natural más abundante después de la celulosa, se encuentra en forma de quitina en los caparazones de crustáceos, en las alas de los insectos y en las paredes celulares de hongos y algas [26]. El quitosano posee la estructura química representada en la figura 2) [27] y como se ha indicado anteriormente, se caracteriza por ser biocompatible, biodegradable, no tóxico, filmogénico y tener propiedades emulsionantes, absorbentes, adsorbentes, antimicrobianas, antivirales y antifúngicas [28].

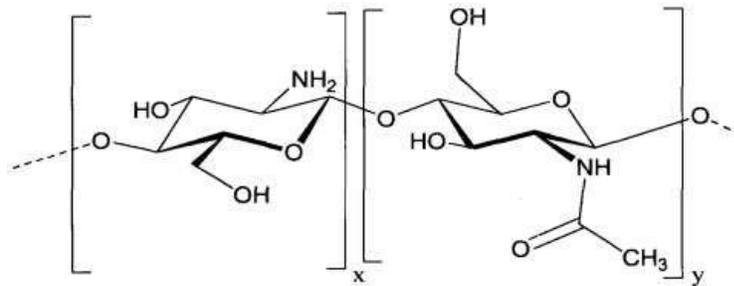


Figura 2. Estructura química del quitosano

Los procedimientos de síntesis química de quitosano se basan generalmente en la aplicación de tratamientos de desacetilación alcalina o enzimática de la quitina que conducen a un producto de alto peso molecular [29]. La consecución de especies con esta característica no es especialmente deseable toda vez que, precisamente, son las cadenas más cortas en longitud y con menor peso molecular, o sea, los llamados oligómeros u oligosacáridos [30], aquellos que muestran mayor actividad. Estos oligómeros pueden ser obtenidos mediante hidrólisis ácida del quitosano [31] facilitada por aplicación de técnicas de microondas, radiación y ultrasonidos [32 y 33].

En base a las consideraciones anteriores parece obligado recurrir a la formación de oligómeros si se quiere potenciar la actividad del quitosano, solo o en combinación, en sus diversas aplicaciones. De este modo, usando métodos sol-gel en los cuales se introducen especies secundarias, naturales o sintéticas en la matriz polimérica del quitosano, es posible obtener composites de oligómeros de quitosano con capacidad antimicrobiana optimizada. Son ejemplos los de quitosano-nisina [34] o quitosano-vainillina, ambos con excelentes propiedades antimicrobianas [35] y con aplicación en películas plásticas para el envasado de alimentos. También ha encontrado aplicación el quitosano recubierto con aloe vera en la mejora de la calidad postcosecha de frutos de arándanos (*Vaccinium corymbosum*) [36].



2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del presente trabajo de investigación se ha centrado en desarrollar el microcápsulado de aceites esenciales de chía (*Salvia hispánica*), lino (*Linum lusitanicum*) y calabaza (*Cucurbita maxima*), mediante un método de coacervación con quitosano, agar y Tween-20®, para su aplicación en usos agrícolas (como fungicida, bactericida e insecticida) y en la industria farmacéutica (como material de liberación lenta de los compuestos antioxidantes presentes en los aceites).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar las matrices encapsulantes: quitosano y agar puro (agarosa y agarpectina) para la preparación de las microcápsulas.
- Obtener nuevos composites a base de una matriz polimérica de oligómeros de quitosano, Tween-20 y ácidos grasos de las semillas y del fluido de chía y lino utilizando un equipo de microondas para las digestiones.
- Liofilizar cada una de las muestras obtenidas en el microondas para la eliminación del agua higroscópica previo a su análisis por ATR-FTIR
- Caracterizar cada una de las muestras por espectroscopía de infrarrojo mediante la utilización de un espectrómetro con Transformada de Fourier de radiación infrarroja (FTIR) con un módulo de reflectancia total atenuada (ATR)
- Analizar los espectros de cada una de las muestras agrupándoles en un orden que permita contrastar diferencias y así poder determinar si hay unión entre componentes, desplazamientos o algún otro tipo de comportamiento que permita concluir qué sucede al mezclar aceites esenciales con quitosano y Tween-20.



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS PRESENTES EN SEMILLAS Y FLUIDO DE CHÍA Y LINO AL ADICIONAR QUITOSANO Y TWEEN-20

3.1.1. Sustancias químicas utilizadas

El quitosano de peso molecular medio fue adquirido de Hangzhou Simit Chemical Technology Co. Ltd (Hangzhou, China). Los oligómeros de quitosano se han preparado, en solución acuosa, a partir de quitosano comercial de peso molecular medio (140000-300000 g/mol), por tratamiento con ácido acético (AcOH) al 2% (pH 4-6) y subsiguiente adición de agua oxigenada (H₂O₂) 0.3 M, dejando en agitación constante durante 12 h.

Se han utilizado dos tipos de semilla: semillas de chía de origen orgánico y procedentes de Argentina y semillas de lino dorado de cultivo ecológico, de origen canadiense y distribuidas por Eco Cesta[®].

En algunos tratamientos se ha utilizado un producto emulsificante (Tween-20), compuesto de ésteres de polioxietilen sorbitano (sorbitol y sus anhídridos copolimerizados con 4, 5, o 20 moles de óxido de etileno) parcialmente esterificados con ácidos grasos superiores, adquirido en Sigma Aldrich[®].

3.1.2. Diseño de los tratamientos

En un Microondas Milestone, se prepararon 12 distintos tratamientos para cada semilla (chía y lino). Se diseñaron 4 tratamientos con un gramo de semillas, 4 con un gramo de semilla más el fluido generado por la inmersión de 100 g de las semillas en 200 mL de agua durante 24 h previas al montaje del experimento y 4 tratamientos con 1 g del fluido sin semillas (Ver Tabla 1).



Tabla 1. Diseño de los 12 tratamientos para cada una de las semillas a tratar.

Tratamiento	Semillas	Semillas con fluido	Fluido	Tween-20	Oligómeros de quitosano
1	X				
2	X			X	
3	X				X
4	X			X	X
5		X			
6		X		X	
7		X			X
8		X		X	X
9			X		
10			X	X	
11			X		X
12			X	X	X

3.1.3. Preparación de los tratamientos

La extracción de los aceites esenciales se realizó por extracción asistida en microondas (EAM). Esta técnica de extracción se produce al calentar el interior y el exterior de la matriz sólida mediante pulsos de microondas generados por un Milestone Ethos-One®. De este modo, se forma un gradiente térmico que conduce a una extracción de los compuestos de interés de manera más eficiente y selectiva. La mezcla se calentó bajo radiación de microondas durante 30 min a una temperatura programada y constante de 80 °C. Posteriormente, las muestras fueron liofilizadas para la eliminación del agua dentro de las muestras evitando la formación de picos debidos a agua y enlace de hidrógeno susceptibles de interferir en los espectros ATR-FTIR. En la siguiente tabla se describen cada uno de las concentraciones y las sustancias utilizadas dentro del experimento tanto para chía como para lino (Ver tabla 2).



Tabla 2. Descripción de cada uno de los tratamientos utilizados.

Tratamiento	Peso semillas (g)	Quitosano (mL)	Tween 20 (mL)	Agua (mL)
1	1,0052	0	0	10
2	1,0040	0	0,75	9,25
3	1,0042	3	0	7
4	1,0064	3	0,75	6,25
5	1.0300	0	0	10
6	1,0072	0	0,75	9,25
7	1,0006	3	0	7
8	1,0390	3	0,75	6,25
9	1,0041	0	0	10
10	1,0092	0	0,75	9,25
11	1,0128	3	0	7
12	1,0230	3	0,75	6,25

3.1.4. Caracterización de las muestras

Se utilizó un espectrómetro FTIR Thermo Nicolet 380[®] con módulo ATR de diamante 122q para la caracterización vibracional de cada uno de las muestras. Para la interpretación de los espectros se usó el software Omnic Spectra de la casa comercial Thermo Scientific[®] y se contó con la ayuda de una carta de correlaciones (Infrared correlation chart) para la identificación de cada uno de los picos. Los espectros se compararon en diferentes grupos para de esta manera identificar si se presentaban cambios que permitieran identificar la formación de nuevos grupos funcionales o la unión entre compuestos. Finalmente, se realizó un esquema que permite la interpretación de la metodología empleada en esta primera parte del trabajo experimental con semillas y fluidos de chía y lino (Ver figura 3).

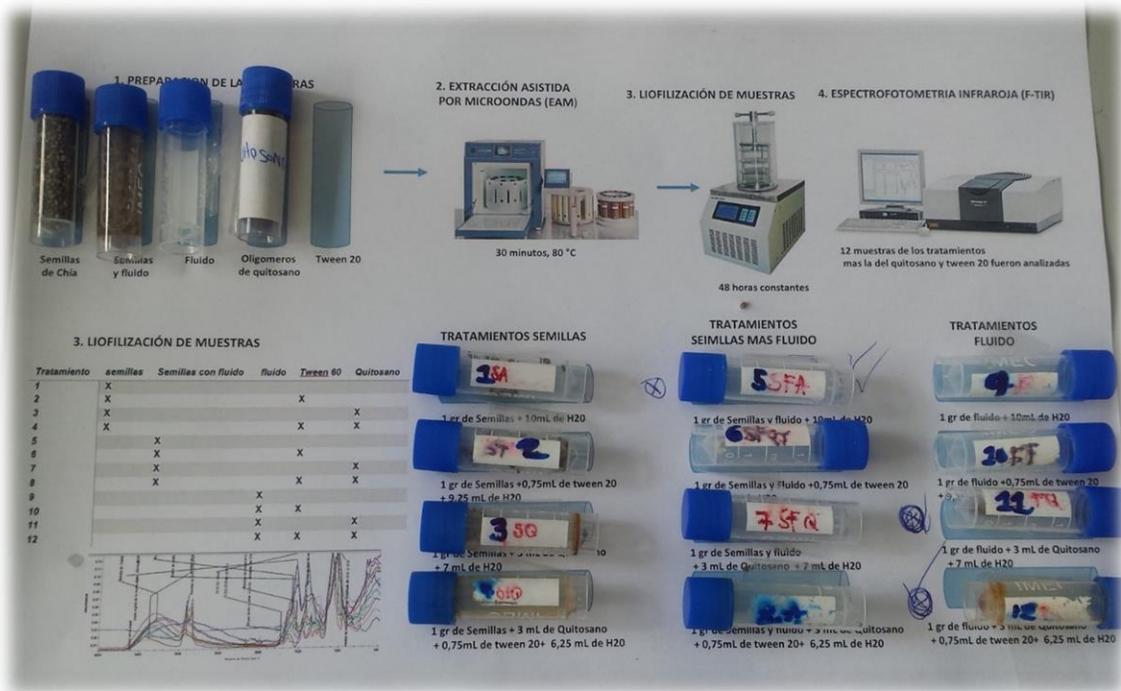


Figura 3. Esquema caracterización e identificación de grupos funcionales presentes en semillas y fluido de chía y lino al adicionar Tween-20.



3.2 MICROENCAPSULACIÓN DE ACEITES ESENCIALES PRESENTES EN SEMILLAS DE CHÍA (*SALVIA HISPANICA*), LINO (*LINUM USITATISSIMUM*) Y CALABAZA (*CUCURBITA MAXIMA*) POR EL MÉTODO DE COACERVACIÓN USANDO EL COMPLEJO QUITOSANO / AGAR

3.2.1. Sustancias químicas utilizadas

Tres tipos de aceites esenciales fueron empleados: uno, fue el aceite de chía que provenía de semillas de origen ecológico conteniendo acetato de tocoferol y distribuido por la casa comercial Orgono Health Products®; y los otros dos, el aceite virgen ecológico de lino y el aceite de calabaza. Estos aceites fueron obtenidos por primera presión en frío (por debajo de 40°C) para conservar de forma plena todas sus propiedades.

La formación de las matrices encapsulantes se llevó a cabo utilizando agar puro (agarpectina y agarosa) preparado de la siguiente forma: se mezcló 1 g de agar en 100 mL de agua en un vaso de precipitados y luego se calentó durante 30 min a una temperatura constante de 80°C utilizando un agitador magnético. Adicionalmente se utilizaron los oligómeros de quitosano del tratamiento anterior y el Tween-20®.

3.2.2. Preparación de las microesferas

Se prepararon tres tipos de microesferas con oligómeros de quitosano: microesferas con aceite esencial de chía (tipo A), lino (tipo B) y calabaza (tipo C) cada una cubierta con agar puro.

La preparación de las microesferas cuenta con varias etapas:

En la primera etapa, la emulsión de aceite se prepara mezclando cada uno de los aceites esenciales con la solución de polímero o la solución de complejo polielectrolito en proporciones en peso aceite/quitosano de 2:1 (10 mL y 5 mL) y añadiendo 1 mL de Tween-20 y 3 mL de agar preparado en agua destilada.

Una vez preparadas las mezclas, cada emulsión debe ser sometida a ultrasonidos. Para esto se utiliza una bocina cónica estándar con una punta de 3 mm de diámetro la cual es sumergida a 1,5 cm en la mezcla de solución de aceite, quitosano, agar y Tween-20. Cada muestra debe ser sometida a ultrasonidos, a 30 kHz de frecuencia con 50% de amplitud y 25 °C, durante 5 min.

3.2.3. Formación de las microesferas

Después de la sonicación de las muestras, se procede a la recolección de las mismas usando una jeringa de 10 mL. Luego, se dejan caer a partir de una distancia de 15 cm en una solución etanólica de NaOH (1,0 M) con el fin de formar las microesferas. El etanol actúa como un no disolvente para el quitosano y facilita la solidificación de las microesferas de quitosano [37]. Las microesferas son separadas por filtración después de repetidos lavados con agua desionizada. Finalmente, se agitan suavemente durante 30 min y se filtra el contenido en una solución 1% (w/v) de KCl. Por último, se retira el contenido y se somete a refrigeración a 5°C, durante 12 h. Seguidamente, las preparaciones son llevadas al SEM para visualizar la formación de las microesferas.

3.2.4. Utilización del ATR-FTIR

Las muestras son llevadas al espectrómetro ATR-FTIR para la obtención de espectros que ayuden a la interpretación de los resultados y así poder conocer por medio de la interpretación de los picos si hay unión entre los aceites y los oligómeros de quitosano y además, si se forman nuevos grupos funcionales.

A continuación se aporta un esquema que permite la interpretación de la metodología empleada en esta segunda parte del trabajo experimental con aceites esenciales para la formación de microesferas. (Ver figura 4)

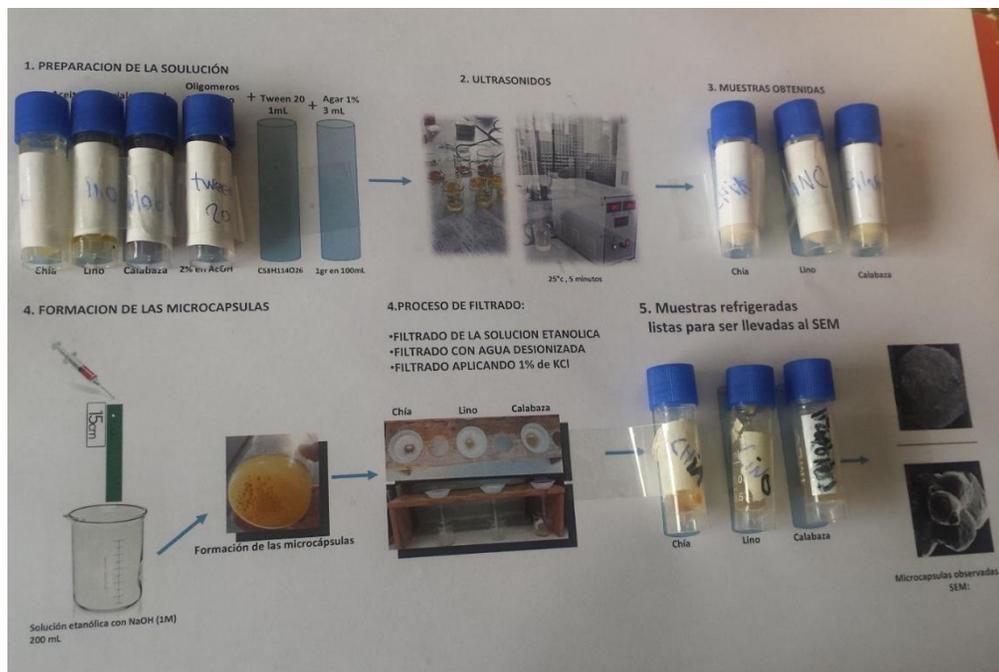


Figura 4. Microencapsulación de aceites esenciales presentes en semillas de chía (*salvia hispanica*), lino (*linum usitatissimum*) y calabaza (*cucurbita maxima*) por el método de coacervación usando el complejo quitosano / agar puro.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ESPECTROMETRIA ATR-FTIR DE LOS TRATAMIENTOS CORRESPONDIENTES A LA CARACTERIZACIÓN DE SEMILLAS Y FLUIDOS DE CHÍA AL INTERACTUAR CON QUITOSANO Y TWEEN-20.

Se realizó un estudio vibracional detallado de cada una de las muestras, y este análisis fue llevado a cabo por espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (ATR-FTIR) para las películas formadas a partir de las 6 combinaciones binarias (quitosano/semillas, quitosano/fluido, quitosano/mezcla fluido semillas, Tween 20/semillas, Tween20/fluido y Tween20/mezcla semilla y fluido); de las 3 ternarias (semillas/tween20/quitosano, fluido/Tween20/quitosano, mezcla semillas y fluido/tween20/quitosano); y de 3 correspondientes a los productos individuales (semilla, fluido y mezcla de la semilla con el fluido). Para facilitar la interpretación de las bandas, se agrupan los compuestos de una manera que garantice una correcta correlación; es decir se analizan espectros con productos similares o en ausencia de alguno de ellos. Las bandas de absorción características ATR-FTIR se encuentran asignadas de acuerdo con Matei *et al*, 2015; Zhu *et al*, 2015; Sanuja *et al*, 2015, Stroescu *et al*, 2015.

4.1.1. Análisis ATR-FTIR de los oligómeros de quitosano mas el producto problema

Los espectros de ATR-FTIR de las muestras de que contienen además de quitosano productos derivados de la semilla exhiben diferencias notables respecto de los de quitosano solo:

- (i) Los compuestos presentes en la semilla muestran desplazamientos hacia longitudes de onda más altas (3200 cm^{-1}) en comparación con el espectro de quitosano o de los oligómeros de quitosano (2875 cm^{-1}), lo que sugiere la formación de una unión efectiva entre los oligómeros del quitosano y los ácidos grasos presentes en la semilla de chía.
- (ii) La banda alrededor de 1701 cm^{-1} asignada al grupo -C=O del grupo amida CONHR del quitosano desaparece al entrar en contacto tanto con las muestras que contenían semillas como con las del fluido. Este desplazamiento pudo haber sido provocado porque el grupo amida contiene óxido de etileno que le permite ser soluble en agua, o, al menos, se pueden dispersar bien en ella [38]. (Ver tabla 3).



Tabla 3. Asignaciones de las bandas FTIR para tratamientos que contienen quitosano de acuerdo con Matei *et al.*

Semillas con quitosano	Semillas y fluido con quitosano	Fluido más quitosano	Quitosano	Asignación
3203	3200			Acetileno terminal, $\text{-C}\equiv\text{CH}$
2922	2926			$\nu_{\text{as}}(\text{C-H})$ en -CH_2
		2873	2875	$\nu_{\text{s}}(\text{C-H})$ en -CH_3
			1701	$\nu(\text{-C=O})$ del grupo amida CONHR del quitosano y $\nu(\text{-C=O})$
1548	1545	1541	1522	$\nu(\text{-C=O})$ del grupo amida protonado, $\delta(\text{NH}_3)$ del grupo amida protonado
1403	1404	1400	1400	$\delta(\text{OH})$
		1151	1152	$\nu_{\text{as}}(\text{CO})$ en puentes de oxígeno resultantes de la des acetilación del quitosano
1019	1019	1016	1013	$\nu(\text{CO})$ de los anillos C-O-H, C-O-C and CH_2CO
			888	$\text{CH}_2=\text{CR}$ polímeros del quitosano
649	649	651	652	Bandas típicas de las formulaciones
615	615	617	612	binarias y terciarias

En los espectros que contienen semillas y quitosano se observa una notable agudización de las bandas correspondientes a las bandas 1536, 1406 y 1020 cm^{-1} , indicándonos que los grupos funcionales de las semillas (principalmente) están interactuando con los oligómeros de quitosano.

El estiramiento de la banda a los 1406 cm^{-1} se debe a que se presentó una torsión de los C-H [39], es decir cuando un grupo metilo (CH_3) presente en los aceites esenciales reacciona con el grupo O2. El aumento de la banda a 1020 cm^{-1} se debe a que durante la unión de los oligómeros del quitosano con los compuestos presentes en la semilla se presentan estiramientos simétricos y asimétricos de los enlaces C-CO-O-CO-C. Por otra parte, en las amidas secundarias, la banda δ NH se encuentra en 1550-1510 cm^{-1} en las especies libres indicándonos que se ha producido una interacción del grupo NH_2 del quitosano con los fluidos de la semilla.

Debemos recordar que el quitosano es un polisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de β -(1-4) D-glucosamina y que, al encontrarse expuesto a ambientes ricos en grupos funcionales, puede interactuar formando nuevas uniones y por ende, generar agudizaciones en las bandas presentes entre los 1650 y los 1700 cm^{-1} (Ver figura 5).

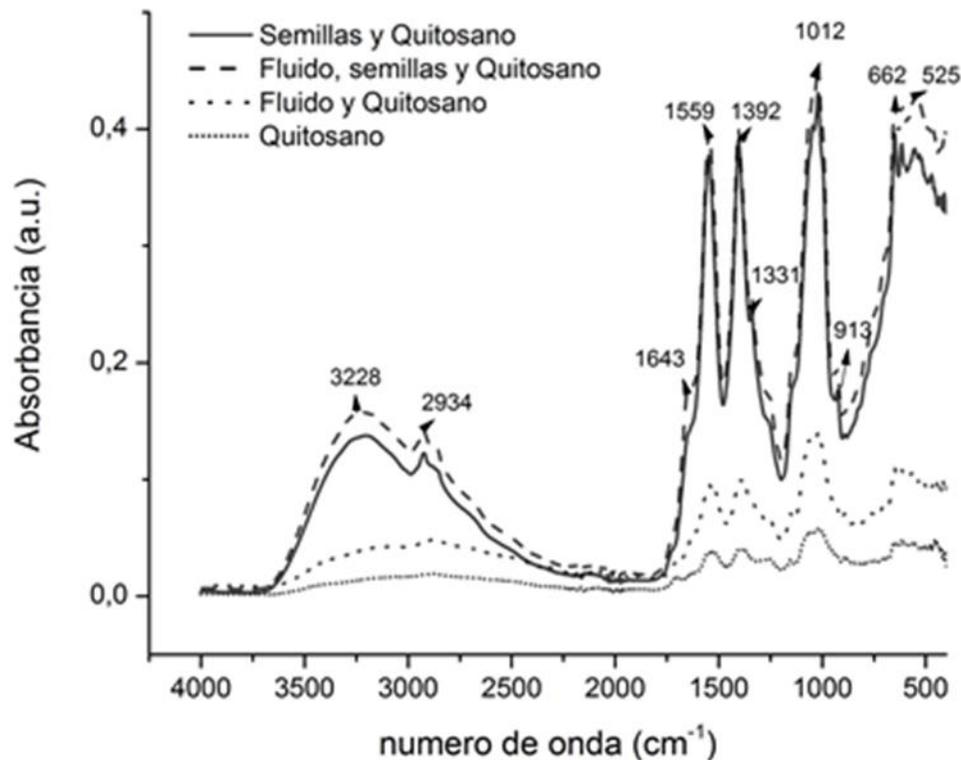


Figura 5. Espectros ATR-FTIR de las mezclas binarias que contienen quitosano (tratamientos 3, 5, 9 y 11) comparados con oligómeros de quitosano.

4.1.2. Análisis ATR-FTIR de los productos que no han interactuado con las otras sustancias (tratamientos 1, 5 y 9)

Cuando se analizan los espectros de los productos y, en concreto, el correspondiente al fluido (realmente, una dispersión del aceite en el agua), es posible observar un ensanchamiento de dos bandas de la región de 2919-2850 cm⁻¹, característica de las vibraciones simétricas y asimétricas de estiramiento de los grupos CH₂ acilo y asignada a los aceites esenciales [40]. Esta ampliación del perfil espectral de la bandas en el fluido puede ser interpretado en términos de una reducción en el orden de conformación de las cadenas acilo de los lípidos y un aumento de su dinámica [41]. O dicho de otro modo: el comportamiento de las cadenas de acilo del aceite es el esperado cuando se encuentran implicadas en interacciones con proteínas estructuralmente disímiles o con moléculas de hidratos de carbono [42] (Ver Figura 6)

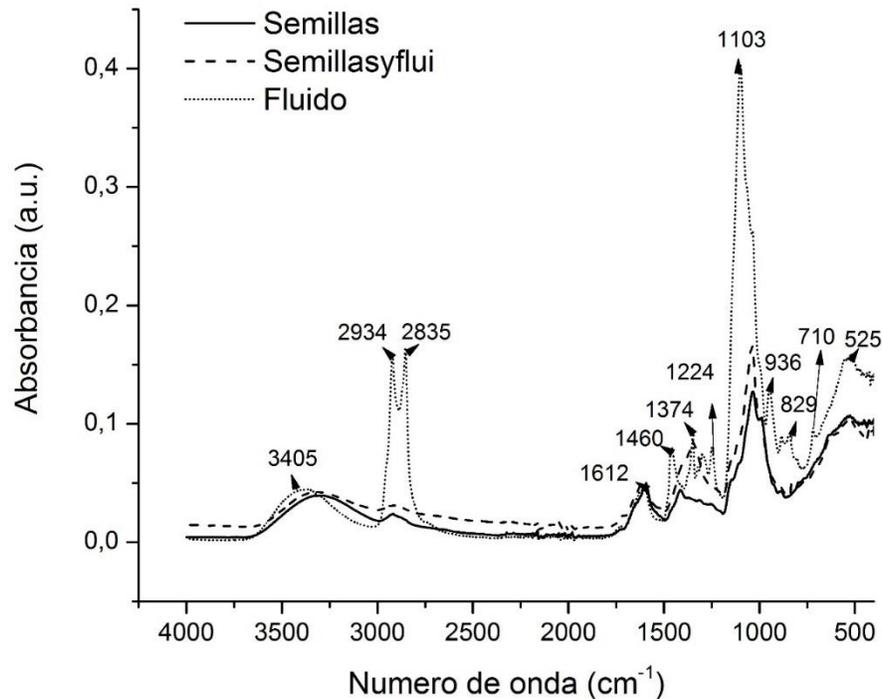


Figura 6. Espectro ATR-FTIR de los productos que no han interactuado con las otras sustancias (tratamientos 1, 5 y 9).

El examen del intervalo de números de onda comprendido entre los 1247 a los 1100 cm^{-1} permite observar un aumento en la absorbancia de las bandas del fluido (0,4 a.u.) respecto de las correspondientes a los otros dos tratamientos (0,16 a.u. y 0,12 a.u.). Este tipo de comportamientos indica una mayor liberación de los grupos funcionales de las semillas de chía en un medio acuoso. Estas señales son solo complementarias, pues los estiramientos C-C, C-N y C-O tienen lugar en la misma región apareciendo varias señales en función del número de hidrógenos: señales débiles pero agudas y que pueden aumentar significativamente en presencia de grupos polares. La presencia de las bandas en la región comprendida entre 1612 y 1247 cm^{-1} informa sobre la formación de puentes de hidrógeno en los tratamientos y está estrechamente relacionada con la disminución de los grupos estructurales carbonilos en estas sustancias (aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres, amidas, entre otros) (Ver tabla 4).



Tabla 4. Asignaciones de las bandas FTIR para los productos sin interacción quitosano / Tween-20.

1: Semillas	5: Semillas y Fluido	9: Fluido	Asignación
<u>3285</u>	<u>3322</u>	<u>3368</u>	Acetileno terminal, -C≡CH
<u>2918</u>		<u>2921</u>	$\nu_{as}(\text{C-H})$ en -CH ₂
		<u>2853</u>	$\nu_s(\text{C-H})$ en -CH ₃
	<u>2050</u>		$\nu(\text{-C=O})$
<u>1596</u>	<u>1604</u>	<u>1602</u>	$\nu(\text{-C=O})$ del grupo amida
<u>1416</u>	<u>1346</u>	<u>1456</u>	CH ₂ , CO=
<u>1034</u>	<u>1039</u>	<u>1348</u>	$\delta(\text{OH})$
		<u>1298</u>	$\nu_{as}(\text{CO})$ en puentes de oxígeno
		<u>1248</u>	Epóxido, ácido sulfónico
		<u>1100</u>	Flexiones de los grupos C-N y C-O
	<u>832</u>	<u>842</u>	CH ₂ =C
<u>525</u>	<u>533</u>	<u>518</u>	Bandas típicas de las formulaciones C-CL,
<u>452</u>	<u>425</u>	<u>651</u>	Mono sustituidos del Benceno

4.1.3. Análisis ATR-FTIR de la interacción de los productos con Tween-20 (tratamientos 2, 6 y 10)

Los espectros que contienen Tween-20 se caracterizan por presentar una disminución del pico alrededor de 1708 cm⁻¹ debido a la presencia de menor número de los grupos carbonilo [43], y por una disminución de las bandas en la región 1269 cm⁻¹ debido a una reducción de los grupos que representaban los enlaces éster en las semillas y en el fluido (y que además se extiende entre 1020 y 880 cm⁻¹ debido a la presencia del anillo de benceno sustituido). [43] (Ver figura 5). Estos espectros también se caracterizan por presentar una banda larga en la región de 3300 cm⁻¹ debido a la vibración de estiramiento de los hidroxilos de cadena inter e intraunidos. Por ejemplo, cuando se combinan los grupos funcionales de la semilla con el Tween-20 aumenta la amplitud a 3352 cm⁻¹ desde 0.05 a 0.15 a.u. y el pico comprendido entre 1103 y 1035 cm⁻¹ presenta un aumento de intensidad que es debido a un mayor número de grupos con vibración de estiramiento de carbonos sencillos, característicos de los enlaces de carbono simple unido al anillo de glucosa. Finalmente, el tratamiento correspondiente al fluido y al Tween-20 se caracterizó por una disminución de todos los grupos funcionales, lo que sugiere la formación de puentes de hidrogeno con el agua (ver Tabla 5).

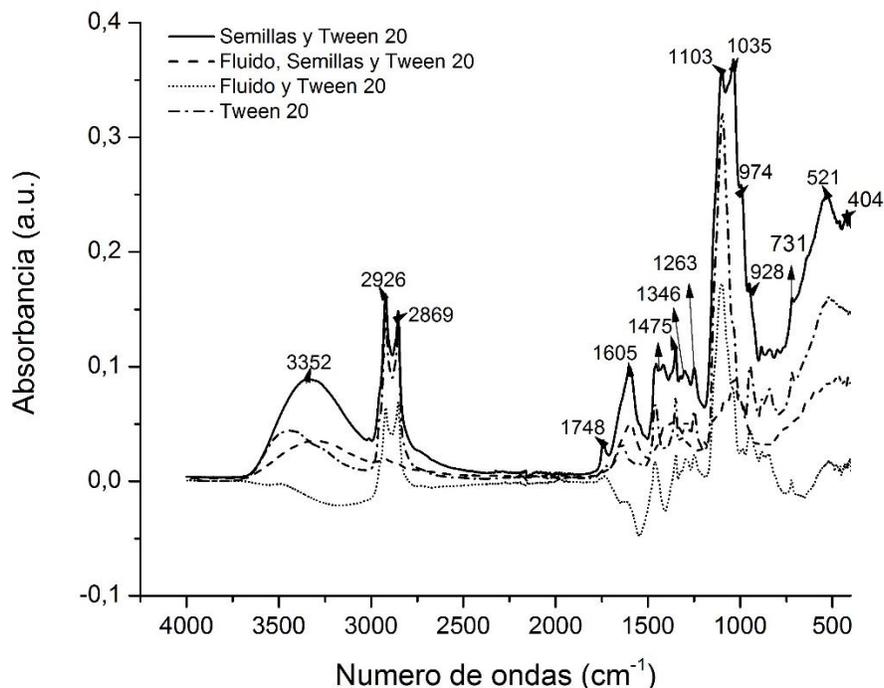


Figura 7. Espectro ATR-FTIR de las mezclas binarias que contienen Tween-20 (tratamientos 2, 6 y 10) comparados con Tween-20.

Tabla 5. Asignaciones de las bandas ATR-FTIR para tratamientos que contienen quitosano de acuerdo con Matei *et al.*

2: Semillas con tween 20	6: Semillas y Fluido con Tween-20	10: Fluido más Tween-20	asignación
3341	3304		Acetileno terminal, -C≡CH
2921	2922	2921	$\nu_{as}(\text{C-H})$ en $-\text{CH}_2$
2853		2853	$\nu_s(\text{C-H})$ en $-\text{CH}_3$
1742		1732	$\nu(\text{-C=O})$
1598	1596	1465	$\nu(\text{-C=O})$ del grupo amida
1455	1355	1348	$\text{CH}_2, \text{CO=}$
1349		1297	$\delta(\text{OH})$
	1196	1247	$\nu_{as}(\text{CO})$ en puentes de oxígeno
	1034	1100	$\text{SO}_4, \text{Si-O}, \text{PO}_4$



464	946	$\nu(\text{CO})$ de los anillos C-O-H, C-O-C and CH ₂ CO
		884 CH ₂ =C
		Bandas típicas de las 729 formulaciones C-CL,

4.1.4. Análisis ATR-FTIR de la interacción de las mezclas ternaria de los productos más quitosano y Tween-20 (tratamientos 4, 8 y 12)

En las mezclas ternarias que contienen las semillas y el fluido sin ser mezcladas (4 y 12) presentan bandas muy intensas entre 2916 y 2865 cm^{-1} , cuya absorbancia ha pasado de 0,023 a 0,19 a.u. Este aumento de la intensidad de las bandas sugiere la formación de una unión efectiva entre los oligómeros del quitosano y los ácidos grasos de la chía con interacción del polisorbato como agente de ruptura de la fase apolar del compuesto. Además, este intervalo de frecuencias corresponde al grupo de los alcanos $-\text{CH}_2$. Por otra parte, los espectros también muestran una notable intensificación de las bandas en la región comprendida entre 1200 y 900 cm^{-1} con aumento de la absorbancia que pasa de 0,13 al 0,42 a.u. y es atribuida a la vibración de flexión del CH_3 en grupo NHCOCH_3 por las interacciones con los grupos funcionales presentes en las semillas de chía y en su respectivo fluido (N). (Ver figura 8)

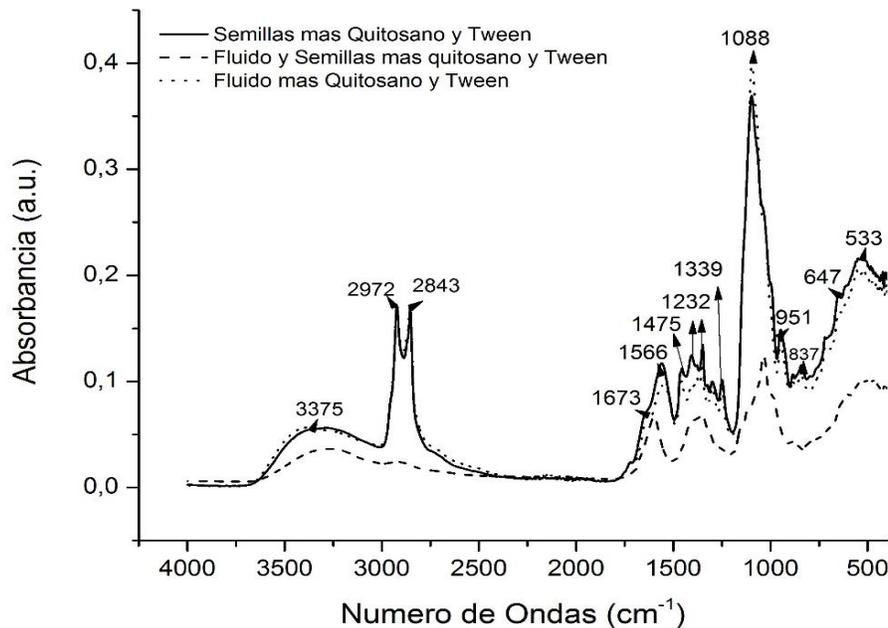


Figura 8. Interacción de las mezclas ternaria de los productos más quitosano y Tween-20 (tratamientos 4, 8 y 12)



4.1.5. Replicación de la metodología usada con las semillas de chía utilizando semillas de lino (*linum lusitatissimum*)

Para garantizar que si se está presentado una unión entre los oligómeros del quitosano y los grupos funcionales de las semillas y los fluidos se realizó una réplica del experimento utilizando semillas de lino.

En los tratamientos que contienen semillas y fluido del lino y quitosano se observó una notable agudización de las bandas correspondientes a las bandas 1551, 1392 y 1148 cm^{-1} , indicándonos que los grupos funcionales de las semillas están interactuando principalmente con los oligómeros de quitosano.

A diferencias de los tratamientos de quitosano y chía, los espectros de lino y quitosano presentan una menor absorbancia (que comprende bandas entre los 0,19 hasta los 0,25 a.u.) que aquéllos. Este tipo de comportamiento es debido a las diferencias estructurales de las semillas, es decir; las semillas de lino no presentan la misma cantidad de ácidos grasos que las semillas de chía y además carecen algunos grupos funcionales como los flavonoides [44].

Este análisis nos permite entender por qué no se presenta una banda pronunciada en torno a 1650 cm^{-1} que indique la unión del grupo glucosamida con el aceite esencial del lino como en el caso de los tratamientos de chía (Ver figura 9). Por otra parte, los productos de lino no presentan ensanchamiento prominente de bandas en la región de 2919-2850 cm^{-1} correspondiente a la región de las vibraciones simétricas y asimétricas de estiramiento de los grupos CH_2 acilo y a la asignada para los aceites esenciales [40]. Dándonos a entender la poca disponibilidad de aceites esenciales en los tratamientos y sugiriendo la carencia de aceites esenciales en las dispersiones de los tratamientos.

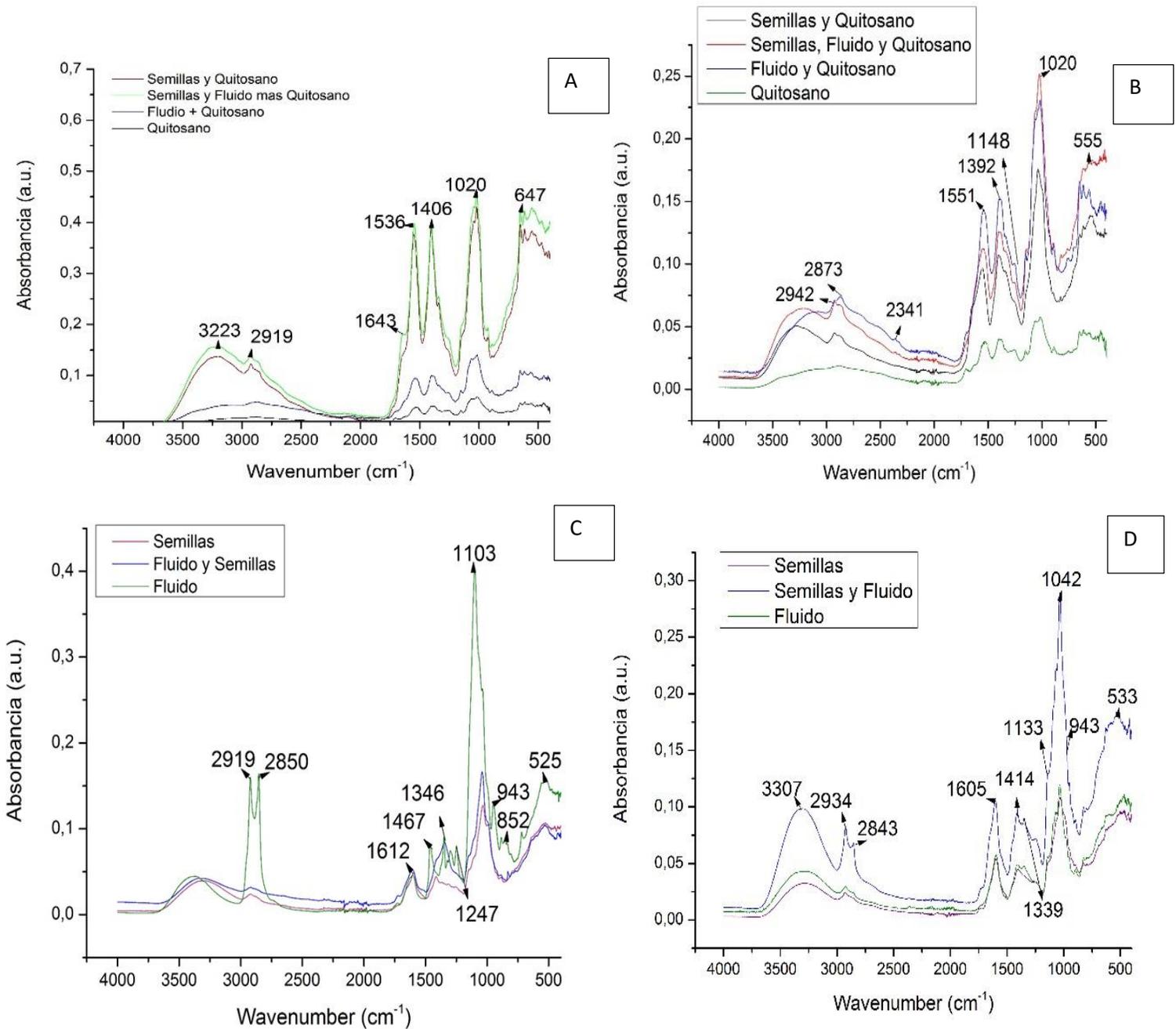


Figura 9. Comparación entre los tratamientos con semillas y fluido de chía más quitosano y los tratamientos con semillas y fluido de lino: Tratamientos con semillas y fluido de chía más quitosano (A), tratamientos de semillas y fluido de lino más quitosano (B), tratamientos con productos de chía sin interactuar con otras sustancias (C) y tratamientos de los productos de lino sin interactuar con otras sustancias (D).

4.2 PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE MICROESFERAS FORMADAS CON ACEITES DE LINO, CALABAZA Y CHIA.

En este estudio, los aceites esenciales de chía, lino y calabaza fueron encapsulados en dos tipos de microesferas de quitosano: Las primeras corresponden a microesferas cubiertas con una membrana de agar puro (agarpectina y agarosa) y las otras son microesferas complejas es decir que contienen tanto agar puro como quitosano. En ambos casos, se llevó a cabo la coacervación compleja entre dos biopolímeros con cargas eléctricas opuestas, capaces de interactuar y formar un sistema complejo en ciertas condiciones de pH.

El pH óptimo para la formación de los complejos poliméricos fue de 4,5. Después de ser sumergido en una solución Agar al 1%, en la superficie de las microesferas de aceites con quitosano, se formó una membrana irregular de agar (ver figura 10). Los tamaños de las gotas procedentes de la emulsión disminuían como resultado de las propiedades tensioactivas del quitosano disminuye la tensión interfacial favoreciendo así la formación gotas de tamaño óptimo para la encapsulación ($1224 \pm 6.56 \mu\text{m}$). El aumento del contenido de quitosano también favorece la eficiencia de encapsulación debido a las dimensiones inferiores de las gotitas de emulsión, que son más fácilmente incrustado en una red menos compacto. En el caso de las microesferas de quitosano, los valores superiores de la eficiencia de encapsulación son probablemente debido a la superficie de la microcápsula, que es más frágil que la superficie de las microesferas de quitosano / agar.

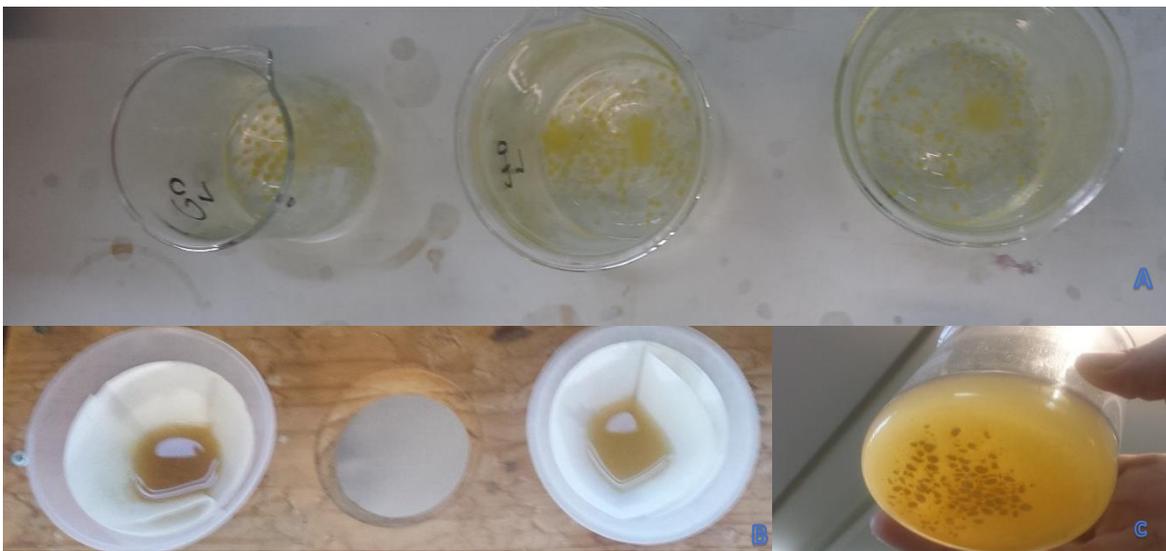


Figura 10. Preparación y caracterización morfológica de microesferas formadas con aceites de lino, calabaza y chía: Formación de las microesferas en un medio con agar al 1% (A), filtración y recuperación de las microcápsulas usando solución etanolica mas NaOH (1M) (B), recuperación de las microesferas en una solución 1% (w / v) de KCl (C).



5. CONCLUSIONES

El presente trabajo reporta una caracterización detallada de los composites que resultan de coacervar los componentes de las semillas y fluidos de chía con quitosano y Tween-20, demostrando la existencia de uniones entre oligómeros del quitosano y grupos funcionales afines presentes en los aceites de semillas y fluido de chía.

Este tipo de trabajos ayuda a comprender el sinergismo químico que se puede obtener al combinar dos sustancias de diferente naturaleza química y que, al aplicarse en combinación, se expresa mediante el reforzamiento de la intensidad de las bandas que van desde los 3300 hasta los 2800 cm^{-1} y de los 1650 a los 1450 cm^{-1} . Estos aumentos de la absorbancia, interpretados como un aumento de las concentraciones de quitosano en la formación de esferas, puede considerarse un marcador de la eficiencia de encapsulación (debida las propiedades poliméricas de aquel)

De especial interés es la aplicación de polisorbato (Tween-20), que disminuye la tensión interfacial y da lugar a la formación de gotas de tamaño óptimo para la encapsulación.

Es preciso destacar que el tipo de microencapsulación descrito impide la pérdida de los aceites esenciales por reacción con otros compuestos en el medio y evita las reacciones de oxidación debido a la luz o al oxígeno.

La idoneidad de los componentes que constituyen el tipo de composite propuesto y las ventajas de la microencapsulación llevada a cabo han conducido a propiedades optimizadas del producto final que resultan prometedoras en sus aplicaciones en la Agricultura ecológica (como fungicida, bactericida e insecticida) y en la Industria farmacéutica (como material de liberación lenta de los compuestos antioxidantes presentes en los aceites).



6. AGRADECIMIENTOS

A la fundación Carolina por la beca otorgada y financiada por Ecopetrol. A los Profesores de la Universidad de Valladolid, Mercedes Sánchez Báscones, Salvador Hernández Navarro, Adriana Correa Guimares y Luis Manuel Navas Gracia, del Departamento de Ingeniería Agrícola por el espacio y apoyo en la realización de los experimentos; y a Isody Silva Castro, Pablo Martín Raom y a Jesús Martín Gil por su interés en que el desarrollo del presente trabajo resultara una investigación útil y capaz de ser replicada como metodología base para trabajos futuros.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Han, J., Guenier, A., Salmieri, S. y Lacroix, M., 2008. Alginate and chitosan functionalization for micronutrient encapsulation. *Journal of agricultural and Food chemistry*. (56): 2528-2535.
- [2] Lian, W.C., Hsiao, H.C. y Chou, C.C., 2003. Viability of microencapsulated Bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. *International Journal of Food Microbiology*. 86 (3): 293-301.
- [3] Yua, W., J., Liub, X., Xiea, H., Zhaoa, W. y Maa, X., 2010. Quantitative characterization of membrane formation process of alginate-chitosan microcapsules by gpc. *Journal of Membrane Science*. (346): 296-301
- [4] Deladino L., Anbinder, P.S., Navarro A. S. y Martino M. N., 2008. Encapsulation of natural antioxidants extracted from (*Ilex Paraguariensis*). *Carbohydrate Polymers*. (71): 126-134.
- [5] A.P. Simopoulos, Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases, *J. Am. Coll. Nutr.* 21 (2002) 495–505.
- [6] Makris DP, R. J. (2001). Comparison of quercetin and a non-ortho-hydroxy flavonol as antioxidants by competing in vitro oxidation reactions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(7), 3370 - 3377.
- [7] N.M. Ali, S.K. Yeap, W.Y. Ho, B.K. Beh, S.W. Tan, S.G. Tan, The promising future of chia, *Salvia hispanica L*, *J. Biomed. Biotechnol.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1155/2012/171956>.
- [8] V.Y. Ixtaína, M.L. Martínez, V. Spotorno, C.M. Mateo, D.M. Maestri, B.W. Diehl, Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction, *J. Food Compos. Anal.* 24 (2011) 166–174.



- [9] M.S. Taga, E.E. Miller, D.E. Pratt, Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61 (2009) 928–931.
E. Reyes-Caudillo, A. Tecante, M.A. Valdivia-López, Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds, *Food Chem.* 107 (2008) 656–663
- [10] Kenaschuk, 2005 Kenaschuk, E. O. (2005). *High linolenic acid flax*. US Patent Number 6870077.
- [11] Polar Foods, 2008 Polar Foods Generally recognized as safe (GRAS) notification HiOmega™ flaxseed oil (2008) Available at <http://www.fda.gov/ucm/groups/fdagov-public/@fdagov-foods-gen/documents/document/ucm264266.pdf> Accessed 19.09.14
- [12] Wang et al., 2008 C.Q. Wang, H.W. Ren, G.H. Zhang Change of fatty acid and VE in the refining process of flaxseed oil *China Oils and Fats*, 33 (2008), pp. 14–16.
- [13] F. Caili, S. Huan, L. Quanhong A review on pharmacological activities and utilization technologies of pumpkin. *Plant Food Hum. Nutr.*, 61 (2006), pp. 73–80 View Record in Scopus Citing articles (97)
- [14] R.H. Glew, R.S. Glew, L.T. Chuang, Y.S. Huang, M. Millson, D. Constans, D.J. Vanderjagt Amino acid, mineral and fatty acid content of pumpkin seeds (*Cucurbita* spp) and *Cyperus esculentus* nuts in the Republic of Niger *Plant Food Hum. Nutr.*, 61 (2006), pp. 49–54 Full Text via CrossRef
- [15] J. Rodríguez-Miranda, B. Hernández-Santos, E. Herman-Lara, C.A. Gómez-Aldapa, H.S. García, C.E. Martínez-Sánchez Effect of some variables on oil extraction yield from Mexican pumpkin seeds *CyTA J. Food*, 12 (2014), pp. 9–15
- [16] [Sanuja, S., Agalya, A., Umaphaty, M. J. \(2015\). Synthesis and characterization of zinc oxide- neem oil-chitosan bionanocomposite for food packaging application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 76-84.](#)
- [17] Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods*, 1(2), 177-187.
- [18] Coates, W., & Ayerza, R. (2016). Production potential of chia in northwestern Argentina. *Industrial Crops and Products*, 5(3), 229-233.
- [19] Y. M. Shabana, G. M. Abdel-Fattah, A. E. Ismail and Y. M. Rashad, Control of brown spot pathogen of rice (*Bipolaris oryzae*) using some phenolic antioxidants, *Braz. J. Microbiol.* 39 (2008), 438-444.
- [20] C. Tan, B. Feng, X. Zhang, W. Xia and S. Xia, Biopolymer-coated liposomes by electrostatic adsorption of chitosan (chitosomes) as novel delivery systems for carotenoids, *Food Hydrocolloids* 52 (2016), 774-784.
- [21] M. N. V. Ravi Kumar, A review of chitin and chitosan applications, *React. Funct. Polym.* 46 (2000), 1-27.
- [22] S. Lee, H. Choi, S. Suh, I.-S. Doo, K.-Y. Oh, E. Jeong Choi, A. T. Schroeder Taylor, P. S. Low and Y. Lee, Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from



- guard cells of tomato and commelina communis, *Plant Physiol.* 121 (1999), 147-152.
- [23] N. Benhamou, Elicitor-induced plant defence pathways, *Trends Plant Sci.* 1 (1996), 233-240.
- [24] W. Lin, X. Hu, W. Zhang, W. John Rogers and W. Cai, Hydrogen peroxide mediates defence responses induced by chitosans of different molecular weights in rice, *J. Plant Physiol.* 162 (2005), 937-944
- [25] [De la Paz, N., Fernández, M., López, O., Nogueira, A., García, C., Pérez, D., Tobella, J., Montes, Y., Díaz, D. \(.2012\). Optimización del proceso de obtención del quitosano derivado de la quitina de langosta. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 13\(3\), 103-116.](#)
- [26] Murray, M.L., Villoslada, I., Donoso, S. L., Ampuero, F., Villa, M. A., Fonseca, A. G., Rojas, M. F., Hernández, C., Bascur, M., Rivas, S. P. (2013). Biomaterial que comprende quitosano y al menos glicosaminoglicano. Patente con Número de Aplicación PCT/CL2012/000023.
- [27] INTI. (2010). Noticiero tecnológico mar y sierra, 10-7. Buenos Aires: Instituto Nacional de Tecnología Industrial (http://www.inti.gov.ar/noticiero_mdq/2010/nmdq10.htm)
- [28] Araya, A., Meneses, L. (2010). Influencia de algunos ácidos orgánicos sobre las propiedades físico-químicas de películas de quitosano obtenidas a partir de desechos de cangrejo. *Revista Tecnológica ESPOL*, 23(1), 143-148.
- [29] [Yang, Y., Shu, R., Shao, J., Xu, G., Gu, X. \(2006\). Radical scavenging activity of chito oligosaccharide with different molecular weights. *European Food Research and Technology*, 222\(1-2\), 36–40.](#)
- [30] [Sivakami, M., Gomathi, T., Venkatesan, J., Jeong, H., Kim, S., Sudha, P. \(2013\). Preparation and characterization of nano chitosan for treatment wastewaters. *International Journal of Biological Macromolecules*, 57, 204-212.](#)
- [31] [Sun, T., Zhou, D., Xie, J., Mao, F. \(2007\). Preparation of chitosan oligomers and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, 225\(3-4\), 451–456.](#)
- [32] Taskin, P., Canisag, H., Sen. M. (2104). The effect of degree of deacetylation on the radiation induced degradation of chitosan. *Radiation Physics and Chemistry*, 94, 236–239.
- [33] Kumar, M. N. V. R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46(1), 1-27.
- [34] Zhu, X., Wu, H., Yang, J., Tong, J., Yi, J., Hu, Z., Hu, J., Wang, T., Fan, L. (2105). Antibacterial activity of chitosan grafting nisin: Preparation and characterization. *Reactive & Functional Polymers*, 91-92, 71-76.
- [35] [Stroescu, M., Stoica-Guzun A., Isopencu G., Jinga, S. I., Parvulescu, O., Dobre, T., Vasilescu, M. \(2015\). Chitosan-vanillin composites with antimicrobial properties. *Food Hydrocolloids*, 48, 62-71.](#)
- [36] [Jorge M. Vieiraa, María L. Flores-Lópezb, Diana Jasso de Rodríguezc, Maria C. Sousa Effect of chitosan–Aloe vera coating on postharvest quality of blueberry \(*Vaccinium corymbosum*\) fruit. *Postharvest Biology and Technology* 116 \(2016\) 88–97](#)



- [37] Krajewska, B. (2004). Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilisations: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 126–139.
- [38] J.K. Carson, K.N. Marsh, A.E. Mather Enthalpy of solution of carbon dioxide in (water + monoethanolamine, or diethanolamine, or N-methyldiethanolamine) and (water + monoethanolamine + N-methyldiethanolamine) at T = 298.15 K *J. Chem. Thermodyn.*, 32 (2000), pp. 1285–1296
- [39] Hsu KH, Huang YH, Lee YP, Huang M, Miller TA, McCoy. Manifestations of Torsion-CH Stretch Coupling in the Infrared Spectrum of CH₃OO. *J Phys Chem A*. 2016 Mar 16
- [40] T. Pintado, C. Ruiz-Capillas, F. Jiménez-Colmenero, P. Carmona, A.M. Herrero Oil-in-water emulsion gels stabilized with chia (*Salvia hispanica* L.) and cold gelling agents: Technological and infrared spectroscopic characterization *Food Chemistry* Volume 185, 15 October 2015, Pages 470–478
- [41] Herrero et al., 2011 A.M. Herrero, P. Carmona, T. Pintado, F. Jiménez-Colmenero, C. Ruíz-Capillas Olive oil-in-water emulsions stabilized with caseinate: Elucidation of protein–lipid interactions by infrared spectroscopy *Food Hydrocolloids*, 25 (2011), pp. 12–18.
- [42] H. Wang, K.-Y. Lin, B. Jing, G. Krylova, G.E. Sigmon, P. McGinn, Y. Zhu, C. Na Removal of oil droplets from contaminated water using magnetic carbon nanotubes *Water Res.*, 47 (2013), pp. 4198–4205
- [43] Renata P. Herrera Brandelero, Maria Victória Grossmann, Fabio Yamashita Films of starch and poly(butylene adipate co-terephthalate) added of soybean oil (SO) and Tween 80 *Carbohydrate Polymers* Volume 90, Issue 4, 6 November 2012, Pages 1452–1460.
- [44] O. Urrutia, B. Soret, K. Insausti, J.A. Mendizabal, A. Purroy, A. Arana The effects of linseed or chia seed dietary supplementation on adipose tissue development, fatty acid composition, and lipogenic gene expression in lambs *Volume 123, Issues 2–3, February 2015, Pages 204 -211*