

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

Diseño de un proceso de bioencapsulación para una posterior inclusión en
alimento de larvas de camarón.

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Ingeniero Acuícola

Presentado por:

Josué Fernando Pérez Guevara

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2019

DEDICATORIA

El presente proyecto lo dedico a mi madre, abuela, padre, hermano y a todas las personas que me ayudaron en la vida universitaria

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a todo aquel que sabe que ha sido parte de este logro. 😊

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, me corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *Josue Fernando Perez Guevara* doy mi consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”

Josué Fernando Pérez Guevara

EVALUADORES

Wilfrido Arguello, Ph.D
Profesor de la materia

Bayot, Ph.D
Tutora

RESUMEN

Las enfermedades emergentes de camarones provocadas por bacterias son la principal causa de mortalidades en larviculturas de camarón. Para mitigar este problema se requiere encapsular compuestos bioactivos capaces de suprimir la acción bacteriana. El objetivo de esta investigación es diseñar un proceso de bioencapsulación de compuestos activos para una posterior inclusión en alimento de larvas de camarón con el fin de proporcionar una alternativa diferente al uso de antibióticos. La revisión bibliográfica constó de tres componentes principales en donde se necesitó identificar y valorar el mejor método de encapsulación de compuestos biológicos en alimento de larvas de camarón y de los materiales adecuados propios de cada método para el diseño de la biocápsula, finalizando con la selección y construcción del prototipo de una biocápsula. El método de dispersión simple presenta el mayor valor ponderado (93.7/100). En tanto que los métodos de gelificación iónica y polimerización interfacial quedaron en forma alejada en segunda y tercer lugar, mientras que el método de secado por aspersion sacó el menor puntaje. El costo aproximado para obtención de un batch de liposomas multilamelares grandes a través del método de microencapsulación de dispersión simple conteniendo compuestos bioactivos es de \$23262, de los cuales, \$21729 constituyen equipos, mientras que los \$1533 restantes constituyen el material consumible. Para la obtención de liposomas unilamelares se necesita un adicional de \$3867,30 en equipos y \$598 para materiales consumibles. Considerando que un laboratorio de investigación tiene los equipos necesarios para este proceso, la preparación de un batch de liposomas unilamelares tendría un costo de \$2131.

cuyo producto final luego del proceso son los liposomas unilamelares grandes.

Palabras Clave: Bioencapsulación, Camarón, Dispersión simple, Liposoma.

ABSTRACT

Emerging diseases of shrimp caused by bacteria are the main cause of mortalities in shrimp larvicultures. To mitigate this problem it is necessary to encapsulate bioactive compounds capable of suppressing bacterial action. The objective of this research is to design a process of bioencapsulation of active compounds for a later inclusion in food of shrimp larvae in order to provide a different alternative to the use of antibiotics. The bibliographic review consisted of three main components where it was necessary to identify and evaluate the best method of encapsulation of biological compounds in shrimp larvae food and the appropriate materials of each method for the design of the biocapsule, ending with the selection and construction of the prototype of a biocapsule. The simple dispersion method has the highest weighted value (93.7 / 100). While the methods of ionic gelation and interfacial polymerization remained in second and third place, while the method of spray drying got the lowest score. The approximate cost to obtain a batch of large multilamellar liposomes through the simple dispersion microencapsulation method containing bioactive compounds is \$ 23262, of which, \$ 21729 constitute equipment, while the remaining \$ 1533 constitutes the consumable material. To obtain unilamellar liposomes, an additional \$ 3867.30 is needed in equipment and \$ 598 for consumable materials. Considering that a research laboratory has the necessary equipment for this process, the preparation of a batch of unilamellar liposomes would cost \$ 2131. whose final product after the process are the large unilamellar liposomes.

Keywords: *Bioencapsulation, Shrimp, Simple dispersion, Liposome.*

ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES.....	5
RESUMEN.....	I
<i>ABSTRACT</i>	II
ÍNDICE GENERAL	III
ABREVIATURAS.....	V
SIMBOLOGÍA.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
ÍNDICE DE PLANOS.....	¡Error! Marcador no definido.
CAPÍTULO 1.....	9
1. Introducción	9
1.1 Descripción del problema	9
1.2 Justificación del problema	10
1.3 Objetivos	11
1.3.1 Objetivo General	11
1.3.2 Objetivos Específicos.....	11
1.4 Marco teórico.....	11
CAPÍTULO 2.....	21
2. Metodología	21
CAPÍTULO 3.....	27
3. Resultados y análisis	27
CAPÍTULO 4.....	35
4. Conclusiones y recomendaciones	40
4.1 Conclusiones	40
4.2 Recomendaciones.....	42

BIBLIOGRAFÍA.....	43
APÉNDICES.....	46

ABREVIATURAS

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
CENAIM	Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas
WSSV	Síndrome del Virus de la Mancha Blanca
AHPND	Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda
PEG	Polietilenglicol
PLGA	Ácido Poliláctico Coglicólico
PLA	Poliácido Láctico
LMG	Liposomas Multilamelares Grandes
LUP	Liposomas Unilamelares Pequeños
LUG	Liposomas Unilamelares Grandes
EYPC	Fosfatidilcolina proveniente de la yema del huevo

SIMBOLOGÍA

Mg	Magnesio
Mn	Manganeso
kDa	Kilodalton
pH	Potencial de Hidrógeno
μ	Micras
gr	Gramo

ÍNDICE DE FIGURAS

ILUSTRACIÓN 1.1 DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE (A) MICROCÁPSULAS Y (B) MICROESFERAS FUENTE: (MASOOMI, GUTIERREZ-MADDOX, ALFARO, & SEYFODDIN, 2018)	14
ILUSTRACIÓN 1.2 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE UNA MICROPARTÍCULA MULTICAPA PARA EL TRANSPORTE DE COMPONENTE BIOACTIVOS HACIA EL INTESTINO DE ESPECIES DE ACUICULTURA. FUENTE: (MASOOMI, GUTIERREZ-MADDOX, ALFARO, & SEYFODDIN, 2017)	16
ILUSTRACIÓN 2.1 (A) MOLÉCULA ANTIPÁTICA, (B) FORMACIÓN DE LA BICAPA, (B) LIPOSOMA. FUENTE: (VILLA & PEDROZA, 2015)	23
ILUSTRACIÓN 2.2 LIBERACIÓN DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS DE LOS LIPOSOMAS A LAS CÉLULAS. FUENTES: (VILLA & PEDROZA, 2015).....	24
ILUSTRACIÓN 3.4. DISEÑO DE UN ESQUEMA DE BIOENCAPSULACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE LIPOSOMAS UNILAMELARES POR EL MÉTODO DE DISPERSIÓN SIMPLE. MODIFICADO DE (SÁNCHEZ CARPINTERO, SÁNCHEZ NAVARRO, & DE JESÚS VALLE, 2016).....	36

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 3.1 CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS PRINCIPALES MÉTODOS DE MICROENCAPSULACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS MÁS ADECUADO CONTRA PATÓGENOS BACTERIANOS DE LARVAS DE CAMARÓN PARA POSTERIOR INCLUSIÓN EN EL ALIMENTO PARA PRUEBAS EXPERIMENTALES. LOS CRITERIOS ESTÁN AGRUPADOS POR CATEGORÍA Y SON PONDERADOS EN BASE A LA IMPORTANCIA DEL CRITERIO PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCÁPSULAS VIABLES A NIVEL EXPERIMENTAL.	28
TABLA 3.3 MATERIALES USADOS EN LOS MÉTODOS DE ENCAPSULACIÓN PARA LOS TRES COMPONENTES DE UNA BIOCÁPSULA (CÁPSULA, MATRIZ Y COMPUESTOS ACTIVOS).	32
TABLA 3.4 ANÁLISIS APROXIMADO DE COSTOS DE CONSTRUCCIÓN DEL MÉTODO DISPERSIÓN SIMPLE PARA LA OBTENCIÓN DE LIPOSOMAS MULTILAMELARES GRANDES.	37
TABLA 3.6 RESUMEN DE COSTOS PARA LA PREPARACIÓN DE UN BATCH DE LIPOSOMAS UNILAMELARES A PARTIR DE LIPOSOMAS UNILAMELARES GRANDES USANDO LOS MÉTODOS DE MICROENCAPSULACIÓN DE DISPERSIÓN SIMPLE Y SUBPROCESO DE SONICACIÓN.	39
TABLA 5.1 CALIFICACIONES DE LA DESCRIPCIÓN POR CRITERIOS DE SELECCIÓN PARA LA MEJOR ALTERNATIVA.	47

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

La producción ecuatoriana de camarón de cultivo es el primer producto no petrolero de exportación, con ingresos en el 2017 de \$3038 millones (Banco Central del Ecuador, 2018). Sin embargo, estas cifras de producción se ven amenazadas por las enfermedades, siendo estas, la principal limitante a la producción de camarón en Ecuador. Por ejemplo, la crisis que sufrió la industria acuícola, en los años 1998 a 2000, por la epidemia del virus del síndrome del virus de la mancha blanca (WSSV) afectó de manera significativa a la industria, causando pérdidas económicas de \$1200 millones, 122000 plazas de trabajos perdidas y el quiebre de la industria (García, 2003). Al momento, las enfermedades más emergentes de camarón a nivel mundial son de etiología bacteriana. Una de las enfermedades bacterianas de mayor preocupación mundial por el alto impacto económico es la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND, inicialmente conocida como síndrome de mortalidad temprana), con pérdidas de 1 billón de dólares reportadas en Asia (Jalil Zorriehzahra & Banaederakhshan, 2015).

La enfermedad fue detectada inicialmente en China (2009) y rápidamente se propagó a otros países asiáticos, como Vietnam (2010), Malasia (2011) y Tailandia (2012) y posteriormente a México y América del sur (Tran et al., 2013; Joshi et al., 2014; Nunan et al., 2014; Soto-Rodríguez et al., 2015, Soto-Rodríguez et al., 2015 y Restrepo et al., 2016).

Descripción del problema

Existe la necesidad de administrar un agente supresor del patógeno causante de enfermedades bacterianas causantes de mortalidad en larvas de camarón. Por lo que es importante encontrar un método adecuado que permita el ingreso de compuestos bioactivos en el sistema digestivo de larvas de camarón, teniendo en consideración que dicho componente debe mantener su actividad hasta que logre combatir la enfermedad.

1.1 Justificación del problema

Altas mortalidades han sido observadas en laboratorio de larvas locales por efecto de enfermedades, especialmente de etiología bacteriana. Un estudio realizado por investigadores de CENAIM reveló que varios de los productos comercializados en Ecuador para enfermedades de camarón tienen escasa efectividad contra cepas bacterianas patógenas circulantes en los laboratorios locales de producción de larvas, revelando así la necesidad de diseñar productos específicos que mitiguen estas enfermedades (Sotomayor et al. 2019). Los antibióticos han sido la alternativa tradicional para controlar enfermedades bacterianas en larviculturas de camarón. No obstante, el uso de estos químicos conlleva a algunos problemas, tales como rechazo de lotes de camarón por parte de los países importadores por detección de residuos de antibióticos (FAO; 2002); residualidad en el ambiente y transferencia bacteriana de genes de resistencia a antibióticos (Casas et al., 2005). En este contexto, existe la necesidad de controlar las enfermedades en larvicultura de camarón con sustancias naturales bioactivas contra agentes patógenos bacterianos. CENAIM realiza un importante esfuerzo en investigaciones sobre desarrollo de productos antimicrobianos naturales, entre ellos compuestos bioactivos aislados de microalgas, macroalgas y bacterias, capaces de controlar los agentes etiológicos de estas enfermedades.

Estos componentes deben ser ingresados a las larvas por vía oral, por lo que es altamente viable que puedan ser encapsulados. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar un protocolo de bioencapsulación de los compuestos bioactivos mencionados, para posteriormente incorporarlos a dietas de larvas de camarón. En tal sentido, el centro iniciará un proyecto de investigación donde se requiere diseñar un proceso de bioencapsulación de productos antimicrobianos para estos organismos, para posteriormente incorporar compuestos bioactivos, una vez que estos sean identificados por los investigadores del proyecto. El microencapsulado resultante debe considerar un tamaño de la partícula acorde al tamaño de la boca de la larva y debe mantener una concentración y calidad adecuadas hasta llegar al sistema digestivo del camarón.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Diseñar un proceso de bioencapsulación para una posterior inclusión en alimento de larvas de camarón.

1.2.2 Objetivos Específicos

1. Identificar procesos técnicos de inclusión de compuestos biológicos en alimento de larvas de camarón.
2. Analizar los materiales que pueden usarse para diseñar una biocápsula
3. Construir un prototipo de una biocápsula que contenga compuestos biológicos para una posterior inclusión en el alimento de larvas de camarón

1.3 Marco teórico

Larva de camarón blanco *Pennaeus vannamei*

La larvicultura es considerada el pilar del ciclo productivo del cultivo de camarón. En este proceso la larva pasa por diferentes fases, empezando por nauplios con 5 subestados, en donde el organismo se moviliza por medio de antenas y mandíbulas. Durante este estado, los animales presentan un solo ocelo y cuerpo indiferenciado alimentándose únicamente de las reservas vitelinas heredadas por la madre y alcanzando el último estado naupliar entre 12 a 30 horas dependiendo de la temperatura. El siguiente estado denominado Zoea, presenta 3 subestados, y es considerada la fase más crítica del desarrollo larval debido al inicio de su alimentación. Las zoeas son organismos plantónicos que tardan cerca de 36 horas por subestado hasta llegar al estado Mysis, este último presenta 3 subestados, culminando el desarrollo larval.

Uno de los factores determinantes para el éxito de un cultivo larvario es el manejo de las enfermedades emergentes que tienen el potencial de causar altas mortalidades. Se han identificado algunas enfermedades críticas dentro del desarrollo larvario de penaeidos como: bacterias luminiscentes, responsables de hasta un 70% de mortalidad en laboratorios de larvas; gregarinas y protozoarios, parásitos que afectan al animal de

manera intracelular o intercelular provocando una reducción en el crecimiento; enfermedades fúngicas causadas en la mayoría de los casos por *Lagenidium* y *Sirolopidium* causando altas mortalidades; bolitas blancas; bolitas negras; vibriosis sistémicas; necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV) (Cueller & Morales, 2008), recientemente renombrado como densovirus de decápodos *Penaeus stylirostris* (Cotmore et al. 2014) y Baculovirus penaei (Gil, 2001).

Ecuador produce aproximadamente 6000 millones de larvas al mes para cubrir la demanda de las granjas de camarón (Subsecretaría de Acuicultura, 2018). Sin embargo, las larviculturas han sido afectadas significativamente por algunas enfermedades bacterianas provocadas por patógenos del género *Vibrio*, tales como síndrome de las bolitas negras, causadas por *V. harveyi* (Robertson et al. 1998) y síndrome de Zoeas, causado por *V. harveyi* y *V. alginolyticus* (Vandenbergh et al. 1999). Recientemente, han aparecido nuevas cepas patógenas (*Vibrio campbellii*, *Vibrio owensii*, *Vibrio inhibens* y *Vibrio natriegens*) en las larviculturas ecuatorianas, diversificando las bacterias circulantes y haciendo que sea crucial estudiar la efectividad de tratamientos para patógeno bacteriano (Sotomayor et al., 2019).

Requerimientos nutricionales de las larvas de camarón

Para poder obtener una larva con las características fisiológicas en adecuadas condiciones y con la capacidad de soportar la influencia de agentes patógenos es necesario que el organismo esté alimentado según los requerimientos nutricionales que la especie necesita. Para esto, el alimento debe contener componentes como proteínas, vitaminas, minerales, lípidos, entre otros, que serán indispensables para el desarrollo del animal. Los requerimientos nutricionales de un organismo acuático pueden ser estimados utilizando un análisis de la composición de nutrientes (e.g. ácidos grasos) en estado silvestre. Estos resultados son posteriormente utilizados en la elaboración de dietas. Los estudios en *Penaeidos* relacionados con los porcentajes de inclusión de nutrientes son escasos. Los primeros estudios empezaron en la década de los 80 y se basaron en los efectos de las proteínas, lípidos y carbohidratos sobre el crecimiento y supervivencia. Niveles no adecuados de cualquiera de estos nutrientes puede retrasar la metamorfosis, el desarrollo, el crecimiento y causar altas mortalidades (García Galano, 1998).

Alimentación de las larvas de camarón

Los penaeidos pueden ser clasificados según su alimentación como organismos omnívoros, capaces de alimentarse de otros invertebrados y del zooplancton o de plantas, abasteciéndose de los nutrientes obtenidos como proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas, minerales y detritus. Estos nutrientes son utilizados para la formación y mantenimiento de los tejidos, el suplemento de energía y los requerimientos proteicos que dependen de las características del animal, como especie, estado fisiológico, tamaño y factores abióticos.

Los organismos mayormente utilizados en la alimentación para larvas de camarón en fases de mysis y protozoas son los nauplios de artemia (Kuban, Lawrence, & Wilkenfeld, 1985). Además, los rotíferos y nematodos también son muy utilizados en dietas de larvas. Durante todo el desarrollo larvario, el animal es alimentado con rotíferos, artemias, balanceados, dietas líquidas y diferentes especies de microalgas. Las microalgas presentan una calidad proteica alta y una composición variable de azúcares, siendo *Chaetoceros gracilis* y *Tetraselmis* spp. las más utilizadas porque ofrecen beneficios tales como proporciones nutricionales adecuadas a las larvas de camarón y excelente fuente de ácidos grasos (Calderón & CENAIM, 2015).

Características del alimento para larvas de camarón

Para elaboración de alimentos balanceados primero se debe considerar la calidad de las materias primas a utilizar, ya que el costo de facturación es alrededor del 90%. Por esto es necesario la selección de ingredientes de calidad teniendo en cuenta que la partícula debe tener algunas características propias para que puedan ser consumidas y aprovechadas en su totalidad por los organismos.

Para que la larva sea capaz de consumir la partícula, esta debe tener ciertas características, como palatabilidad, atractabilidad, tamaño de la partícula de acuerdo al tamaño de la boca del organismo, digestibilidad y formulación según las necesidades nutricionales de la especie.

Encapsulación

La encapsulación es un proceso en el que se usa material natural o sintético para aislar del entorno a organismos microscópicos vivos o compuestos bioactivos para que puedan ser ingresados al interior de especies acuícolas (Masoomi et al., 2018). La microencapsulación se refiere a la encapsulación de componentes con diámetros entre 1 y 1000 μm . Estas micropartículas o microcápsulas consisten de una cápsula con un núcleo vacío que sirve como reservorio para almacenar al compuesto que contiene al material biológico “bioactivo”, o pueden ser también microesferas si su núcleo es sólido (matriz) y el bioactivo se encuentra disperso en este (Figura 1). Ambas pueden ser protegidas con una capa extra para mayor estabilidad y control de liberación de los compuestos bioactivos, cuya liberación dependerá de la cápsula.

Cápsulas con materiales de alta calidad permitirán que los compuestos bioactivos puedan llegar a sitios específicos del animal, y a su vez puedan resistir amplios rangos de pH, temperatura, estado redox y fuerza iónica. Al disminuir la degradación de los compuestos bioactivos se mejora la biodisponibilidad del componente en el cuerpo del animal objetivo, redundando en mayor control en la administración de la dosis y por lo tanto en los efectos de los compuestos bioactivos como parte de un tratamiento médico.

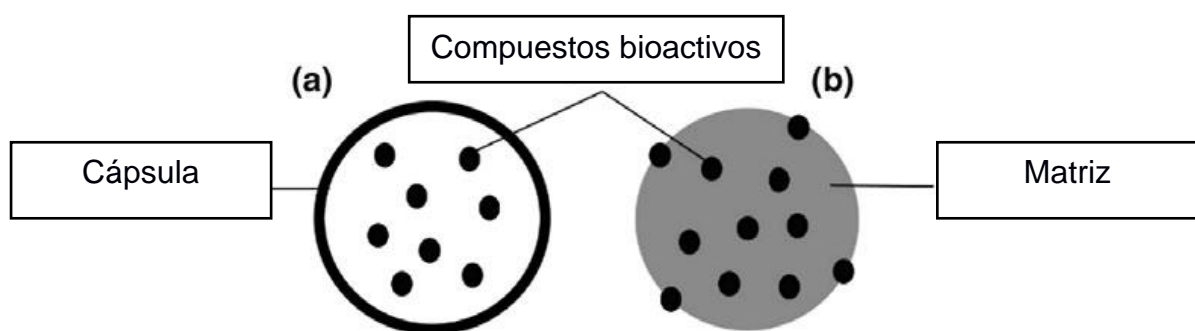


Ilustración 1.1 Diagrama esquemático de (a) microcápsulas y (b) microesferas Fuente: (Masoomi, Gutierrez-Maddox, Alfaro, & Seyfoddin, 2018)

La biodisponibilidad es la fracción y velocidad en la que un ingrediente activo se absorbe y se hace disponible en el sitio deseado. Esta puede ser interferida por la forma en la que se encapsuló el compuesto activo, su posterior inserción en el torrente sanguíneo y su liberación en el sitio de acción para que cumpla con el efecto deseado. Esta

biodisponibilidad ha sido comprobada en algunos estudios, en uno de ellos se ha usado liposomas encapsulando a la curcumina, sustancia con propiedades anti-metastásicas, y administrando a ratas, en donde hubo rápida velocidad, evidente extensión de absorción y alta actividad antioxidante. (Takahashi & UECHI, 2009).

Existen varios materiales utilizados para la encapsulación de componentes bioactivos. Una revisión detallada de estos materiales se encuentra en el trabajo de Masoomi et al. (2018) y se describen a continuación.

Materiales usados para la encapsulación de componente bioactivos

El encapsulado es suministrado por vía oral por su facilidad de administración y mínimo riesgo de estrés para el animal que lo consumirá. Sin embargo, para escoger el material con el que se va a fabricar la micropartícula, se debe tener en cuenta que esta podría diluirse en el agua antes de ser ingerida, además de que el agente bioactivo podría degradarse en el medio ácido del estómago del animal objetivo sin poder llegar al área de absorción que es el intestino (Figura 2). Por lo tanto, la elección del material dependerá de las características fisiológicas del animal. Entre las características más importantes, se encuentra el pH de las distintas componentes del sistema digestivo y condiciones de cultivo (temperatura, pH, y concentración de sales del agua de cultivo) y el comportamiento de alimentación de la especie (alimentación de partículas flotantes o del fondo del estanque).

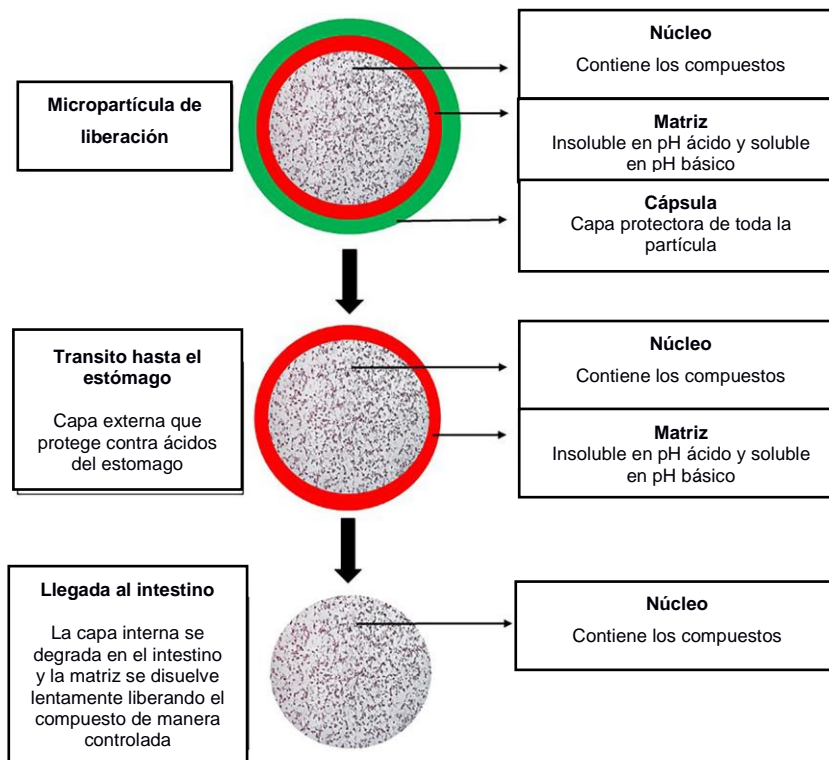


Ilustración 1.2 Representación esquemática de una micropartícula multicapa para el transporte de componente bioactivos hacia el intestino de especies de acuicultura. Fuente: (Masoomi, Gutierrez-Maddox, Alfaro, & Seyfoddin, 2017)

Materiales basados en polisacáridos

Alginato

Es el polímero natural más usado en encapsulación para uso en dietas de organismos acuícolas. Se obtiene de distintas especies de algas pardas como Phaeophyceae, y bacterias como *Azotobacter vinelandii* y *Pseudomonas* (Kurt et al. 2005). Su formulación es sencilla, biocompatible, biodisponible y de bajo costo. Sin embargo, se puede desnaturalizar al momento de su formulación por niveles extremos de temperatura y pH. Se conoce que con pH menor a 5 el material se depolimeriza, mientras que en soluciones básicas hay poca polimerización. Se suelen usar los métodos de gelificación iónica o térmica y entrecruzamiento covalente para producir microcápsulas de alginato (Donati & Paoletti 2009). La macroestructura de los alginatos contiene poros que permiten la

liberación rápida del bioactivo encapsulado. Cuando interactúan con cationes divalentes de Mg, Ca, Mn, Sr, Ba, Cu y Pb, se forma un hidrogel, cuya integridad y estabilidad se ve influenciada por la concentración de los iones (Haug & Smidsrød 1967; Haug & Smidsrod 1970). En caso de ser una concentración alta, se reduce la porosidad del alginato, favoreciendo a la encapsulación. Otra forma de reducir la porosidad, y por consiguiente tener mayor control sobre la liberación del encapsulado, es agregar agentes que generan mayor entrecruzamiento covalente, como el polietilenglicol (PEG). También se puede usar la foto entrecruzamiento, en el que se forma hidrogel flexible cuando se expone al alginato, modificado con metacrilato, a un láser en presencia de eosina y trietanol amina. Este método es de alto costo y retirar los fotoiniciadores que no reaccionaron puede ser complicado.

Quitosano

Es un polisacárido lineal, no tóxico, biodegradable derivado de la desacetilación de la quitina. Se lo puede obtener del exoesqueleto de crustáceos e insectos y también de diatomeas, crisoflagelados y ciertos oomicetos (Ruiz-Herrera 1991). Es de carga positiva con pKa de 6.5, y su estructura de glucosamina puede ser convertida en una forma soluble que puede ser disuelta en soluciones con pH menor de 6.5. Se han observado efectos negativos en bacterias ácido lácticas. Muestra propiedades mucoadhesivas cuando se relaciona con una superficie mucosa negativa. Es un buen transportador de macromoléculas a través de las células epiteliales intestinales. También se han podido administrar medicamentos con quitosano por vía nasal, ocular y oral. En acuicultura se ha usado más para encapsular vacunas y genes (Lehr et al. 1992; Kockisch et al. 2003; Sinha et al. 2004). Existe en 3 pesos moleculares: bajo (50 – 190 kDa), medio (130 – 310 kDa) y alto (310 kDa). Las últimas muestran mejores propiedades mucoadhesivas, formación de micropartículas con menor tamaño, velocidades bajas de liberación de contenido y enlace molecular más fuerte. La eficacia de encapsulación aumenta a medida que se incrementa el peso molecular del quitosano usado.

Ftalato acetato de celulosa

Es un polímero soluble en soluciones con pH igual o mayor a 6, que generalmente se usa como revestimiento protector de probióticos y drogas usadas para enfermedades

gástricas. En acuicultura se usa para proteger componentes del pH ácido del sistema digestivo superior, seguido por una liberación controlada del contenido de la cápsula en el intestino, donde el pH es mayor a 6. Sin embargo, el agua de pH básico usada en los estanques de cultivo podría disolver la cápsula, por eso ya no es usada, ya que no llega a ser ingerida (Albertiniet al. 2010).

Goma gellan

Es un exopolisacárido microbiano aniónico producido por *Pseudomonas elodea* (Morris et al. 2012). Es un polímero conformado por unidades de repetición de dos residuos de glucosa y un residuo de ramnosa y ácido glucorónico. Puede resistir temperaturas altas y condiciones ácidas. Su gelificación depende de la temperatura y se puede dar en presencia de cationes mono, di y trivalentes. El contenido de acetyl, concentración y tipo de iones, pH y adición de compuestos hidrofílicos pueden influenciar la fortaleza del gel. La presencia de grupos acilos no permite la interacción entre los polímeros, resultando en un gel débil y elástico; mientras que la presencia de iones de Ca, Na, K y Mg usados durante la gelificación resulta en un gel más rígido. Este material se ha usado para encapsular agentes bioactivos, entre ellos probióticos, nutrientes y enzimas, ya que es estable contra enzimas como pectinasa, amilasa, celulasa, papaína y lipasa, las cuales son parte del difícil ambiente del sistema digestivo de la larva de camarón. Es primordialmente efectivo en agua de mar debido a su alta estabilidad en pH básico y en concentraciones de NaCl de hasta 50 g/L (Ashtaputre & Shah 1995).

Materiales basados en proteínas

Gelatina

Es un subproducto disponible de la industria de carnes y cueros. Se ha usado combinado con alginato para encapsular probióticos para bagres (Kumaree et al. 2014). Su propiedad anfótera facilita la interacción con polisacáridos aniónicos. La gelatina es de bajo costo, no es tóxica y sirve como agente encapsulador biodegradable. Su desventaja se presenta con su poca estabilidad frente al calor e insolubilidad en agua fría, y la pequeña diferencia entre su temperatura de fusión y de gelificación limita su aplicación como agente encapsulador protector (Estevinho et al. 2013).

La gelatina requiere de agentes de entrecruzamiento, como el genipin, extraído de la fruta de la gardenia, para producir geles rígidos. Sin embargo, aún con estos agentes, se ha mostrado que la gelatina libera su contenido rápidamente una vez que entra en contacto con los jugos gástricos. Es por esto por lo que requiere de una segunda capa protectora, como el alginato. La carga negativa del alginato con la carga positiva de la gelatina permite la formación de un complejo poliiónico. La gelatina también puede ser metacrilada a distinto nivel para producir un hidrogel de distintas concentraciones, que permitirá que sea estable a 37°C (Nichol et al. 2010).

Proteína de suero de leche

Es una molécula globular y anfipática derivada de la leche que mayormente se usa como un emulsificador. Actúa en la interfase de dos sustancias inmiscibles formando puentes disulfuros e hidrofóbicos. Puede interactuar con polisacáridos de carga negativa en condiciones de pH bajo su punto isoeléctrico. Se ha usado en encapsulación de probióticos, como el *Bifidobacterium* Bb-12, usando gelificación inducida por calor mediante secado por pulverización (De CastroCislaghi et al. 2012). También se ha reportado supervivencia de bacterias encapsuladas en condiciones gástricas simuladas. En acuicultura se la ha usado combinada con pectina para proteger probióticos administrados a larvas del pez pacu *Piaractus mesopotamicus* (Rodrigues et al. 2014).

“Jaulas” de proteínas virales

Son partículas similares a los virus compuestos por una cubierta proteica sin material genético en su interior. Pueden nano encapsular proteínas, enzimas, genes, etiquetas para imagenología y drogas. Pueden ser modificados química y genéticamente para producir nanocontenedores, dándoles la capacidad de administrar agentes a sitios específicos. Su sistema de liberación de contenido responde a cambios en el pH. Tienen tamaños de 10 – 2000 nm, estructura uniforme y tridimensional de alta resolución, fácil de construir y con buenos rendimientos en distintos huéspedes.

Materiales basados en poliéster

Ácido poliláctico coglicólico (PLGA)

Este material tiene distintas formas enantioméricas, lo cual permite ser procesado en distintas formas y tamaños. Absorbe menos agua y se degrada más lentamente. La liberación de su contenido se da por difusión por medio de la barrera polimérica o por erosión del material polimérico, o una combinación de ambos. Tiene naturaleza acídica, por lo que, si se va a aplicar como única capa, debe ser correctamente administrada, aunque la mezcla con alginato o quitosano podría reducir este riesgo. Se ha usado para introducir plásmidos de ADN y antígenos a peces, mostrando mejoría en la respuesta inmune. Requiere de cuidado durante el proceso de encapsulación porque usa solventes orgánicos.

Poliácido láctico (PLA) nombre completo.

Es un polímero sintético, no tóxico y biodegradable. Se lo considera como un bioplástico por lo que se ha usado para liberación de sustancias a largo plazo. Puede ser parte de la cubierta, como también de la matriz para reducir la velocidad de desintegración del contenido en agua de mar (Masoomi Dezfooli, Gutierrez-Maddox, Alfaro, & Seyfoddin, 2017)

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

El diseño de un proceso de bioencapsulación de compuestos activos contra patógenos bacterianos para larvas de camarón estuvo compuesto de las siguientes etapas: (1) análisis de los procesos técnicos de inclusión de compuestos biológicos en alimento de larvas de camarón (2) descripción de los materiales adecuados para el diseño de una biocápsula y (3) diseño del prototipo de una biocápsula que contenga compuestos biológicos, para una posterior inclusión en alimento de larvas de camarón.

2.1 Identificación de los procesos técnicos de inclusión de compuestos biológicos en alimento de larvas de camarón.

Se realizó una revisión bibliográfica de los principales métodos de microencapsulación de compuestos biológicos reportados en la literatura y se analizó principalmente las ventajas y desventajas desde el punto de vista de potencial aplicación de estos métodos para la inclusión de compuestos biológicos activos contra bacterias patógenas en dietas secas de larvas de camarón.

Secado por aspersión es un proceso físico de microencapsulación de dos pasos, que transforma un fluido en material sólido, obteniendo en promedio partículas menores a 100 μ . El primer paso consiste en la preparación de una emulsión conteniendo los compuestos activos, mientras que, en el segundo paso, la solución obtenida en el primer paso es atomizada y deshidratada a alta temperatura por un corto periodo de tiempo. Este método es utilizado para encapsular materiales sensibles al calor. (Villena, Hernández, Gallardo, & Martínez, 2009). Con este método se ha encapsulado polímeros sintéticos y copolímeros, ceras, hidratos de carbono, grasas y proteínas de origen vegetal y animal (González B.E., Ochoa Martínez L.A, & Rutiaga-Quiñones O.M, 2015). En la industria farmacéutica se usan poliuretanos, poliestirenos, polímeros fenólicos, poliamidas, poliacrilatos y polietilenglicol como materiales para la formación de la capsula. Por otro lado, en la industria alimenticia se usa azúcares, gomas, polisacáridos naturales y modificados y polímeros sintéticos como materiales encapsulantes.

Polimerización interfacial es un proceso químico de microencapsulación, mediante el cual se crea una membrana o pared de la microcápsula en la interfase de dos sustancias que no pueden mezclarse entre sí. Para ello, este proceso se da en 3 etapas. Inicia con la diseminación del medio acuoso de una sustancia reactiva y soluble en agua en una fase orgánica que tendrá como resultado la emulsión de agua en aceite. El proceso continúa con unas gotas de agua en donde ha sido creada en su superficie una membrana polimérica. Finalmente, la microcápsula es separada por centrifugación de la fase orgánica para ser transferida al agua y formar una suspensión acuosa. (Villena, Hernández, Gallardo, & Martínez, 2009) (Jimenez-Solomon, Qilei Song, Jelfs, Munoz-Ibanez, & Livingston, 2016)

En este proceso se usan las siguientes sustancias como material de recubrimiento: hidrógeno fosfato di amonio, disocianato de difenil metileno, dilaurato de dibutilestano, tolueno, dioleato de polioxietileno y trioleato de Sorbitan, aunque algunos polímeros como las poliamidas, poliuretanos y nailon son también utilizados (Nava, Michelena, Iliná, & Martínez, 2015). Para este método es indispensable contar con algunos equipos como homogeneizador, horno, decantador, espectrofotómetro infrarrojo computarizado y dimensionador óptico de partículas (D. Saihi, I. Vroman, S. Giraud, & S. Bourbigot, 2006).

Gelificación iónica es un método fisicoquímico y se subdivide en dos métodos: (i) gelificación interna, que consiste en la liberación de calcio en una solución de alginato de sodio desde un complejo insoluble para obtener partículas cercanas a 50 μ y (ii) gelificación externa, este método adiciona sal en la matriz de emulsión de agua en aceite, con el que se obtiene tamaño de partículas variables y microcápsulas poco estables. (Villena, Hernández, Gallardo, & Martínez, 2009).

Para la preparación de las microcápsulas de alginato se requiere una solución de alginato de sodio, determinada masa de cloruro de calcio y de diclofenaco sódico, agitador, goteo y horno de bandeja (Lupo, Carmen González, & Maestro, 2012). Para obtener el tamaño deseado de la partícula se utilizan tamices. Luego de desecar las micropartículas se las monitorea mediante un microscopio óptico (Calero, Sánchez, Tórrez, Ena, & López, 2008) (ROMERO, 2016).

Dispersión simple es un proceso fisicoquímico basado en liposomas de forma esférica, que contienen varias bicapas fosfolipídicas que a su vez envuelven una cavidad acuosa cuyo tamaño del compartimiento puede ser tan diminuto como $0,4 \mu$ (Figura 2.1). Este método tiene algunas bondades como alta biodisponibilidad, alta protección y captación de compuestos activos pocos solubles, como proteínas y péptidos (Villa-García, San Martín-Martínez, & Pedroza-Islas, 2015). Los transportadores basados en lípidos tienen mayor posibilidad de producción industrial, buena eficiencia de encapsulación y menor toxicidad en comparación con los que están elaborados de hidratos de carbono y proteínas. Los nanoliposomas y liposomas han logrado encapsular enzimas, minerales, vitaminas, antimicrobianos, entre otros compuestos bioactivos insolubles. Estos tienen la ventaja de ser biocompatibles, biodegradables, eficaces para poder ser atrapados, fáciles para entregar y liberar fármacos, genes de diagnóstico, ingredientes liposolubles, hidrosolubles, anfífilicos y tienen la capacidad de ser direccionados, es decir que se pueden adaptar, entregar y liberar su contenido en un lugar específico de un sistema (Figura 2.1).

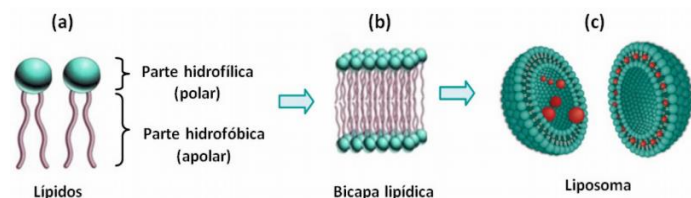


Ilustración 2.1 (a) Molécula anfipática, (b) Formación de la bicapa, (c) Liposoma. Fuente: (Villa & Pedroza, 2015)

La liberación del compuesto activo de los liposomas a las células puede describirse en cuatro mecanismos. En la absorción, la cápsula se adhiere a la superficie de la membrana plasmática y lentamente se difunde al interior de la célula mientras libera su contenido (Figura 2.2). Otro mecanismo describe la fusión del liposoma con la membrana plasmática para posteriormente liberar su carga al interior de la célula (Figura 2.2). En la endocitosis, la membrana plasmática se invagina por medio de transporte activo y engloba al liposoma formando una vesícula; una vez dentro del organismo, este se rompe y se libera el compuesto activo (Figura 2.2). Por último, existe también la

posibilidad de intercambio de lípidos entre la membrana plasmática y la bicapa lipídica del liposoma (Figura 2.2), llevando a que los componentes de la cápsula puedan ingresar en el sistema del organismo (González B.E., Ochoa Martínez L.A, & Rutiaga-Quiñones O.M, 2015).

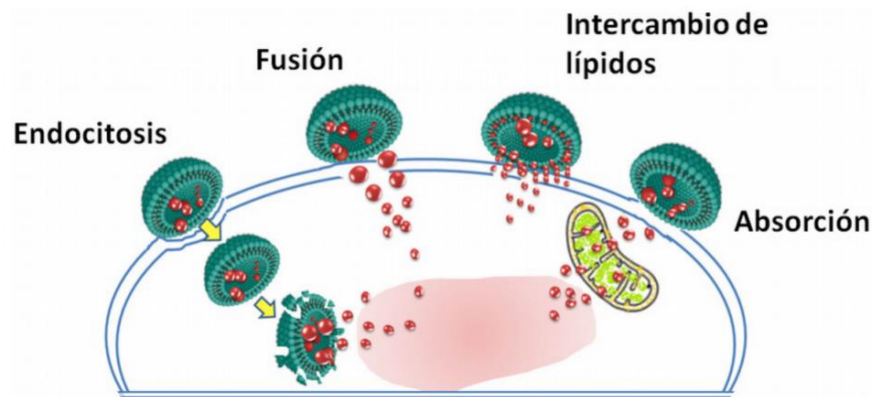


Ilustración 2.2 Liberación de los compuestos activos de los liposomas a las células.
Fuentes: (Villa & Pedroza, 2015)

Posteriormente, se identificó los criterios de evaluación más importantes de los procesos de microencapsulación, los mismos que fueron agrupados en categorías de criterios relacionados con: la *biocápsula* (tamaño y variabilidad del tamaño de la biocápsula y capacidad de las microcápsulas de contener compuestos bioactivos sin interferir en la bioactividad y número de mecanismos de liberación de estos compuestos bioactivos), las *limitaciones del proceso tecnológico de microencapsulación* (reproducibilidad y dificultad del método) y *facilidades de aplicación del método utilizando los recursos de ESPOL* para una posterior fabricación de un prototipo a nivel experimental (disponibilidad de equipos y materiales para la biocápsula y costo final del proceso de microencapsulación experimental).

Posteriormente, se valoraron estos criterios para cada uno de los métodos de microencapsulación, para lo cual se realizaron tres procesos de valoración: (i) cada uno de los criterios de evaluación fue ponderado en base a la importancia del criterio para la obtención final de biocápsulas viables a nivel experimental, donde la suma de estas

ponderaciones fue igual a 100, (ii) el desempeño de estos criterios fueron calificados para cada uno de los métodos de microencapsulación, calificando cada método con un valor de entre 0, 1, 2 y 3, donde la más baja calificación (valor igual a cero) fue asignado a los métodos que no cumplían el criterio, el valor 1 fue asignado a los métodos que presentaron el menor desempeño del criterio respectivo, el valor 2 fue asignado a aquellos métodos que presentaron un desempeño intermedio del criterio, mientras que, el valor 3 fue asignado a aquellos métodos que exhibieron un desempeño más deseable del criterio y finalmente iii) los criterios fueron ponderados considerando el valor de ponderación del criterio, de tal forma que, los métodos que fueron calificados con el valor igual a 3 recibieron el máximo valor ponderado (valor igual a la ponderación asignada al criterio específico), en tanto que el resto de los valores fueron proporcionalmente ponderados. Para cada uno de los métodos se sumó los valores obtenidos en todos los criterios.

A continuación, se muestra el análisis de los principales métodos de microencapsulación de compuestos biológicos reportados en la literatura enfocado principalmente las ventajas y desventajas desde el punto de vista de potencial aplicación de estos métodos para la inclusión de compuestos biológicos activos contra bacterias patógenas en dietas secas de larvas de camarón.

2.2 Análisis de los materiales adecuados para el diseño de biocápsula

Se realizó una búsqueda bibliográfica de los materiales más usados en las biocápsulas de los principales métodos de microencapsulación y se clasificaron de acuerdo al tipo de componente de la biocápsula (cápsula, matriz y compuestos bioactivos), con énfasis en el método de microencapsulación que obtuvo el mayor puntaje en la etapa de identificación de los procesos técnicos de microencapsulados.

2.3 Construcción del prototipo de una biocápsula

Para la construcción del prototipo de una biocápsula se determinó el método de microencapsulación que obtuvo el mayor puntaje en el valor total ponderado de los

criterios de evaluación y el que ha sido usado para bioencapsular materiales bioactivos como antimicrobianos. El prototipo fue construido considerando los siguientes tres aspectos: (i) los procesos tecnológicos que utiliza el método de bioencapsulación escogido, (ii) las facilidades tecnológicas de las que dispone la ESPOL y (iii) los compuestos biológicos seleccionado como potencialmente bioactivos contra patógenos bacterianos. Los tres aspectos fueron resumidos en un esquema que describe el prototipo de una biocápsula que contiene compuestos biológicos contra patógenos bacterianos, para una posterior inclusión en alimento de larvas de camarón. El prototipo incluyó un análisis de costos del método seleccionado.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Identificación de los procesos técnicos de inclusión de compuestos biológicos en alimento de larvas de camarón.

En el primer proceso de valoración, los criterios relacionados a la categoría de la biocápsula fueron considerados los más importantes para llegar a obtener biocápsulas viables a nivel experimental, recibiendo el 60% de la ponderación total de criterios (Tabla 3.1). Mientras que, los criterios relacionados a las categorías de limitaciones del proceso tecnológico de microencapsulación y facilidades de aplicación utilizando los recursos de ESPOL fueron ponderadas con el restante 40% (Tabla 3.1). Se consideró que los criterios más importantes relacionados a la biocápsula eran tamaño de la microcápsula (dado que estas deben tener un tamaño acorde con el tamaño de la boca de la larva) y los criterios relacionados con los compuestos bioactivos, dado que el método a escoger debe asegurar tanto la capacidad de contener compuestos bioactivos sin interferir en la bioactividad (mantener una concentración y calidad adecuadas hasta llegar al sistema digestivo del camarón), como ser versátil al brindar un amplio número de mecanismos de liberación de los compuestos bioactivos (Tabla 3.1). Por tal razón, ambos tipos de categorías recibieron cada uno el 25% de la ponderación total de criterios (Tabla 3.1). En cuanto a los criterios relacionados a las categorías de limitaciones del proceso tecnológico de microencapsulación y facilidades de aplicación utilizando los recursos de ESPOL, tanto la reproducibilidad del método, como costo final del proceso de preparación de microcápsulas recibieron las ponderaciones más altas y similares entre sí (13% y 16%, respectivamente), dado que es importante tanto que el método brinde resultados similares en el tiempo para minimizar errores al momento de comparar resultados de diferentes experimentos de microencapsulación de potenciales compuestos bioactivos, como que la preparación de las microcápsulas no tenga un costo elevado y con ello evitar que sea un limitante para la experimentación (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Criterios de evaluación de los principales métodos de microencapsulación de compuestos bioactivos más adecuado contra patógenos bacterianos de larvas de camarón para posterior inclusión en el alimento para pruebas experimentales. Los criterios están agrupados por categoría y son ponderados en base a la importancia del criterio para la obtención de biocápsulas viables a nivel experimental.

Categoría	Criterio de evaluación	Ponderación (%)	Método de microencapsulación			
			Secado por aspersión	Polimerización interfacial	Gelificación iónica	Dispersión simple
Biocápsula	Tamaño de la microcápsula	25	< 100 μ	0.1 – 20 μ	\pm 50 μ	0.4-5 μ
	Variabilidad del tamaño de partícula	10	Media	Media	Alta	Baja
	Capacidad de microcápsulas de contener compuestos bioactivos sin interferir en la bioactividad	15	Media	Alta	Media	Alta
	Versatilidad de mecanismos de liberación de los compuestos bioactivos	10	Absorción	Absorción Endocitosis Fusión Intercambio de lípidos	Difusión Disolución	Absorción Endocitosis Fusión Intercambio de lípidos
Limitaciones del proceso tecnológico de microencapsulación	Reproducibilidad del método	13	Alto	Alto	Alto	Alto
	Dificultad del método	3	Bajo	Bajo	Bajo	Medio
Facilidades de aplicación del método utilizando los recursos de ESPOL	Disponibilidad de equipos y materiales para bioencapsulación en ESPOL	8	No	No	Si	Si
	Costo final del proceso de preparación de microcápsulas	16	Bajo	Alto	Bajo	Medio

En el segundo proceso de valoración, cuando se valoraron todos los métodos en cuanto al cumplimiento adecuado de cada criterio considerando la ponderación de cada criterio, se encontró que el método con mayor valoración ponderada en los criterios relacionados a la categoría de la *biocápsula* fue el de dispersión simple, con 50 puntos para esta categoría (Tabla 3.2). En tanto que, el método de secado por aspersión fue el método que, aunque lejano al de dispersión simple presentó la segunda mejor puntuación, con 25 puntos (Tabla 3.2). Específicamente, el método mejor puntuado para *tamaño de la*

microcápsula fue el de dispersión simple debido a que el tamaño del producto final luego del proceso (0.4 – 5 μ) se encuentra dentro del rango óptimo necesario para que la microcápsula pueda ser incluida dentro de dietas de larvas de camarón (Tabla 3.1). Para el criterio de *variabilidad del tamaño de partícula* se obtuvo, al igual que en el criterio anterior, un máximo puntaje con el método de dispersión simple, dado que con este método se obtiene partículas con baja variabilidad de tamaño, obteniendo una alta homogeneidad de las partículas luego del proceso de microencapsulación (Tablas 3.1 y 3.2). Por otro lado, en cuanto a la *capacidad de las microcápsulas de contener compuestos bioactivos sin interferir en la bioactividad*, los métodos que más sobresalieron son dispersión simple y polimerización interfacial (Tabla 3.2), por presentar mayor capacidad de contener elementos sin interferir en la bioactividad frente a los otros dos métodos (Tabla 3.1). Además, ambos métodos presentaron igual versatilidad en cuanto a los mecanismos de liberación de compuestos bioactivos, dado que en ambos métodos se puede liberar los compuestos bioactivos a través de cuatro mecanismos (endocitosis, fusión, intercambio de lípidos y absorción, Tabla 3.1), siendo el puntaje en esta categoría igual a 10 puntos para cada uno de los dos métodos (Tabla 3.2).

Tabla 3.2 Evaluación de criterios de selección de métodos de microencapsulación de compuestos bioactivos contra patógenos bacterianos para posterior inclusión en alimento de camarón

Categoría	Criterio	Ponderación (%)	Calificación del método de microencapsulación				Valor ponderado del método microencapsulación			
			Secado por aspersión	Polimerización interfacial	Gelificación iónica	Dispersión simple	Secado por aspersión	Polimerización interfacial	Gelificación iónica	Dispersión simple
Biocápsula	Tamaño de la microcápsula	25	1	2	1	3	8,3	16,7	8,3	25,0
	Variabilidad del tamaño de partícula	10	2	2	1	3	6,7	6,7	3,3	10,0
	Capacidad de microcápsulas de contener compuestos bioactivos sin interferir en la bioactividad	15	2	3	2	3	10,0	15,0	10,0	15,0
	Versatilidad (número de mecanismos de liberación de compuestos bioactivos)	10	1	3	2	3	3,3	10,0	6,7	10,0
Limitaciones del proceso tecnológico de microencapsulación	Reproducibilidad del método	13	3	3	3	3	13,0	13,0	13,0	13,0
	Dificultad del método	3	3	3	3	2	3,0	3,0	3,0	2,0
Facilidades de aplicación del método utilizando los recursos de ESPOL	Disponibilidad de equipos y materiales para bioencapsulación (ESPOL)	8	0	0	3	3	0,0	0,0	8,0	8,0
	Costo final del proceso de preparación de microcápsulas	16	3	1	3	2	16,0	5,3	16,0	10,7
Total criterios de ponderación		100%	Total valores ponderados de métodos de microencapsulación				60,3	69,7	68,3	93,7

En la categoría de *limitaciones del proceso tecnológico de microencapsulación*, todos los cuatro métodos tuvieron igual valoración en reproducibilidad del método (valor ponderado igual a 10) dado que todos presentan una alta reproducibilidad (Tablas 3.1 y 3.2). Por el contrario, los métodos de secado por aspersión, polimerización interfacial y gelificación iónica presentan una baja dificultad en ejecución de la metodología, en tanto que el método de dispersión simple presenta una dificultad media de ejecución (Tabla 3.1); lo cual se reflejó en el puntaje ponderado para esta categoría (valor igual a 3 para los primeros tres métodos y valor de 2 para el método de dispersión simple, Tabla 3.2). Por último, en la categoría de *Facilidades de aplicación del método utilizando los recursos de ESPOL*, la institución no dispone de equipos para realizar encapsulaciones por los métodos de secado por aspersión ni polimerización interfacial, mientras que si dispone del equipamiento para ejecutar los métodos de gelificación iónica y dispersión simple (Tabla 3.1), lo cual se ve reflejado en la valoración respectiva (puntaje de 0 y 8 para los grupos de métodos mencionados, Tabla 3.2). En cuanto al *costo final del proceso de preparación de microcápsulas*, la fabricación de microcápsulas por secado por aspersión y gelificación iónica presentan los costos más bajos (valor ponderado igual a 16, Tabla 3.2), seguido por el método de dispersión simple (valor ponderado igual a 11, Tabla 3.2) y dejando en último lugar como el método más costoso a la polimerización interfacial (valor ponderado igual a 5, Tabla 3.2).

El método de dispersión simple presentó el mayor total de valor ponderado (93.7). En tanto que los métodos de gelificación iónica y polimerización interfacial quedaron en forma alejada en segunda y tercer lugar, mientras que el método de secado por aspersión sacó el menor puntaje (Tabla 3.2).

3.2 Descripción de los materiales adecuados para el diseño de una biocápsula

Luego del análisis de las publicaciones se determinaron los materiales usados para todos los métodos de encapsulación (Tabla 3.3).

Tabla 3.2 Materiales usados en los métodos de encapsulación para los tres componentes de una biocápsula (cápsula, matriz y compuestos activos).

Componente	Componente			Referencias
	Cápsula	Matriz	Compuestos activos	
Secado por aspersión	Polímeros sintéticos Carbohidratos Grasas Ceras Proteína animal Proteína vegetal	Gomas Azucares Polisacáridos naturales Polímeros sintéticos	Acidulantes, grasas, saborizantes, betalaínas, polifenoles, carotenoides, antocianinas	(González B.E., Ochoa Martínez L.A, & Rutiaga-Quiñones O.M, 2015).
Polimerización interfacial	Polímeros Poliamidas Poliuretanos Nailon	Hidrógeno fosfato di amonio Disocianato de difenil metileno Dilaurato de dibutilestaño, tolueno Dioleato de polioxietileno y trioleato de Sorbitan	Fármacos, aceites esenciales	(D. Saihi, I. Vroman, S. Giraud, & S. Bourbigot, 2006).
Gelificación iónica	Sales de alginato Sal de sodio Alginato propilenglicol Derivados de sal de amonio	Polímeros Alginatos	Probióticos, vitaminas, aminoácidos, minerales, pequeñas moléculas como células, enzimas y microorganismos	(Calero, Francisco Sánchez, Tórriz, Hernann, & López, 2008) (ROMERO, 2016) (Lupo Pasin, González Azón, & Maestro Garriga, 2012)
Dispersión simple	Fosfolípidos del grupo fosfatidilcolina Dipalmitoylphosphatidylcholine(DPPC) 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC)	Fosfatidilcolina natural Egg yolk phosphatidylcholine (EYPC) Solución orgánica	Enzimas, minerales, vitaminas, antimicrobianos, compuestos activos insolubles, probióticos	(Elisenda Casals, Galán, Escolar, Gallardo, & Estelrich, 2003).

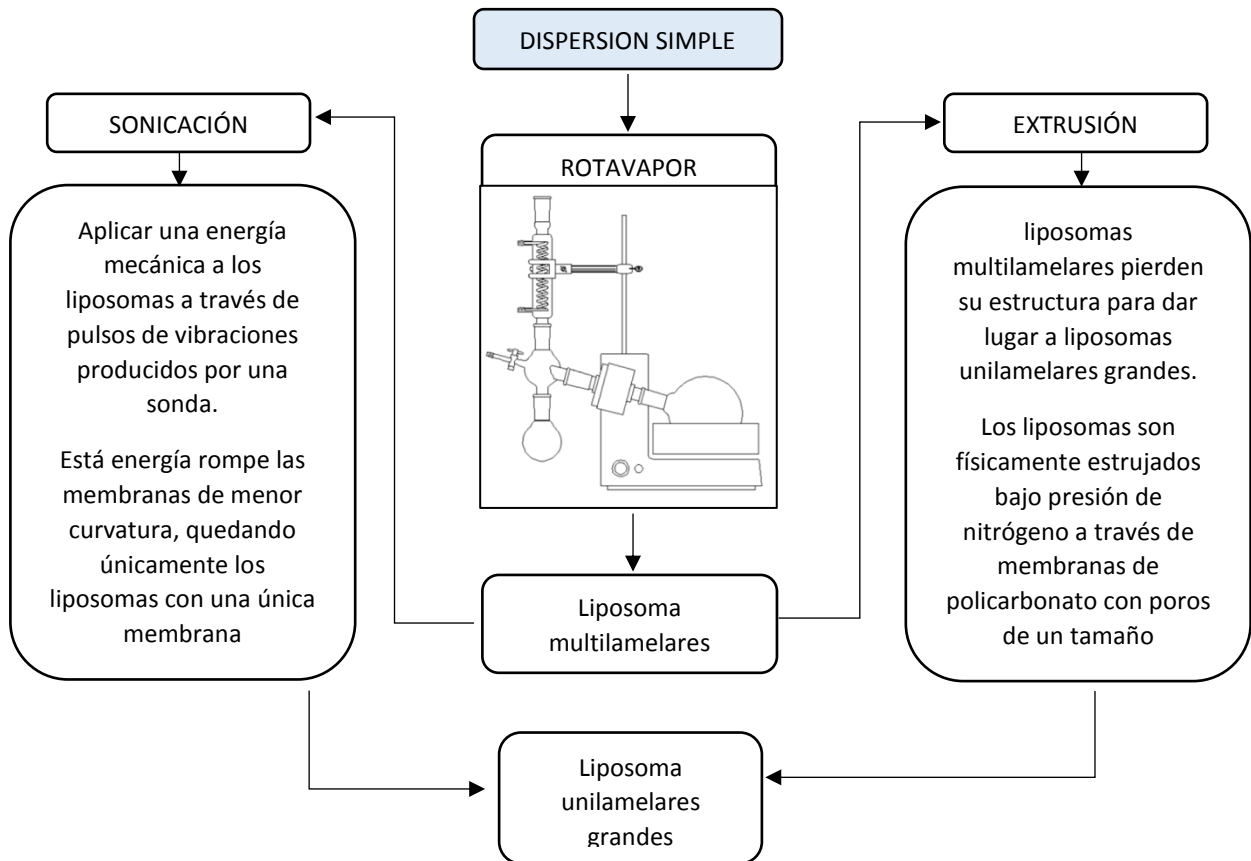
Se observó que el método de dispersión simple ha sido usado para bioencapsular antimicrobianos y probióticos y compuestos activos insolubles como podría ser la de extractos de algas, lo cual es adecuado para el problema planteado. En cuanto a los materiales usados para la biocápsula, el método de dispersión simple se basa en el uso

de fosfolípidos, que son los principales componentes de la membrana celular. Existe una alta variabilidad en la cantidad de bicapas y del tamaño del liposoma. Los liposomas multilaminares grandes o LMG, suelen ser estructuras con un tamaño mayor a 3000 nm y más de 5 capas de fosfolípidos en donde la cavidad acuosa se ve reducida. Los liposomas unilamelares pequeños o LUP, están conformadas por una simple bicapa cuyo diámetro está entre 25 – 50 nm dependiendo de la composición de lípidos encontrados en la membrana y las fuerzas iónicas del medio acuoso. Mientras que, los liposomas unilamelares grandes (LUG) se componen de una bicapa simple en donde la partícula alcanza diámetro entre 50 – 1000 nm (Fernández, 2007). Los LUG son los liposomas de mayor interés para almacenar mayor cantidad de compuestos activos, por tanto, el diseño del prototipo de una biocápsula se realizará con liposomas LUG.

3.3 Diseño del prototipo de una biocápsula

De acuerdo con el método de dispersión simple (*Bangham, 1965; Madni, 2014*) los fosfolípidos son disueltos en una disolución orgánica como etanol, metanol o cloroformo y depositados en una capa fina, en la pared del recipiente por evaporación del disolvente al vacío. Esta película se redispersará usando agua a conveniencia. Se agitará esta suspensión para asegurar que se desprenda por completo los fosfolípidos de las paredes del matraz, llevando a la formación de liposomas LMG (Yang, Matsumura, Kise, & Furusawa, 2000). Se debe mantener en todo momento a la suspensión a una temperatura superior a la temperatura de transición específica de cada lípido. Luego de esto es posible usar dos procesos distintos para obtener los LUG a partir de LMG: (i) sonicación y ii) extrusión (Figura 3.1). En la sonicación se aplica energía mecánica a los LMG mediante pulsos de vibraciones con una sonda o baño. La energía brindada romperá las membranas de menor curvatura, quedando los liposomas con una membrana y cierto diámetro que va a depender de la potencia y frecuencia de las vibraciones aplicadas. En la extrusión se estruja a las LMG bajo presión de nitrógeno a través de membranas de policarbonato con poros de un tamaño determinado. El poro usado dará el diámetro del LUG (Elisenda Casals, Galán, Escolar, Gallardo, & Estelrich, 2003).

Ilustración 3.1 Esquema general de obtención de liposomas unilamelares grandes (LUG) según el método de dispersión simple.



El proceso de obtención de liposomas multilamelares mediante el método de dispersión simple usando sonicación debería seguir el siguiente protocolo:

1. En un vaso de precipitación se mezcla colesterol, fosfatidilcolina de huevo y dimetildioctadecil amonio, cuya disolución se facilita con cloroformo y etanol en una proporción 12.8/6.4, respectivamente.
2. Se lleva la mezcla a un balón de vidrio para que sean expuestos por 40 minutos en el rotavapor al vacío a una temperatura de 40 °C y 60 rpm hasta llegar a la evaporación de los solventes.
3. Se utiliza N₂ para eliminar los solventes que no pudieron ser evaporados.

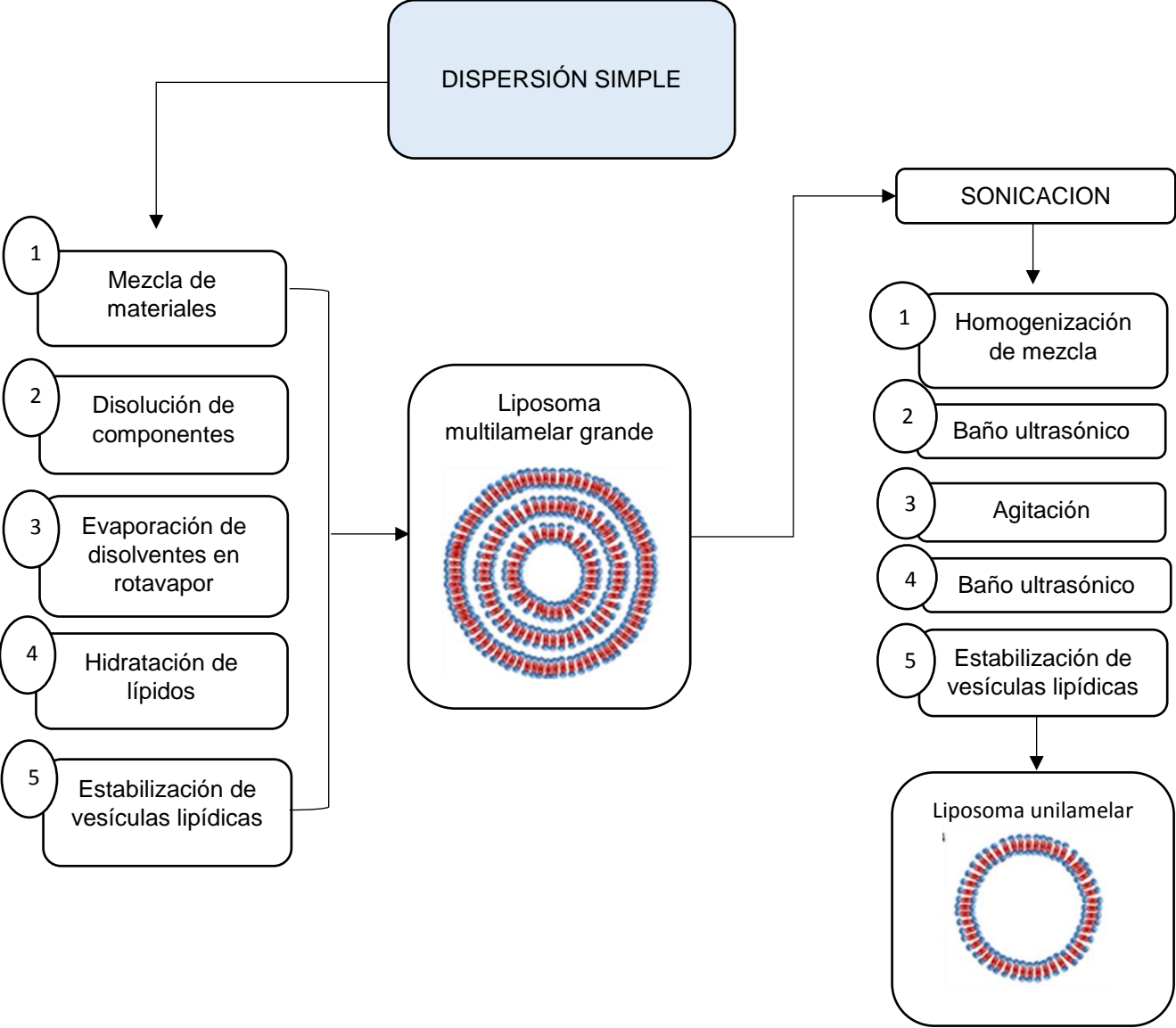
4. Los lípidos deben ser hidratados con ciprofloxacino acuoso durante 30 minutos a 60 °C y 60 rpm, añadiendo 1g de esfera de vidrio.
5. Finalmente se deja reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos para que las vesículas de lípidos se estabilicen.

Proceso de obtención de liposomas unilamelares mediante método de sonicación (de Jesús Valle, 2015) (Gala, 2015).

1. Usar las mismas sustancias del método anteriormente descrito, a excepción de los solventes orgánicos, ya que los fosfolípidos son directamente agregados a la solución de ciprofloxacino.
2. Se obtiene una dispersión homogénea que luego debe ser calentada a 60 °C para ser expuesta al ultrasonido que generará vibraciones a manera de pulsos.
3. Se agita y se vuelve a exponer al ultrasonido por 5 minutos para que esta energía mecánica rompa las bicapas y forme vesículas unilamelares.
4. Se deja reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos para que las vesículas de lípidos se estabilicen.

La estabilidad de los liposomas obtenidos en cualquiera de los métodos descritos es de una semana. Para esto, los liposomas deben ser almacenados en una disolución entre 4-8°C a pH neutro.

Ilustración 3.1. Diseño de un esquema de bioencapsulación para la obtención de liposomas unilamelares por el método de dispersión simple. Modificado de (Sánchez Carpintero, Sánchez Navarro, & De Jesús Valle, 2016)



Análisis de costos del método seleccionado

El costo aproximado para obtención de un batch de liposomas multilamelares grandes conteniendo compuestos bioactivos es de \$23262, de los cuales, \$21729 constituyen equipos con los que cuenta la ESPOL, mientras que los \$1533 restantes constituyen el material consumible (Tabla 3.4).

Tabla 3.3 Análisis aproximado de costos de construcción del método dispersión simple para la obtención de liposomas multilamelares grandes.

Proceso	Subproceso	Equipos		Consumibles	
		Detalle	Costo (\$)	Detalle	Costo (\$)
Dispersión Simple	Mezcla y disolución de materiales	Vaso de precipitado	\$ 48	Phosphatidylcholine from egg yolk (250 mg)	\$ 230
		Varilla de agitación	\$ 25	Dimethyldioctadecylammonium chloride (10 g)	\$ 100
		Agitador magnético	\$ 1108	Cholesterol, Highly Purified (5 g)	\$ 70
				Chloroform (500 mL)	\$ 87
				Ethyl alcohol, Pure (500 mL)	\$ 435
	Evaporación de disolventes	Balón de vidrio	\$ 90	Nitrógeno	\$ 318
		Rotavapor	\$ 12800		
		Cronómetro	\$ 45		
	Hidratación de lípidos	Vaso de precipitado	\$ 48	Ciprofloxacin	\$ 198
		Baño maría	\$ 1176	Glass spheres	\$ 96
	Estabilización de las vesículas lipídicas	Cámara incubación	\$ 6390		
Subtotales			\$ 21729		\$ 1533

Posteriormente, para la obtención de liposomas unilamelares se necesitaría \$3867,30 en equipos, con los que también cuenta la ESPOL y \$598 para materiales consumibles (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Análisis aproximado de costos de construcción del subproceso de sonicación para la obtención de liposomas unilamelares a partir de liposomas multilamelares grandes obtenidos con el método de dispersión simple.

Proceso	Subproceso	Equipos		Consumibles	
		Detalle	Costos (\$)	Detalle	Costos (\$)
Sonicación	Homogenización y baño ultrasónico	Plato de calentamiento Sonicador	714,30 153,00	Phosphatidylcholine from egg yolk (250 mg) Dimethyldioctadecylammonium chloride (10 g) Cholesterol, Highly Purified (5 g) Ciprofloxacin	\$ 230,10 \$ 100,00 \$ 70,00 \$ 198,00
	Agitación	Agitador magnético			
	Baño ultrasónico	Sonicador	3000,00		
	Estabilización de las vesículas lipídicas	Cámara de incubación	*		
Subtotales			\$3867,30		\$ 598,00

Por tanto, la preparación de un batch de liposomas unilamelares tendría un costo aproximado de \$2131, dado que ESPOL cuenta con el equipamiento necesario que se necesita para este método de microencapsulación (Tabla 3.6).

Tabla 3.4 Resumen de costos para la preparación de un batch de liposomas unilamelares a partir de liposomas ulilamelares grandes usando los métodos de microencapsulación de dispersión simple y subproceso de sonicación

Descripción	Subtotal		Total
	Dispersión Simple	Sonicación	
Equipos	\$ 21729	\$ 3867	\$ 25596
Consumibles	\$ 1533	\$ 598	\$ 2131
Total del proceso	\$ 23262	\$ 4465	\$ 27727
COSTO PARA CENAIM	\$ 1533	\$ 598	\$ 2131

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Aunque muchos de los compuestos bioactivos muestran resultados prometedores a nivel de laboratorio, no necesariamente se observará el mismo patrón al momento de administrar los compuestos bioactivos en la dieta de los animales. Por tal razón, es importante estandarizar métodos de microencapsulación a nivel experimental para que los compuestos bioactivos puedan ser probados en condiciones muy similares a la escala comercial, sin que se tenga que preparar grandes cantidades de material que si fueran necesarias para la prueba por parte de las compañías fabricantes de dietas de animales acuáticos. Además, la experimentación con los compuestos bioactivos en la dieta acortaría el proceso de comercialización de nuevos compuestos bioactivos,

El método de dispersión simple resultó ser el método más adecuado para solucionar el problema planteado ya que luego del análisis por criterios, este método destacó entre todos los procesos, logrando un ponderado total de 93.7/100 puntos superando por mucho a los demás métodos.

Los liposomas son micropartículas obtenidas por el método de dispersión simple. Estas partículas tienen una estructura similar a la célula, otorgándoles una de las características más deseables en lo que a encapsulación se refiere. La característica brinda al liposoma la particularidad de poder liberar los compuestos encapsulados de cuatro diferentes maneras ayudando así, a que los componentes almacenados dentro del liposoma puedan ser asimilados por el organismo eficientemente en más de una forma, lo cual brinda versatilidad e incrementa la absorción de dichos elementos por parte de las larvas de camarón. Por eso, la elección del método de dispersión simple seleccionado a partir del análisis de valoración aporta un valor agregado al producto final. Además, con el método de dispersión simple se obtiene biocápsulas con un tamaño y homogeneidad adecuados para usarlos en larvas de camarón.

La selección de los procesos de encapsulación están relacionadas con el tipo de compuesto bioactivo y características del microencapsulado, de esta manera la elección del mejor método no será igual en todos los casos y dependerá de variables como el tamaño, biocompatibilidad, degradación de los componentes externos de la capsula, las propiedades fisicoquímicas de los componentes, variabilidad del tamaño de la partícula, capacidad de contención de compuestos bioactivos, reproducibilidad y dificultad del método, mecanismo de liberación del núcleo activo y costo del proceso.

Todos los procesos identificados como secado por aspersion, gelificación iónica, polimerización interfacial y dispersión simple aportan con características distintas a cada micropartícula resultante, pero manteniendo en común la estructura del encapsulado, así como ciertas cualidades de interés.

La construcción de la micropartícula, por el método de dispersión simple, en el uso de materiales consumibles como fosfatodilcolina proveniente de la yema del huevo, disolventes orgánicos como etanol y cloroformo, nitrógeno gaseoso, fosfolípidos y catalizadores, además de los equipos esenciales como rotavapor, baño maría, agitadores. Luego del proceso principal, del cual se obtiene liposomas unilamelares grandes, se someten a las partículas resultantes a un segundo proceso denominado sonicación. Los materiales utilizados para el proceso de sonicación son en teoría los mismo utilizados en la dispersión simple, aunque los equipos requeridos varían, utilizándose sonicador, agitador magnético una cámara de incubación.

Una de las limitantes para la realización del proyecto se relaciona con el costo final del proceso, que a su vez implica una fuerte inversión inicial que podrá o no ser cubierta dependiendo del nivel económico del cliente. Afortunadamente, ESPOL cuenta con los equipos e instrumentación de laboratorios necesarios para que el método pueda ser ejecutado. Los reactivos consumibles no están a disposición de ESPOL, pero a comparación del costo de los equipos, estos reactivos son una inversión que puede ser cubierta fácilmente por un centro de investigación.

Recomendaciones

Una vez diseñado el prototipo se recomienda seguir los procesos identificados en este análisis y comenzar la preparación de un batch experimental de microencapsulados para probar el concepto. Esta prueba de concepto no necesariamente debería realizarse con compuestos bioactivos, pero si debiera incluir compuestos biológicamente parecidos a los que podrían ser bioactivos, por ejemplo, bacterias, o extractos de algas. La prueba del concepto facilitará la experimentación cuando se cuente con elementos realmente bioactivos contra enfermedades bacterianas.

BIBLIOGRAFÍA

5. BIBLIOGRAFÍA

- Alan Jones, D., Kumlu, M., Le Vay, L., & Fletcher. (1997). The digestive physiology of herbivorous, omnivorous and carnivorous crustacean larvae: a review. *ScienceDirect*, 11.
- Alday-Sanz, V., Brock, J., & W. Flegel, T. (2018). Facts, truths and myths about SPF shrimp in Aquaculture. 9.
- Calderón, J., & CENAIM. (2015). *EL ESTADO ACTUAL DE LA ACUICULTURA EN ECUADOR Y PERFILES DE NUTRICION Y ALIMENTACION*. Obtenido de FAO: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab487s/AB487S08.htm>
- Calero, J., Sánchez, F., Tórrez, R., Ena, H., & López, K. (2008). Elaboración y Caracterización de microcápsulas gastroresistentes de Diclofenac. 4.
- Carballo, R. Q. (2012). *INTEGRATED MULTI-TROPHIC AQUACULTURE*. Vilanova de Arousa : Jorge García.
- Chen, H.-Y. (2011). Nutritional Requirements of the Black Tiger Shrimp:. 18.
- Cueller, J., & Morales, V. (2008). *Guía técnica - patología e inmunología de camarones penaeidos*. Panama: CYTED.
- D, E. B. (2018 consulta). Interacción de ingredientes y procesos en la producción de alimentos hidroestables para camarones. *Omega Protein, Inc. USA* , 31.
- D. Saihi, I. Vroman, S. Giraud, & S. Bourbigot. (2006). Microencapsulation of ammonium phosphate. *ScienceDirect*, 8.
- Elisenda Casals, Galán, A. M., Escolar, G., Gallardo, M., & Estelrich, J. (2003). Physical stability of liposomes bearing hemostatic activity. *ScienceDirect*, 8.
- Fernández, J. D. (2007). *ESTABILIDAD COLOIDAL DE NANOESTRUCTURAS LIPOSÓMICAS*. Santiago de Compostela: DEPARTAMENTO DE FÍSICA APLICADA.
- Fillace Bautista, J. F., Vergara, R., & Suarez, A. (2016). Evaluación de una fórmula alimenticia para camarón de cultivo (*L. vannamei*) con inclusión de proteína vegetal a base de harina de soya. *AquaTIC*, 18.
- García Galano, T. (1998). Nutrición de larvas de camarón. 11.
- Gil, B. G. (2001). Las enfermedades en la camaronicultura. 33.

- González B.E., E., Ochoa Martínez L.A, & Rutiaga-Quiñones O.M. (2015). MICROENCAPSULACIÓN MEDIANTE SECADO POR ASPERSIÓN DECOMPUESTOS BIOACTIVOS. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 13.
- Jácome, H., Oleas, J., & Varela, M. (2011). Boletín mensual de análisis sectorial de MIPYMES - Procesamiento de camarón para exportación (R6 y R2). *Centro de Investigaciones Económicas y de la Micro, Pequeña y Mediana Empresa*, 39.
- Jalil Zorriehzahra, M., & Banaederakhshan, R. (2015). Early Mortality Syndrome (EMS) as new Emerging Threat in Shrimp Industry. 9.
- Jimenez-Solomon, M., Qilei Song, Jelfs, K., Munoz-Ibanez, M., & Livingston, A. (2016). Polymer nanofilms with enhanced microporosity. *nature materials*, 10.
- Kuban, F. D., Lawrence, A. L., & Wilkenfeld, J. S. (1985). SURVIVAL, METAMORPHOSIS AND GROWTH OF LARVAE FROM FOUR PENAEID SPECIES FED SIX FOOD COMBINATIONS. *Elsevier Science Publishers*, 12.
- Kurt, I. (2005). Alginates from Algae. *Scielo*.
- Lupo Pasin, B., González Azón, C., & Maestro Garriga, A. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 22.
- Lupo, B., Carmen González, C., & Maestro, A. (2012). Microencapsulation in alginate for food. Technologies and applications. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 22.
- Masoomi Dezfooli, S., Gutierrez-Maddox, N., Alfaro, A., & Seyfoddin, A. (2017). Encapsulation for delivering bioactives in aquaculture. 30.
- Medellin, J. M., Campos, N., Franco, A. H., & Jaime, J. (2009). Taxonomy of zoea larvae of crustacean decapods at the northeastern area, Colombian Caribbean Sea. *Scielo*, 19.
- Millamena, O.M, & Qunitio, E.T. . (1985). Lipids and essential fatty acids in the nutrition of *Penaeus monodon* larvae.
- Nava, E., Michelena, G., Iliná, A., & Martínez, J. L. (2015). Microencapsulation of bioactive compounds. *Investigacion y ciencia*, 8.
- ROMERO, E. N. (2016). MICROENCAPSULACIÓN DE QUERCETINA MEDIANTE GELIFICACIÓN IÓNICA. Riobamaba.

- Sánchez Carpintero, M. J., Sánchez Navarro, A., & De Jesús Valle, M. J. (2016). CARACTERIZACIÓN Y SEPARACIÓN DE LIPOSOMAS POR MICROENCAPSULACIÓN. *Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia*, 8.
- Shin-ichi , T., & Akio , K. (1984). Effects of Protein, Lipid, and Carbohydrate Levels in Purified Diets on Growth and Survival Rates of the Prawn Larvae. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 7.
- Shi-YenShiau. (1998). Nutrient requirements of penaeid shrimps. *ScienceDirect*, 16.
- Stern, S., & Sonnenholzner, S. (2009). History of semi-intensive shrimp farming in Ecuador. 26.
- Takahashi, M., & UECHI, S. (2009). Evaluation of an Oral Carrier System in Rats: Bioavailability and Antioxidant Properties of Liposome-Encapsulated Curcumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 6.
- Villa-García, M., San Martín-Martínez, E., & Pedroza-Islas, R. (2015). Liposomas como Nanotransportadores de Antioxidantes y Estudio de Tasa de Liberación. *OmniaScience*, 40.
- Villena, M., Hernández, Gallardo, V., & Martínez. (2009). Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *ARS Pharmaceutica*, 8.
- Yang, B., Matsumura, H., Kise, H., & Furusawa, K. (2000). Aggregation Behavior of Hexadecane Emulsions Induced by Egg Yolk PC Vesicles. *ACS Publications*, 5.

APÉNDICE

APÉNDICE A

Tabla 5.1 calificaciones de la descripción por criterios de selección para la mejor alternativa

Criterios	Descripción	Calificación
Tamaño máximo de la microcápsula (μm)	50 - 100	1
	20 - 50	2
	10 - 20	3
Variabilidad del tamaño de partícula	Alto	1
	Media	2
	Bajo	3
Capacidad de microcápsulas de contener compuestos bioactivos sin interferir en la bioactividad	Baja	1
	Media	2
	Alta	3
Mecanismo de liberación de los compuestos bioactivos	1	1
	2	2
	≥ 3	3
Reproducibilidad del método	Bajo	1
	Media	2
	Alto	3
Dificultad del método	Alto	1
	Media	2
	Bajo	3
Disponibilidad de equipos y materiales para la bioencapsulación (ESPOL)	No	0
	Si	3
Costo final del proceso de preparación de microcápsulas	Alto	1
	Media	2
	Bajo	3

AUSPICIO

Este trabajo fue auspiciado por la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT), en el marco de los proyectos de investigación PIC-14-CENAIM-003 “Desarrollo e implementación de métodos de control y prevención de enfermedades en especies acuáticas de uso comercial y uso potencial en maricultura y repoblación” e INEDITA "Biotecnología azul para el fortalecimiento de la industria acuícola ecuatoriana controlando Vibrios patógenos"