



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITÉCNICO NACIONAL
Unidad Saltillo**

“Estabilización de alicina mediante su encapsulación en mucílago de nopal”

Tesis que presenta:

Ing. Asdrid Sofía González Fajardo

Para obtener el Grado de
**Maestra en Ciencias en
Sustentabilidad de los Recursos Naturales y Energía**

Directores de Tesis:

Dra. María de Lourdes Virginia Díaz Jiménez

Dr. Salvador Carlos Hernández

Ramos Arizpe, Coahuila

Julio, 2022

Índice de contenido

Glosario	1
Resumen	2
Abstract	3
1. Introducción	4
2. Antecedentes	5
2.1 Nutraceúticos.....	5
2.2 El ajo (<i>Allium sativum</i>).....	7
2.2.1 Alicina de ajo: un nutraceútico con potencial terapéutico	8
2.2.2 Propiedades terapéuticas de la alicina	10
2.3 Estrategias para la estabilización de alicina	13
2.4 Microencapsulación de compuestos bioactivos/nutraceúticos	16
2.4.1 Técnicas de microencapsulación	17
2.4.2 Gelificación-precipitación como método de encapsulación de alicina	22
2.5 Biopolímeros como agentes encapsulantes	23
2.5.1 Mucílago de nopal	24
2.5.2 Alginatos	27
3. Justificación.....	31
4. Objetivos	32
4.1 Objetivo general	32
4.2 Objetivos específicos.....	32
5. Metodología	33
5.1 Extracción del Mucílago de Nopal.....	33
5.1.1 Pruebas preliminares	34
5.1.2 Metodología seleccionada para la extracción de mucílago de nopal. Pruebas definitivas	36

5.1.3 Caracterización del mucílago de nopal por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	37
5.2 Extracción y encapsulación de alicina. Pruebas preliminares	37
5.3 Diseño de experimentos	38
5.4 Obtención de alicina.....	39
5.4.1 Metodología experimental.....	40
5.4.2 Análisis de alicina en el extracto de ajo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	40
5.5 Encapsulación de alicina por gelificación-precipitación.....	42
5.5.1 Metodología experimental.....	43
5.5.2 Análisis de alicina en los encapsulados frescos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	44
5.5.3 Análisis de alicina presente en la solución iónica por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	44
5.6 Caracterización Físicoquímica de los encapsulados secos.....	45
5.6.1 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	45
5.6.2 Análisis térmico gravimétrico (ATG)	45
5.6.3 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	46
5.6.4 Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	46
6. Resultados y discusión	46
6.1 Extracción de mucílago de nopal	46
6.1.1 Pruebas preliminares	46
6.1.2 Selección del método de extracción de mucílago de nopal. Pruebas definitivas	50
6.1.3 Caracterización del mucílago de nopal por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	52
6.2 Extracción y encapsulación de alicina. Pruebas preliminares.....	53

6.3 Análisis de alicina en los extractos de ajo por HPLC	55
6.4 Análisis de alicina en los encapsulados frescos por HPLC.....	57
6.5 Estudio de la estabilidad de alicina en los encapsulados por HPLC	62
6.6 Caracterización fisicoquímica de los encapsulados secos.....	69
6.6.1 Análisis térmico gravimétrico (ATG)	69
6.6.2 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	71
6.6.3 Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	73
7. Conclusiones	77
8. Referencias	78
9. Anexos.....	92

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Allium sativum</i> (ajo) [11].	7
Figura 2. Síntesis de alicina en el ajo por transformación de aliina catalizada por alinasa [29].	9
Figura 3. Tipos de micropartículas: a) Cápsula, b) Esfera [64].	17
Figura 4. Principales técnicas de microencapsulación.	18
Figura 5. Técnica de gelificación – precipitación [78].	23
Figura 6. <i>Opuntia ficus-indica</i> (nopal) [83].	24
Figura 7. Alga marrón <i>Macrocystis pyrifera</i> [99].	27
Figura 8. Estructura del alginato. Bloques de ácido β -D-manurónico (M) y α -L-gulurónico (G) [100].	28
Figura 9. Representación esquemática de la metodología experimental y sus etapas.	33
Figura 10. Sistema de extrusión.	43
Figura 11. Resultados de la extracción con el método A. Ensayo 1.	47
Figura 12. Resultados de la extracción con el método A. Ensayo 2: a) Mucílago precipitado, b) Mucílago previo al secado, c) Mucílago seco.	47
Figura 13. Resultados de la extracción con el método B. a) Material en suspensión, b) Material previo al secado.	48
Figura 14. Resultados de la extracción con el método C. a) Material en suspensión, b) Material previo al secado, c) Material posterior al secado.	48
Figura 15. Resultados de la extracción con el método D. a) Solución acuosa de mucílago luego del calentamiento, b) Material caramelizado.	49
Figura 16. Resultados de la extracción con el método E. a) Solución acuosa de mucílago luego del calentamiento, b) Material caramelizado.	50
Figura 17. Resultados de la extracción del método definitivo. a) Mucílago precipitado, b) Mucílago previo al secado, c) Mucílago seco, d) Mucílago en polvo.	51
Figura 18. Espectro FTIR del mucílago de nopal en polvo	53
Figura 19. Resultados de las pruebas preliminares. Grupo a.	54
Figura 20. Resultados de las pruebas preliminares. Grupo b.	55
Figura 21. Resultados de las pruebas preliminares. Grupo c.	55
Figura 22. Cromatogramas de los extractos de ajo de los tratamientos. a) Alicina, b) etilparabeno.	56

Figura 23. Encapsulados frescos de extracto de ajo.....	57
Figura 24. Cromatogramas de los encapsulados frescos. a) Alicina, b) etilparabeno.....	58
Figura 25. Cromatogramas de la solución iónica de los tratamientos. a) Alicina, b) etilparabeno.	60
Figura 26. Cromatogramas de los encapsulados secos. Primer análisis.	63
Figura 27. Cromatogramas de los encapsulados secos. Réplicas. Primer análisis. a) Alicina, b) etilparabeno.....	65
Figura 28. Cromatogramas de los encapsulados secos. Segundo análisis. a) Alicina, b) etilparabeno.....	67
Figura 29. Estabilidad de la alicina en el tiempo. Encapsulados de los encapsulados T1 y T3. .	68
Figura 30. Cromatogramas de los encapsulados secos. Réplicas. Segundo análisis. a) Alicina, b) etilparabeno.....	69
Figura 31. Espectros ATG de los encapsulados secos y el alginato.	71
Figura 32. Espectros FTIR de los encapsulados de los tratamientos: T1, T2, T3, T4, MN(mucílago) y AS (alginato).....	72
Figura 33. Espectros FTIR de los encapsulados de los tratamientos:T5, T6, T7, T8, MN(mucílago) y AS (alginato).....	73
Figura 34. Micrografías de los encapsulados secos.	74
Figura 35. Micrografías de esferas de alginato-mucílago y sus correspondientes superficies. a) E1:(80 % AS/20 % MN, 4 mm), b) E2:(90 % AS/10 % MN, 4 mm).....	75
Figura 36. Espectro EDS de los encapsulados del tratamiento T1.....	76

Índice de tablas

<i>Tabla 1. Fitoquímicos con propiedades nutraceuticas.</i>	6
<i>Tabla 2. Condiciones evaluadas en las pruebas preliminares para la encapsulación de alicina.</i>	37
<i>Tabla 3. Factores y niveles correspondientes al diseño de experimentos.</i>	38
<i>Tabla 4. Matriz del diseño de experimentos.</i>	39
<i>Tabla 5. Análisis por HPLC realizados a los encapsulados secos.</i>	45
<i>Tabla 6. Métodos de extracción de mucílago evaluados.</i>	50
<i>Tabla 7. Condiciones evaluadas en las pruebas preliminares para la encapsulación de alicina. Grupos a, b y c.</i>	53
<i>Tabla 8. Porcentaje de alicina presente en los extractos de ajo.</i>	57
<i>Tabla 9. Porcentaje de alicina presente en los encapsulados frescos.</i>	59
<i>Tabla 10. Porcentaje de alicina presente en la solución iónica.</i>	61
<i>Tabla 11. Porcentaje de alicina en los encapsulados secos. Primer análisis.</i>	64
<i>Tabla 12. Porcentaje de alicina en las réplicas de encapsulados secos. Primer análisis.</i>	66
<i>Tabla 13. Porcentaje de alicina en los encapsulados secos. Segundo análisis.</i>	68

Glosario

Antiproliferativo: perteneciente o relativo a una sustancia utilizada para prevenir o retardar la propagación de células, especialmente células malignas, en los tejidos circundantes.

Bioactivo: constituyentes extra-nutritivos encontrados en pequeñas cantidades en los alimentos y que proporcionan beneficios para la salud más allá del valor nutricional básico del producto.

Bioactividad: es el efecto específico de la exposición a una sustancia; incluye la captación tisular y la consiguiente respuesta fisiológica (por ejemplo: antioxidante, antiinflamatoria).

Biodisponibilidad: expresa la fracción de nutriente o metabolito activo ingerido que llega a la circulación sistémica y finalmente queda disponible para funciones fisiológicas.

Caspasas: enzimas que intervienen en el proceso de apoptosis (muerte celular programada).

Factor de transcripción: en biología molecular y genética, es una proteína que se une a secuencias específicas de ADN, controlando así la transcripción de la información genética de ADN a ARN mensajero.

Fibrinolítico: que impide que los coágulos sanguíneos crezcan y causen problemas.

Glutación (GSH): tripéptido proteínico constituido por tres aminoácidos (glutamato, cisteína y glicina); se trata del principal antioxidante de las células, es ubicuo y ayuda a protegerlas de las especies reactivas del oxígeno, como los radicales libres y los peróxidos.

Hipolipemiente: sustancia farmacológicamente activa que disminuye el nivel de lípidos en sangre.

Patología: conjunto de síntomas de una enfermedad.

Terapéutico: relacionado al tratamiento de dolencias y afecciones con la finalidad de lograr la curación o minimizar los síntomas. Relativo al tratamiento médico de las enfermedades.

Vía de desintoxicación celular Fase II: fase de desintoxicación en la que las células del hígado agregan una sustancia (por ejemplo, cisteína, glicina o una molécula de azufre) a un producto químico o un medicamento tóxico para hacerlo menos nocivo.

Nrf2: nuevo factor de transcripción que responde al estrés oxidativo, promueve la resolución de la inflamación y facilita la reparación tisular.

Resumen

A partir del siglo XX el consumo de productos nutraceuticos, definidos como sustancias bioactivas de los alimentos que poseen beneficios terapeuticos, incremento a nivel global. Tal es el caso de la alicina, el principal compuesto del ajo y, a la cual se han atribuido las propiedades bioactivas que este brinda. La alicina ha sido caracterizada como un compuesto volátil, y altamente inestable, lo cual ha limitado su biodisponibilidad y por lo tanto, ha dificultado el aprovechamiento de sus propiedades benéficas. Por esta razón, el interés por estabilizar a este metabolito continúa.

En el presente trabajo de investigación se obtuvieron encapsulados de extracto de ajo aplicando la técnica de gelificación-precipitación y empleando mezclas de alginato de sodio (AS) – mucílago de nopal (MN) como encapsulante, para posteriormente evaluar la estabilidad de la alicina en los encapsulados a través del tiempo.

Se aplicó un diseño factorial de dos niveles para definir las condiciones óptimas de encapsulación a las que se obtendría la mayor cantidad de alicina estable. Los factores fueron la composición del extracto de ajo (50 g ajo/50 ml agua y 70 g ajo/50 ml agua), la formulación del encapsulante (80 % AS|20 % MN y 90 % AS|10 % MN) y el diámetro de extrusión (4 y 3 mm).

Inicialmente los extractos de ajo y las microesferas frescas fueron analizados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para cuantificar la alicina presente. Posteriormente, el porcentaje de alicina contenido en los encapsulados secos fue monitoreado por HPLC. Los encapsulados secos también fueron caracterizados mediante análisis térmico gravimétrico (ATG), espectroscopía infrarroja (FTIR) y microscopía electrónica de barrido con espectroscopía de dispersión de luz (MEB-EDS). Los encapsulados que mantuvieron la mayor cantidad de alicina después de 43 días de almacenamiento fueron los del tratamiento T1(50 g ajo/50 ml agua, 80 % AS|20 % MN, 4 mm), los cuales conservaron estable alrededor del 75 % de la alicina que había sido encapsulada inicialmente. Las pérdidas por almacenamiento que experimentaron estos encapsulados fueron pequeñas, lo cual confirmó que la mezcla de alginato-mucílago utilizada en este trabajo tiene potencial encapsulante para mantener a la alicina estable.

Abstract

Since the 20th century the use of nutraceutical products, defined as bioactive substances in foods with therapeutic benefits, has increased globally. This is the case of allicin, the main compound of garlic and, to which the bioactive properties that it possesses have been attributed. Allicin has been characterized as a volatile and highly unstable compound, which has limited its bioavailability and therefore, has made it difficult to take advantage of its beneficial properties. For this reason, the interest in stabilizing this metabolite continues.

In the present research work, garlic extract microspheres were obtained by applying the gelation-precipitation technique and using mixtures of sodium alginate (AS) - nopal mucilage (MN) as wall material, to subsequently evaluate the stability of allicin in the beads over time.

A two-level factorial design was applied to define the optimal encapsulation conditions at which the highest amount of stable allicin would be obtained. The factors were: the garlic extract composition (50 g garlic/50 ml water and 70 g garlic/50 ml water), the wall material formulation (80% AS|20% MN and 90% AS|10% MN) and the extrusion diameter (4 and 3 mm).

Initially, garlic extracts, and fresh microspheres were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) to quantify the presence of allicin. Subsequently, the percentage of allicin contained in the dried beads was monitored by HPLC. The dry beads were also characterized by thermal gravimetric analysis (TGA), infrared spectroscopy (FTIR) and scanning electron microscopy with energy dispersive spectroscopy. (SEM-EDS). Microspheres that maintained the highest amount of allicin after 43 days of storage were the ones from treatment T1(50 g garlic/50 ml water, 80% AS|20%MN, 4 mm), which kept stable around 75% of the allicin that had been initially encapsulated. Storage losses experienced by these microspheres were small, confirming that the alginate-mucilage mixture used in this work has encapsulating potential to keep allicin stable.

1. Introducción

Desde inicios del siglo XXI el uso de nutraceuticos se ha popularizado debido a los posibles efectos nutricionales, terapeuticos y de proteccion que estos proporcionan. Su aplicacion data desde las antiguas civilizaciones humanas [1] y en la actualidad cerca del 80% de la poblacion mundial acude a este tipo de medicina tradicional. El termino nutraceutico, acuñado por DeFelice en 1989, hace alusion a sustancias naturales bioactivas presentes en los alimentos que, además de su valor nutricional, en dosis adecuadas brindan beneficios para la salud [2].

Una fuente de nutraceuticos que ha sido empleado desde la antigüedad es el ajo [3], el cual se ha aplicado para prevenir y tratar diferentes enfermedades [4]. Los responsables de la accion terapeutica del ajo son sus componentes azufrados, especialmente la alicina, conocida como “el corazón del ajo”.

La alicina es uno de los principales compuestos organosulfurados característico del ajo blanco (*Allium sativum*) y de otras especies *Allium* [5]; a este compuesto se atribuyen las propiedades bioactivas de la especie. La alicina no está presente en el bulbo de ajo intacto, se obtiene únicamente cuando se produce daño físico a los dientes de ajo; es decir, cuando se les corta o machaca, por lo que su obtención no supone un procedimiento complejo [6].

No obstante, la alicina se caracteriza por ser volátil y altamente inestable (reactiva). Se descompone fácilmente en otros derivados azufrados [7], lo cual limita su biodisponibilidad y por lo tanto, dificulta el aprovechamiento de sus propiedades benéficas. Es por esta razón que existe interés en la estabilización de este metabolito.

La encapsulación es una de las técnicas de estabilización de compuestos bioactivos más utilizadas durante los últimos años [8]. Particularmente, la microencapsulación con la técnica de secado por aspersión ha destacado por su alta eficiencia y versatilidad. Sin embargo, se ha incursionado escasamente en otras técnicas para encapsular, por ejemplo, en la encapsulación por gelificación. Tomando esto como premisa, en el presente trabajo se buscó estabilizar alicina mediante su encapsulación en un biopolímero de fácil acceso y bajo costo en México: el mucílago de nopal, para lo cual se aplicó la técnica de gelificación y precipitación.

2. Antecedentes

2.1 Nutraceuticos

Los alimentos son vitales para los seres humanos, ya que proporcionan los nutrientes necesarios para la nutrición y el correcto funcionamiento del cuerpo. Cuando las dietas son bajas en nutrientes y altas en grasas y calorías, como las adoptadas con el estilo de vida actual, la aparición de enfermedades crónicas, obesidad y ciertos tipos de cáncer incrementa; patologías que además implican tratamientos costosos [9]. El vínculo entre nutrición y salud es evidente. Civilizaciones como los egipcios, griegos, chinos y sumerios relacionaban la ingesta de ciertos alimentos con efectos benéficos a la salud. Incluso Hipócrates (460 – 370 a. C.), el padre de la medicina, declaró: “Deja que la comida sea tu medicina, y la medicina sea tu comida” [10]. Tal idea milenaria fue modernizada con los denominados nutraceuticos, los cuales cumplen con ambos propósitos: alimentación y medicina, y además podrían ser una alternativa menos costosa que los tratamientos convencionales.

A partir de las palabras nutrición y farmacéutico, el término “nutraceutico” fue descrito por primera vez en 1989 por el Dr. Stephen L. DeFelice; quien asoció estas palabras a sustancias naturales bioactivas presentes en los alimentos que, además de su valor nutricional, al consumirse en dosis adecuadas brindan beneficios para la salud humana (incluida la prevención y/o el tratamiento de enfermedades) [2]. Se caracterizan porque emplean una matriz no alimentaria para proporcionar una forma concentrada de los agentes bioactivos contenidos en los alimentos. A nivel comercial se presentan en forma de pastillas, cápsulas, polvos, etc. [10]. Al ser aislados de alimentos, se espera que presenten menos toxicidad y menos efectos secundarios que los fármacos utilizados para tratar síntomas similares [11]. Una vez extraídos, los nutraceuticos deben conservar sus propiedades originales y no deben experimentar ningún tipo de manipulación química que les altere [12].

En especial, los nutraceuticos basados en fitoquímicos han recibido atención considerable; esto se debe a que la disponibilidad y el costo relativamente más económico de las fuentes vegetales las hacen más atractivas como agentes terapéuticos. Los fitoquímicos son metabolitos secundarios de las plantas, presentes en partes como raíces, tallos, flores, frutos y semillas; además de brindarles características organolépticas, estas sustancias les protegen de enfermedades y daños externos. Así, la ingesta de fitoquímicos da al organismo consumidor una protección similar [13]. Su actividad a

nivel sistémico se debe principalmente a las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antiproliferativas, antimicrobianas, entre otras [14]. Se estima que existen cerca de 4000 fitoquímicos, aunque solo unos cuantos han sido debidamente documentados. Dentro de los fitoquímicos con efectos positivos en la salud se encuentran: antocianinas, carotenoides, flavonoides, isotiocianatos, polifenoles, organosulfurados, entre otros [15]. Algunos de los más estudiados por sus propiedades terapéuticas y los alimentos de los que se obtienen se presentan en la Tabla 1 [13,16].

Tabla 1. *Fitoquímicos con propiedades nutracéuticas.*

Fitoquímicos	Matriz alimenticia	Beneficios fisiológicos
Antocianinas	Vegetales y frutas de color morado, azul o rojo: cereza, berenjena, uva, mora, etc.	Antioxidante, antialérgico, antiinflamatorio
Quercetina	Cebolla, cilantro, manzana, cereza, uva y té (verde y negro).	Antioxidante, vasodilatador, anticoagulante, nefroprotector
Carotenoides (α , β , γ , δ , licopeno)	Vegetales de hoja verde, frutas y vegetales amarillos, naranjas o rojos: lechuga, naranja, zanahoria, camote, tomate, etc.	Antioxidante, antimicrobiano, anticancerígeno, actividad provitamina A.
Resveratrol	Uva, arándano, frambuesa, mora, cacahuates.	Antioxidante, antidiabético, anticancerígeno.
Organosulfurados (sulfuros de alilo, tiosulfatos)	Vegetales del género <i>Allium</i> : cebolla, puerro, chalote, cebollino, ajo	Antioxidante, antiinflamatorio, antimicrobiano, antifúngico, hipolipemiante.

Particularmente, el ajo en sus diferentes variedades es una de las matrices alimentarias con un historial de más de 4000 años de uso en el tratamiento de diferentes condiciones patológicas. Muchos de los beneficios para la salud que se asocian a su consumo se han atribuido a sus característicos compuestos de organoazufre; los cuales continúan siendo motivo de investigación para evaluar y confirmar su potencial terapéutico.

2.2 El ajo (*Allium sativum*)

El ajo, *Allium sativum*, se encuentra dentro de los 20 vegetales más importantes a nivel mundial y es reconocido por su potencial nutracéutico. Desde tiempos muy antiguos esta planta herbácea ha sido utilizada por diversas culturas, tanto en el área culinaria como en la medicina tradicional. Es una especie del género *Allium*, posee una característica forma de bulbo (Figura 1) y pertenece a la familia *Liliaceae*. El bulbo está envuelto por las túnicas exteriores y se compone de varios bulbillos, coloquialmente llamados dientes, los cuales son envueltos por túnicas interiores (de color blanco o rojizo) y están insertados sobre un eje aplanado [11]. El número de dientes depende de la variedad de ajo, llegando a encontrarse desde 6 hasta 35 dientes por bulbo [17].



Figura 1. *Allium sativum* (ajo) [11].

El bulbo de ajo contiene agua (65 %), carbohidratos (28 %), compuestos organosulfurados (2.3 %), proteínas (2 %), aminoácidos (1.2 %) y fibra (1.5 %). Además, es considerado rico en compuestos fenólicos, flavonoides, óxidos de nitrógeno, vitaminas, terpenos, enzimas, saponinas, amidas y ciertos minerales como: fósforo, calcio, hierro e incluso selenio y germanio [18,19]. Un diente de ajo promedio pesa de 3-6 g y contiene aproximadamente 1 g de carbohidratos, 0.2 g de proteínas, 0.05 g de fibra, 0.01 g de grasas y vitaminas A, B1, B2, B3 y C. Algunos factores que inciden en la composición química y en los compuestos bioactivos presentes en el ajo son [20]: condiciones precosecha (genotipo), condiciones de crecimiento (fertilización, riego), condiciones ambientales (luz, temperatura), condiciones postcosecha y condiciones de almacenamiento.

Según el Codex Ebers egipcio o Papiro Ebers, el uso medicinal del ajo data del siglo XVI a. de C. [12] en afectaciones como cólicos, fiebre, tos y en el tratamiento de diferentes enfermedades como trastornos intestinales, infecciones bacterianas, enfermedades de la piel, heridas y algunas formas de cáncer, entre otros [4]. Los beneficios de esta matriz vegetal se atribuyen a los numerosos

compuestos bioactivos que contiene, en su mayoría compuestos azufrados (alrededor de 33), siendo el ajo el alimento con la mayor cantidad de estos últimos [21]. Dentro de estos compuestos sulfurados se encuentra la alicina, un metabolito secundario que protege al ajo de herbívoros y parásitos (como hongos y bacterias), además de ser un biocida con un amplio espectro de actividad frente a una extensa gama de microorganismos, células animales y humanas [22]. Por lo anterior, a la alicina se adjudica el protagonismo de diferentes efectos terapéuticos del ajo en el cuerpo humano, desde su actividad antimicrobiana hasta su acción antioxidante, anticancerígena, antihipertensiva, antifúngica, antitumorogénica, inmunomoduladora, etc. [23,24].

2.2.1 Alicina de ajo: un nutraceutico con potencial terapéutico

La alicina, tiosulfinato de alil 2-propeno o tiosulfinato de dialilo, cuya fórmula química condensada es $C_6H_{10}OS_2$, fue aislada y descrita por Cavallito y Bailey en 1944 [25]. Es uno de los principales compuestos organosulfurados bioactivos sintetizados a partir de especies *Allium* y es el responsable de su típico olor y sabor picante [26]. Con un peso de 162.28 g/mol, la molécula de alicina presenta baja solubilidad en agua; en el ajo recién cortado, triturado o aplastado constituye el tiosulfinato más abundante, con aproximadamente 70-80 % en peso del total de estos. De un diente de ajo pueden obtenerse aproximadamente 4-5 mg de alicina [5].

La alicina no se encuentra presente en el ajo intacto sino que se produce naturalmente por la transformación enzimática del aminoácido no proteico aliina (Sulfóxido de S-alil-L-cisteína) bajo la influencia de la enzima alinasa [27]. En el diente de ajo, la alinasa se almacena en las vacuolas de la célula, mientras que la aliina reside en el citoplasma; es únicamente al producir daño físico al tejido vegetal que sus células se rompen y ambos compuestos entran en contacto para producir alicina [28]. Lo anterior le confiere la denominación de “fitoanticipina” ya que se produce tras un ataque externo, sin gasto extra de energía celular y a partir de un sustrato preformado.

La síntesis de alicina ocurre en dos pasos (Figura 2): primero, la alinasa hidroliza a la aliina para producir ácido alilsulfénico y dehidroalanina. Seguidamente, dos moléculas de ácido alilsulfénico se condensan espontáneamente, con la eliminación de agua, para finalmente producir una molécula de alicina, la cual confiere las propiedades organolépticas y bioactivas al ajo [29]. La síntesis puede completarse entre 12-30 segundos a temperatura ambiente.

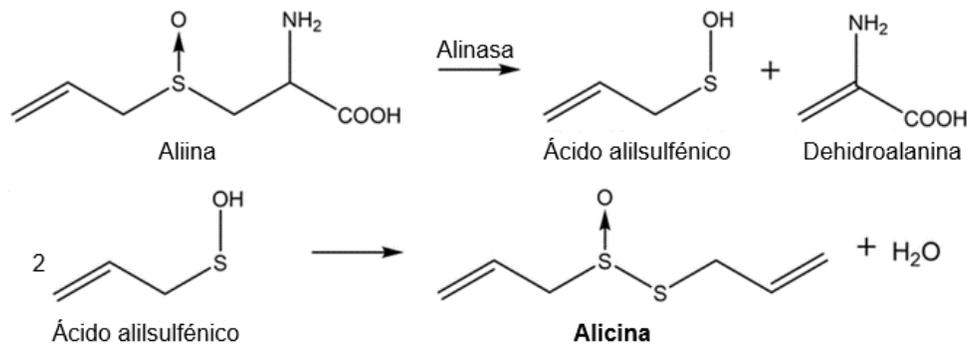


Figura 2. Síntesis de alicina en el ajo por transformación de aliina catalizada por alinasa [29].

La obtención natural de este compuesto organosulfurado no supone un proceso de gran complejidad. No obstante, la alicina es una molécula con vida muy corta; se caracteriza por ser muy volátil, altamente reactiva y con baja estabilidad térmica (inicia una rápida descomposición a 37 °C), lo que dificulta producir formulaciones que realmente la contengan [7]. El tiosulfinato de dialilo ha sido definido como una especie reactiva de azufre (RSS, por las siglas en inglés de Reactive Sulfure Species) ya que su centro de azufre electrofílico, creado por el efecto de captación de electrones del átomo de oxígeno, le hace tener alta reactividad con los grupos tiol de las células (-SH del glutatión o de los residuos de cisteína de las proteínas) y oxidarlos [26].

Una vez formada, la alicina sufre transformaciones no enzimáticas y se descompone fácilmente, en presencia de aire y agua, dando lugar a otros compuestos organosulfurados como: sulfuro de dialilo (DAS), disulfuro de dialilo (DADS), trisulfuro de dialilo (DATS), ajoenos, vinilditiinas, entre otros [30]. Debido a la termolabilidad de la molécula, temperaturas elevadas aplicadas en procesos de pasteurización, cocción, secado, esterilización u otros, también favorecen su degradación y rápida transformación en los compuestos de azufre mencionados previamente, anulando su biodisponibilidad y en consecuencia sus propiedades terapéuticas.

La vida media de la alicina varía en dependencia de la concentración, pH, el solvente de extracción empleado y las condiciones de almacenamiento (temperatura, luz, etc.) [31]. En el ajo triturado o machacado, la vida media de la molécula es de aproximadamente 2.5 días, a temperatura ambiente. En disolventes con un alto grado de enlace de hidrógeno y a temperaturas bajas la alicina presenta mayor estabilidad [4]. En extractos acuosos con pH entre 5-6, a 25 °C y a concentraciones altas de alicina en solución, esta ha presentado una vida media entre 10-17 días. En soluciones con menor

concentración de alicina, pH inferior a 1.5 o superior a 11 y con temperaturas por encima de 40 °C la estabilidad de este compuesto azufrado se ve seriamente afectada y disminuye a 5 días. El proceso de degradación se acelera drásticamente a temperaturas de 70 °C o superiores, llegando a presentarse vidas medias del tiosulfonato cercanas a las 9 h. Por otro lado, la alicina presenta baja fotosensibilidad; en extractos acuosos su estabilidad se reduce en un grado muy bajo [32].

La reactividad de la alicina frente a condiciones externas hace que la estabilización química de este nutraceutico sea un gran reto, ya que su presencia como ingrediente activo en un producto final es imprescindible para obtener los beneficios de sus propiedades terapéuticas.

2.2.2 Propiedades terapéuticas de la alicina

La alicina es una molécula fisiológicamente activa con beneficios potenciales para la salud. Sus propiedades terapéuticas documentadas son diversas: actividad antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, anticancerígena, antihipertensiva, antitumorogénica, inmunomoduladora, etc. [13, 14]. A continuación, se describen algunas de las propiedades más estudiadas:

Actividad antimicrobiana

La alicina es casi exclusivamente responsable de la actividad antimicrobiana del ajo. Tiene esta actividad incluso en concentraciones de microgramos; se ha reportado que a partir de aproximadamente 3 g de ajo pueden producirse hasta 5 mg de alicina, lo que evidencia el potencial antibiótico contenido en un bulbo de ajo [33]. Esto se adjudica, químicamente hablando, al grupo tiosulfonato y a su reactividad con los grupos tiol de proteínas (incluidas diversas enzimas). El efecto aceptor de electrones del átomo de oxígeno crea un centro de azufre electrófilo que reacciona fácilmente con los tioles, oxidando o inhibiendo a muchas enzimas con grupos tiol catalíticamente importantes [29].

A nivel celular, la alicina se difunde con facilidad a través de las membranas celulares debido a su naturaleza hidrofóbica, lo cual le permite ingresar a las células; también logra penetrar tanto la pared como la membrana celular de bacterias y así atacar objetivos que producen la inactividad o la muerte celular [34]. Diversos estudios han documentado la eficacia antimicrobiana de la alicina en bacterias responsables de enfermedades del tracto intestinal. Este tiosulfonato inhibe el crecimiento de *Escherichia coli* [35] y ha sido usado como un potente agente antimicrobiano contra *Helicobacter pylori* [36].

A su vez, la alicina es activa contra una amplia gama de microorganismos como las bacterias Gram positivas y Gram negativas, demostrando el mismo nivel de actividad inhibitoria que antibióticos como la estreptomycin. También es un fuerte biocida contra patógenos resistentes a ciertos antibióticos como el *Staphylococcus aureus*, resistente a la metilina [26]. Al ser utilizada en fase gaseosa, la alicina inhibe el crecimiento de bacterias, por lo cual ciertos estudios la proponen como un activo de inhalación directa para combatir infecciones pulmonares bacterianas. Además, se ha reportado que es efectiva contra la periodontitis y patógenos de las caries [37]; incluso, se ha demostrado su acción antiproliferativa contra la leishmaniasis visceral [5].

La efectividad antimicrobiana del tiosulfato de dialilo ha sido comparada con la de antibióticos convencionales como la penicilina, aunque se le considera menos efectiva; esto se debe a que la alicina es muy reactiva con cada residuo de cisteína (siempre que el grupo -SH se encuentre disponible libremente) a diferencia de la penicilina, la cual guarda mayor especificidad de reacción y no se desvía en cualquier objetivo [26]. Se ha reportado que concentraciones de alicina entre 0.5-1 mg/ml podrían usarse como agente antimicrobiano [5].

Actividad antifúngica

La alicina muestra efectos tóxicos e inhibitorios hacia una amplia variedad de especies fúngicas, como *Candida albicans* y *Aspergillus niger*, siendo una alternativa de tratamiento en terapia medicinal. Debido a su volatilidad, la alicina ha demostrado su efectividad en el tratamiento de aspergilosis pulmonar al ser administrada por inhalación directa. Además, dada su facilidad de aplicación a nivel tópico se ha usado para tratar infecciones fúngicas en la piel como la candidiasis [28], llegando incluso a comparar su actividad con la de antimicóticos convencionales como el fluconazol.

Actividad antioxidante

Químicamente, la alicina es un oxidante, pero en dosis bajas reacciona con enzimas poseedoras de tiol y actúa como un eficiente antioxidante fisiológico. Esto es debido a que inhibe la formación de radicales libres, como los radicales hidroxilo y superóxido; también induce la vía de desintoxicación celular Fase II, ya que activa factores de transcripción sensibles a cambios redox, y aumenta la protección contra agresiones oxidativas fuertes [33]. Gracias a esto, protege a las

lipoproteínas de baja densidad de la oxidación por los radicales libres y aumenta las enzimas antioxidantes celulares.

La alicina también puede liberar ácidos sulfénicos (que son intermediarios en su biosíntesis), los cuales actúan como trampas para radicales de oxígeno como los radicales peroxilo [22]. Debido a su efecto antioxidante, el tiosulfonato de dialilo ha sido considerado como un bioactivo prometedor en el tratamiento de cáncer, afectaciones cardiovasculares e inflamatorias y desórdenes neurodegenerativos [5].

Actividad anticancerígena

Se ha demostrado que en líneas celulares de mamíferos, incluidas las células humanas con cáncer, la alicina provoca un cambio redox que desencadena la apoptosis (muerte celular programada), tanto de forma dependiente de caspasas como independiente de estas, e inhibe la proliferación celular [38]. Los mecanismos de acción documentados por los que este compuesto azufrado ejerce sus efectos anticancerígenos son diversos (induciendo cambios redox, mediante caspasas, a través del activador Nrf2, etc.). La actividad anticancerígena de la alicina ha sido evaluada mayoritariamente mediante estudios *in vitro*, en células de glioma humano, células de hepatocarcinoma, líneas celulares de cáncer de colon, carcinoma de células renales, entre otros [5]. En estudios *in vivo*, la alicina también ha mostrado notables efectos antitumorales, actuando sobre diferentes objetivos moleculares y en una amplia variedad de modelos de cáncer, aunque debido a su misma inestabilidad química los ensayos en humanos han sido reducidos.

Actividad contra enfermedades cardiovasculares

La alicina y los productos secundarios en los que se descompone influyen positivamente en el tratamiento de trastornos cardiovasculares. La manera en que contrarresta tales trastornos es diversa:

Antiaterosclerótico: de acuerdo con numerosos ensayos clínicos *in vitro*, realizados en modelos animales y humanos, este organosulfurado podría ser un fármaco eficaz en la prevención y tratamiento de la aterosclerosis. Esto se debe a su efecto positivo en la normalización de los valores de lípidos, la reducción moderada de la presión arterial y su actividad fibrinolítica y antiagregante plaquetaria [39].

Antihiperlipidémico: su efecto hipolipemiante se debe a que provoca cambios en el perfil de lípidos en sangre, incluida la mejora del colesterol total (aumento considerable del HDL y reducción del LDL), el control de los niveles de glucosa y la regulación del líquido sanguíneo (triglicéridos y colesterol total) [24].

Antitrombótico: la alicina también presenta actividad antitrombótica producto de la inhibición plaquetaria y el aumento en la vasodilatación, que contrarresta la formación de trombos y coágulos los cuales deterioran en gran medida al sistema cardiovascular [26].

Antihipertensivo: el efecto hipotensor de la alicina se debe a su reactividad y a que se descompone rápidamente en productos secundarios. Cuando reacciona con tioles (como el glutatión) libera sulfuro de hidrógeno (H₂S), asociado con la regulación de la presión arterial. Esta molécula gaseosa provoca la relajación de las células del músculo liso y la subsecuente vasodilatación, reduciendo la presión arterial [40].

2.3 Estrategias para la estabilización de alicina

En las últimas dos décadas se han realizado estudios con diversidad de enfoques para solventar o evitar el problema relacionado con la inestabilidad de la alicina. Algunos estudios iniciales centraron sus esfuerzos en que la síntesis de alicina ocurriera *in vivo*, tras el consumo de un vehículo de entrega, en lugar de estabilizarla tras su obtención. Bajo esta premisa, el polvo de ajo ha sido uno de los suplementos más recurridos para ser ingerido en forma de cápsulas o tabletas [41,42]; se espera que una vez que estos vehículos entren en contacto con el agua, la acción enzimática de la alinasa sobre la aliina (ambas contenidas en el polvo de ajo) produzca alicina [43,44]. No obstante, se ha demostrado que la alinasa se inactiva a pH ácidos como el del estómago, inhibiendo la producción de alicina y con ello la bioactividad de los productos consumidos [45].

Teniendo en cuenta las condiciones gástricas ácidas, desfavorables para la producción de alicina, otros autores han empleado tabletas con recubrimientos entéricos [43] y tabletas de doble capa con recubrimiento entérico. De esta manera se busca preservar la actividad enzimática de la alinasa y promover la síntesis de alicina *in vivo* a nivel intestinal [7].

Por otro lado, se han reportado diferentes métodos para estabilizar a la alicina, los cuales presentan diferentes niveles de complejidad. Uno de ellos consistió en utilizar soluciones acuosas e hidroalcohólicas para lograr la estabilización del organosulfurado [46]. Se encontró que al inicio

de la extracción, la alicina se mostró relativamente estable; posteriormente, los niveles de esta disminuyeron gradualmente a temperatura ambiente, de tal modo que en dos semanas desapareció la mayor parte [47,48].

A su vez, Prati y colaboradores encontraron que, al procesar diferentes variedades de ajo en pastas acidificadas libres de sal, el contenido de alicina permaneció relativamente estable. Se reportó que tras 180 días de almacenamiento, los valores de alicina en la pasta en base húmeda (entre 6.34 y 7.74 mg/g) eran cercanos a los valores encontrados para ajo crudo (4.30 a 6.36 mg/g) de algunas variedades chinas; confirmando que ese tipo de procesamiento aseguraba la estabilidad del bioactivo durante el almacenamiento, independientemente de la variedad de ajo utilizada [31].

Otra estrategia de estabilización del tiosulfonato fue propuesta por Wilde y colaboradores, la cual consistió en unir covalentemente alicina con proteína de suero β -lactoglobulina para usarla como nanotransportador en matrices alimenticias. La β -lactoglobulina modificada fue obtenida por secado por aspersión, se mostró estable durante este proceso y presentó alta solubilidad. Este sistema de entrega estabilizó a la alicina y además enmascaró su intenso sabor característico [49].

Alternativamente, una de las técnicas que ha destacado en años recientes es la encapsulación. El objetivo principal es encapsular a los compuestos bioactivos lábiles para brindarles estabilidad e incrementar su robustez frente al deterioro, pérdidas volátiles o la interacción prematura con otros principios activos [8]. También, la técnica es empleada para extender la vida útil de tales compuestos sensibles, controlar su liberación y mecanismo de entrega, así como para enmascarar sabores, colores y olores [50]. Su aplicación en formulaciones de alicina no ha sido la excepción, dentro de las técnicas de encapsulación más utilizadas se encuentra el secado por aspersión, inclusión molecular, liposomas, emulsiones, entre otras. Los agentes encapsulantes o materiales de pared empleados para conferir estabilidad a este metabolito también han sido variados [51].

Wang y colaboradores utilizaron la técnica de microencapsulación para mejorar la solubilidad y estabilidad de la alicina. Usando una novedosa mezcla de β -ciclodextrina con almidón poroso como agente encapsulante y mediante secado por aspersión (spray drying), obtuvieron microcápsulas de alicina cuya estabilidad frente al calor, pH, luz y oxígeno mejoró entre un 20-40 % [52]. Otro estudio realizado por Nikolic y colegas también demostró que, tras formar complejos de inclusión con ciclodextrinas, la alicina incrementó su estabilidad y además conservó su actividad biológica [53].

Por otra parte, Lu y colaboradores encapsularon alicina en nanoliposomas de lecitina-colesterol usando el método de evaporación en fase inversa; reportaron que la alicina exhibió alta estabilidad durante su almacenamiento, aumento de su vida útil e incluso atenuación de su característico olor acre [54]. En esta misma línea, Pinilla y colegas encapsularon extracto de ajo (cuyo componente principal es la alicina) en liposomas aplicando el método de hidratación de película delgada y usando como agente encapsulante fosfatidilcolina de soja purificada [55]. Pinilla y Brandelli también realizaron un estudio en el que encapsularon extracto de ajo y nisina en nanoliposomas de fosfatidilcolina; encontraron que tales nanoestructuras presentaron propiedades estables que protegieron a la alicina de agentes externos como luz, calor y condiciones alcalinas [56]. En otro estudio, Pinilla y colaboradores encapsularon extracto de ajo en liposomas de fosfatidilcolina y ácido oleico para evaluar su actividad antifúngica en el pan de trigo; documentaron que a temperaturas de horneado cercanas a los 100 °C, los liposomas presentaron buena estabilidad y evitaron la pérdida de los compuestos con actividad antifúngica presentes en el extracto de ajo. Las propiedades térmicas que presentaron los liposomas demostraron su potencial uso para mejorar la estabilidad microbiológica de productos horneados como el pan de trigo [57].

Strehlow y colaboradores recurrieron a la técnica de secado por aspersión para obtener un polvo que liberaba alicina en presencia de agua, el cual consistió en microesferas de aliina y alinasa (encapsuladas por separado) recubiertas con lactosa como material de pared y excipiente [6]. Por otro lado, Kinalski y Zapata encapsularon extracto de ajo, empleando secado por aspersión y usando como materiales de pared goma guar parcialmente hidrolizada y goma arábiga; evaluaron el efecto de las temperaturas de esta técnica de encapsulación sobre el contenido de tiosulfatos del extracto [58].

Tavares y colegas, por otro lado, aplicando una mezcla de quitosano y proteína de suero de leche aislada como material de pared, encapsularon extracto de ajo con el método de coacervación compleja seguido de secado por atomización. Analizaron las características físicas, químicas y morfológicas de las micropartículas obtenidas; a partir de esto, concluyeron que los complejos quitosano-proteína de suero de leche son un material encapsulante viable que reveló una buena protección de los compuestos bioactivos presentes en el extracto de ajo [59]. Además, Tavares y colaboradores también encapsularon extracto de ajo por medio de coacervación compleja seguida de liofilización. Los materiales de pared usados en esta ocasión fueron dos complejos: quitosano-

proteína de suero de leche y goma arábiga-quitosano. Los autores reportaron que la técnica de microencapsulación junto con los encapsulantes empleados permitió la protección de los compuestos termosensibles presentes en el extracto de ajo [60].

Otros materiales de pared que han sido utilizados para la encapsulación de alicina se han obtenido de sustancias como alquil celulosa, acetato ftalato de celulosa, gelatina y maltodextrina [52].

2.4 Microencapsulación de compuestos bioactivos/nutracéuticos

Muchos compuestos bioactivos de interés nutracéutico tienen que superar desafíos relacionados con su estabilidad durante el procesamiento, con condiciones ambientales o gastrointestinales desfavorables, con su baja solubilidad en agua, entre otros, para garantizar efectos benéficos en la salud posterior a su ingesta. Bajo esta premisa, la encapsulación es una estrategia atractiva para solventar tales retos.

La encapsulación comprende un proceso en el que un componente activo es rodeado con un recubrimiento o es retenido en una matriz. Una de las tecnologías de mayor uso para encapsular bioactivos en el sector alimenticio, farmacéutico, cosmético, entre otros, es la microencapsulación; la cual se caracteriza por generar partículas con diámetros comprendidos entre unos micrómetros a unos milímetros [60,61]. El bioactivo a encapsular es denominado núcleo, agente activo, relleno, fase dispersa o interna, mientras que el material que contiene al núcleo es llamado encapsulante, pared, soporte, recubrimiento, membrana, fase externa o matriz [62]. Los productos resultantes de la encapsulación hacen referencia al tipo de técnica empleada: nanopartículas (nanoencapsulación), micropartículas (microencapsulación) o milipartículas (encapsulación). Estas se clasifican como cápsulas o esferas (Figura 3) en función de su estructura interna y morfología. Las cápsulas son partículas heterogéneas donde una capa de recubrimiento rodea el núcleo. Las esferas son un sistema tipo matriz donde el bioactivo está disperso en todo el encapsulante (incluyendo la superficie de la partícula) [63]. Cabe destacar que también pueden obtenerse partículas de forma irregular, multicapa, polinucleares, entre otras.

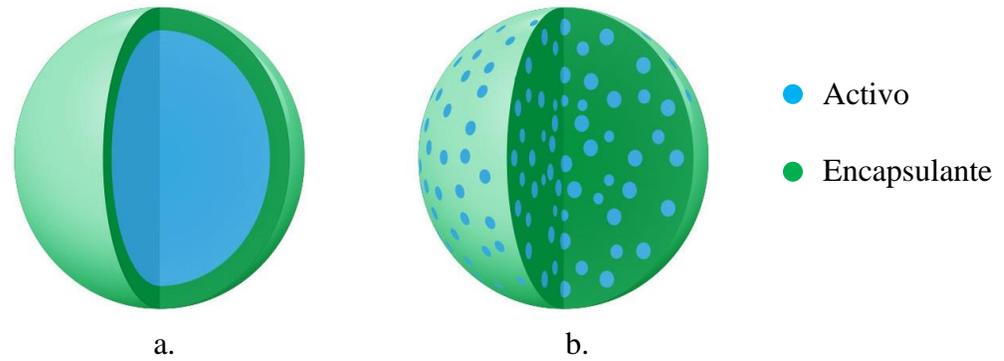


Figura 3. Tipos de micropartículas: a) Cápsula, b) Esfera [64].

Dentro de los principales beneficios que aporta la técnica se encuentran: protección de la molécula bioactiva de condiciones ambientales deletéreas (humedad, luz, oxígeno o calor), condiciones adversas del tracto digestivo (pH ácidos del estómago), aumento de la estabilidad, disminución de la evaporación de núcleos volátiles, enmascaramiento del sabor y olor, entrega mejorada, liberación controlada, mejor biodisponibilidad y bioactividad, seguridad y calidad antibacteriana [65,66].

2.4.1 Técnicas de microencapsulación

Junto con el núcleo y el material de pared, la técnica de encapsulación es otro factor que determina el tamaño y la forma de las micropartículas. Las tecnologías existentes para elaborar micropartículas son diversas y su elección se basa en las características deseadas en el producto final y en las condiciones a las que estará expuesto. Se pueden distinguir principalmente tres categorías [51], las cuales se muestran en la Figura 4:

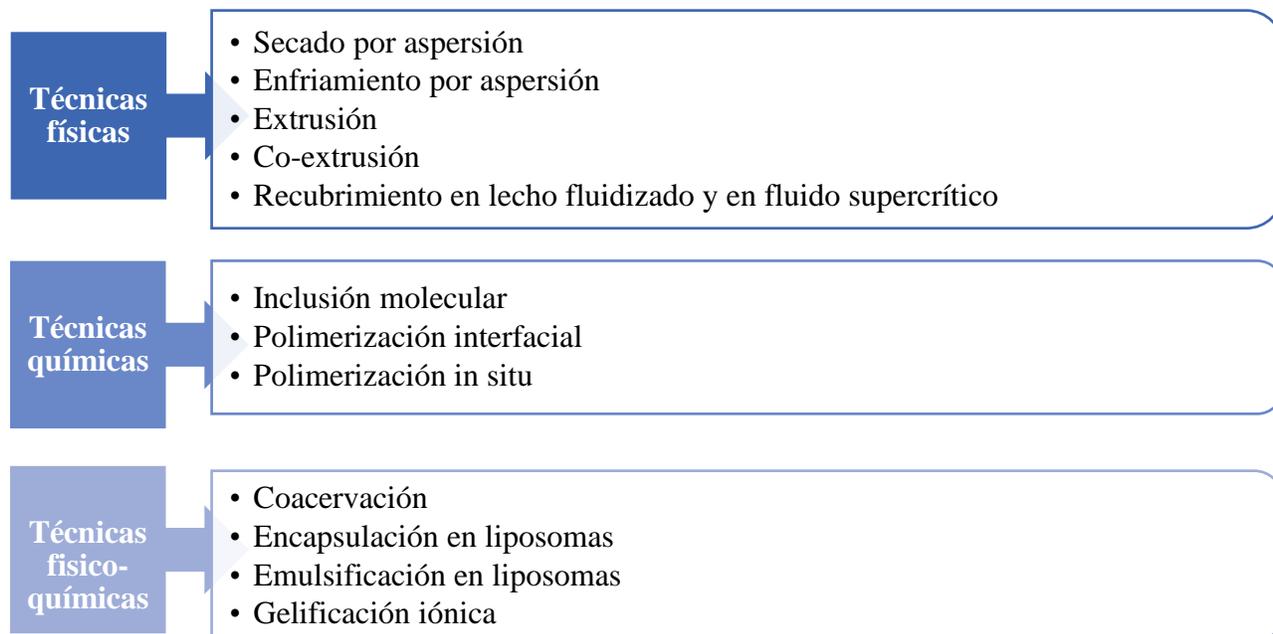


Figura 4. Principales técnicas de microencapsulación.

A continuación, se describen las técnicas de encapsulación más aplicadas en la encapsulación de compuestos bioactivos del ajo.

- Secado por aspersión

También conocida como “Spray drying”, es la técnica número uno para microencapsular bioactivos, especialmente en la industria alimentaria. Esto se debe a su versatilidad, facilidad de aplicación, eficiencia de encapsulación, producción de partículas de tamaño uniforme (generalmente menor a 40 μm), buena estabilidad del producto final y asequibilidad. La principal limitante de esta técnica son las altas pérdidas de compuestos volátiles durante el secado a altas temperaturas y consiguiente disminución del rendimiento del producto final [67]. El proceso consiste en la transformación de una fase líquida (emulsión, suspensión o solución) en un material sólido, mediante el uso de aspersión y secado con aire caliente o un gas inerte como nitrógeno. Primero, el material activo se dispersa en una solución del agente encapsulante con el cual es inmisible. El siguiente paso consiste en crear gotas pequeñas del ingrediente en la solución encapsulante, formando una emulsión fina. Finalmente, se lleva a cabo la atomización, donde la emulsión se rocía en una cámara con aire caliente que seca las partículas produciendo polvo o esferas de tamaño micrométrico [68].

- Extrusión

La segunda técnica más usada es la microencapsulación por extrusión. Se ha empleado comúnmente para la encapsulación de nutraceuticos u otros núcleos volátiles e inestables (sabores, vitaminas, colorantes, etc.). Es una técnica versátil, de bajo costo, altamente eficiente, fácil de escalar y libre de solventes orgánicos. Al emplear condiciones suaves de operación ($P < 100$ psi, $T < 118$ °C) es muy útil para productos termolábiles y además, produce partículas menos porosas que el secado por aspersión [69]. Ciertas limitantes que presenta la técnica son: gran tamaño de partícula obtenido (500-100 μm) y limitada variedad de encapsulantes, en su mayoría polímeros. El procedimiento consiste en formar una solución acuosa del polímero encapsulante con el agente activo y seguidamente crear gotas por medio de un dispositivo extrusor; las gotas se dejan caer sobre un baño endurecedor o de gelificación, formando así las micropartículas. El extrusor o herramienta de goteo puede ser una jeringa, una boquilla vibratoria, una boquilla de pulverización, un cortador de chorro o un disco atomizador [70].

- Polimerización interfacial

También recibe el nombre de policondensación. Las microcápsulas formadas por esta vía pueden producirse como emulsiones de aceite en agua o de agua en aceite. Se caracteriza por ser una técnica simple y confiable, con tiempos de reacción rápidos, costos relativamente bajos, de fácil escalamiento y carácter controlable (el tamaño medio de la cápsula y el grosor de la membrana se pueden diseñar directamente) [71]. Para llevar a cabo la encapsulación, se disuelve un monómero A en el material del núcleo y esta solución se dispersa en una fase acuosa. Luego se añade un monómero B y estos dos monómeros (A y B) disueltos en fases acuosas y orgánicas, se encuentran en la interfaz, reaccionando casi instantáneamente para producir una "membrana primaria" en la superficie de las gotitas del núcleo, lo que conduce a la encapsulación. Seguidamente, la velocidad de reacción disminuye a medida que la difusión de los monómeros se ve restringida por la cubierta polimérica y finalmente, el polímero se consolida dando lugar a las microcápsulas [72].

- Inclusión molecular en ciclodextrinas

Se trata de una técnica de encapsulación a nivel molecular que utiliza como agentes encapsulantes ciclodextrinas: moléculas de almidón modificado, en forma de conos huecos truncados, con una cavidad formada por átomos de hidrógeno y oxígeno glicosídico. Se distinguen tres tipos de

ciclodextrinas: α , β y γ ; son anfifílicas y tienen, por ende, una parte interior hidrofóbica y una parte exterior hidrofílica. Tales características, les permiten formar complejos supramoleculares en solución acuosa con una molécula que se aloja dentro de su cavidad; esto último es el principio en el que se basa la formación de las microcápsulas por inclusión molecular. La técnica es adecuada para compuestos bioactivos volátiles, pocos solubles, termosensibles o químicamente lábiles. Sin embargo, se ve restringida por el alto costo de las ciclodextrinas, la baja carga útil, la capacidad de carga que se limita a compuestos apolares con dimensiones moleculares específicas, entre otros [73]. El proceso de inclusión más usual consiste en la agitación de la ciclodextrina y la molécula huésped en fase acuosa, para formar el complejo ciclodextrina-activo el cual es filtrado y posteriormente secado. Existen también opciones menos usuales como son el mezclado de la ciclodextrina y el huésped con agua para formar una pasta; opción con la cual puede incluso prescindirse del uso de solventes. O bien, haciendo pasar un gas a través de la solución (ciclodextrina-huésped) para que ocurra la inclusión [69].

- Coacervación

La coacervación es conocida como un método de separación de fases. Existen dos tipos: coacervación simple y coacervación compleja. La primera utiliza solo un polímero, por ejemplo, gelatina o etilcelulosa, y agentes fuertemente hidrofílicos, lo que provoca que se formen dos fases. La coacervación se induce añadiendo alcohol o sal, o bien, manipulando el pH o la temperatura; este tipo de coacervación ofrece ventajas importantes sobre la coacervación compleja con respecto a reducción de costos y flexibilidad de operación. Por otro lado, la coacervación compleja usa dos materiales poliméricos con carga opuesta, como gelatina (polielectrolito positivo) y goma arábica (polielectrolito negativo), lo que provoca la formación de dos fases distintas e incompatibles: una fase rica en polímero (coacervado) en equilibrio con una fase de disolvente diluido. Además del pH y la temperatura, este tipo de coacervación se ve afectada por parámetros como la fuerza iónica y el tiempo de agitación; la densidad y proporción de las especies coloidales, su naturaleza, composición y carga también influyen.

En general, la coacervación es una de las mejores técnicas para microencapsular compuestos volátiles, ya que no emplea altas temperaturas, posee alta eficiencia de encapsulación y produce micropartículas con buena estabilidad durante el procesamiento y almacenamiento. No obstante, el

proceso es costoso y una de las limitantes más conocidas es que tras la obtención de las partículas se requiere de procesos de secado para eliminar el exceso de solvente y obtener polvo [73]. La técnica consiste en tres etapas: primero, el polímero se disuelve en agua (a 40–50 °C), separándose en forma de pequeñas gotas denominadas “coacervado”, gracias a un método de separación de fases (inducido por ejemplo por el cambio de temperatura de la solución polimérica), y el material del núcleo se dispersa en la solución polimérica anterior. En segundo lugar, el coacervado se deposita alrededor de las partículas insolubles del núcleo. Al final, el recubrimiento se estabiliza y endurece para formar las microcápsulas, generalmente mediante técnicas térmicas, de reticulación o desolvatación [74].

- Atrapamiento en liposomas.

Los liposomas son estructuras esféricas o vesículas microscópicas, con una o más bicapas de fosfolípidos, que forman capas concéntricas las cuales contienen a un núcleo acuoso. La bicapa lipídica se forma por la naturaleza anfifílica de los fosfolípidos, permitiendo a los liposomas contener núcleos hidrofílicos (encapsulados en los compartimentos acuosos internos), lipofílicos (contenidos dentro de las bicapas lipídicas) o anfifílicos (atrapados dentro de las dos regiones mencionadas anteriormente). Estas estructuras son adecuadas para proteger bioactivos termosensibles y que se oxidan y degradan con facilidad. La técnica es sencilla, fácil de escalar y permite encapsular con alta eficiencia. Los altos costos del proceso y de los materiales, la no reproducibilidad entre lotes y los diferentes tamaños de partículas generados en un mismo lote hacen que la técnica sea menos explotada.

El proceso de encapsulación ocurre de la siguiente manera: las moléculas de lípidos son disueltas en solventes orgánicos y tal mezcla es sometida a procesos de remoción de solventes (evaporación de solventes, doble evaporación-emulsión o evaporación de fase inversa) para generar una lámina o película lipídica fina. Posteriormente, la película lipídica es hidratada con la solución acuosa que contiene al bioactivo a encapsular. Los fosfolípidos se dispersan en la fase acuosa formando espontáneamente liposomas dentro de los cuales queda atrapado el activo. Los liposomas también pueden producirse mediante técnicas físicas como extrusión, sonicación, microfluidización, etc. [75].

2.4.2 Gelificación-precipitación como método de encapsulación de alicina

Cuando se trata de alternativas que mejoren la estabilidad de bioactivos del ajo, como la alicina, la amplia gama de técnicas de microencapsulación ha sido escasamente explorada. Dificultades prácticas presentadas por algunas técnicas son el motivo por el cual la búsqueda de tecnologías que produzcan micropartículas con mejores propiedades continúa. Algunas de dichas dificultades son: problemas de segregación y liberación del activo debido a la naturaleza del encapsulante (atrapamiento en liposomas), cambios en las propiedades fisicoquímicas y estructurales de los polvos producto de etapas de deshidratación (coacervación) y degradación de tiosulfatos (entre un 25-75 %) por el uso de altas temperaturas (secado por aspersion) [76]. Así, las técnicas que no usan altas temperaturas han sido poco estudiadas y en el caso particular de la alicina, dada su termolabilidad, podrían ser una opción muy conveniente. En este sentido, la segunda técnica de microencapsulación más usada: la extrusión, podría considerarse como una alternativa inmediata para la encapsulación viable de alicina. Esta no ha sido reportada previamente como una técnica térmicamente agresiva y además, destaca por producir gotas de manera controlada (mecanismo conocido como “prilling”) [68].

En el presente trabajo, la técnica de extrusión acoplada con el mecanismo de gelificación iónica será denominada “gelificación-precipitación”. Esta técnica, de carácter fisicoquímico, sigue el mismo principio que la extrusión por prilling pero, a diferencia de las herramientas de goteo comunes, emplea una bomba peristáltica para controlar la velocidad de flujo de la solución a extruir. El procedimiento comprende dos etapas (Figura 5): primero se da la extrusión de la solución biopolímero-activo en forma de gotas y seguidamente ocurre un proceso de gelificación ionotrópica para solidificar tales gotas. Para esto, el principio activo es suspendido en una disolución del biopolímero encapsulante y esta solución es dosificada en forma de gotas usando la bomba peristáltica. Posteriormente, las gotas caen en un medio con carga opuesta (solución iónica o reticulante) lo cual induce la formación de gel [77]. Durante esta etapa, las cadenas de polímero (usualmente polielectrolitos aniónicos) interactúan con la solución iónica (generalmente de CaCl_2 o NaCl), donde ocurre la gelificación. Tras el contacto de la gota con la solución de CaCl_2 , iones divalentes como el Ca^{2+} empiezan a reticular con las cadenas de polímero en la periferia de cada gota extruida, formándose una membrana semisólida, insoluble y permeable que encierra la gota con un núcleo líquido. Conforme aumenta el tiempo de reposo de las gotas, la difusión de iones

Ca^{2+} a través de la membrana también incrementa, provocando la solidificación del núcleo de las gotas. Como resultado, se forma una microesfera cuya carga se enreda aleatoriamente dentro de la matriz reticulada [78].

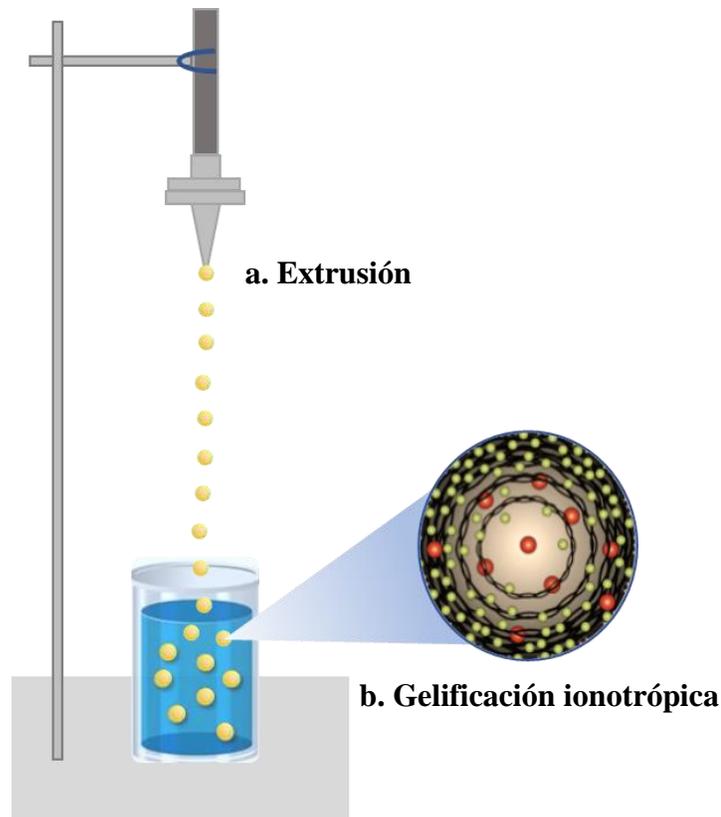


Figura 5. Técnica de gelificación – precipitación [78].

2.5 Biopolímeros como agentes encapsulantes

Un agente encapsulante debe cumplir con ciertas características: no ser reactivo con el material a encapsular, garantizar la máxima protección del núcleo frente a condiciones adversas, permitir su liberación controlada, ser biodegradable, biocompatible, no tóxico y económicamente viable [75]. Teniendo en cuenta lo anterior, muchos de los materiales de pared empleados en la microencapsulación de nutraceuticos han sido seleccionados de una amplia gama de polímeros naturales [70]. Estos biopolímeros son macromoléculas constituidas por unidades básicas denominadas monómeros [79]. Son sintetizados por seres vivos de diversos grupos biológicos (bacterias, hongos, algas, plantas y animales) por lo que también poseen funciones biológicas, estructurales, de defensa, entre otras. Se caracterizan por su biocompatibilidad, biodegradabilidad,

resistencia mecánica, estabilidad química, baja o nula toxicidad, son renovables y, en la mayoría de los casos, disponibles en abundancia; razones por las que han adquirido importancia en diferentes áreas de la industria. Particularmente, en el sector de alimentos y fármacos, los polímeros naturales están siendo empleados como estabilizantes y emulsificantes, modificadores de las propiedades reológicas de los productos, como agentes encapsulantes y transportadores de diversos fármacos y principios activos, como encapsulantes de sabores y aromas, para actuar como agentes nutracéuticos y también como formadores de geles o películas.

Las dos clases de biopolímeros más utilizados por su potencial para encapsular bioactivos son las proteínas y los polisacáridos (incluidos los complejos proteínas - polisacáridos). Dentro de los más usados se encuentran: alginatos, quitosano, almidón, goma arábiga, goma guar, carragenina, goma de xantana, gelatina, proteína de suero, pectina, ciclodextrinas, carboximetilcelulosa, entre otros[80,81]; en su mayoría polisacáridos, dentro de los cuales se encuentra el mucílago de nopal.

2.5.1 Mucílago de nopal

El nopal, *Opuntia ficus-indica*, es una planta arbustiva perteneciente a la familia de las cactáceas, nativa de México. Consta de un tronco leñoso y grandes tallos aplanados, carnosos y usualmente elípticos, denominados cladodios (Figura 6); estos tallos poseen una epidermis con ausencia parcial o total de espinas y pelos multicelulares (llamados tricomas) que forman la areola distintiva de esta familia de cactus [82].



Figura 6. *Opuntia ficus-indica* (nopal) [83].

Opuntia ficus-indica es la especie más domesticada, cultivada y comercializada; su significado y valor cultural, biótico e histórico es evidente. Desde la época prehispánica, especialmente en

México, el “nopal verdura” ha sido de gran importancia en la dieta humana y animal. Actualmente, su potencial agrotecnológico ha incrementado significativamente. Además de ser un producto alimenticio, el nopal está siendo base para generar diferentes productos en áreas como la agropecuaria. También, se ha determinado que posee propiedades nutricionales y representa una fuente importante de compuestos bioactivos con efecto antioxidante, antiinflamatorio, entre otros beneficios para la salud humana [84]. Particularmente, el mucílago presente en los cladodios de nopal, cuya función es la retención de agua en la planta, es considerado una potencial fuente de hidrocoloides por lo cual ha sido motivo de múltiples investigaciones. Sus propiedades funcionales y su actividad biológica le han convertido en un aditivo de interés para una amplia gama de industrias, especialmente para el sector alimenticio, farmacéutico y cosmético.

El mucílago es un fluido viscoso presente en los frutos (cáscara y pulpa) y en los cladodios del nopal, con proporciones cercanas a 8 % y 20 %, respectivamente [85]. En estos últimos, se produce en la epidermis, conformada por dos capas: una capa de células verdes llamada clorénquima y otra capa interna formada por un cilindro de glóbulos blancos denominada parénquima. Ambas capas tienen la función de almacenar agua, lo cual logran mediante células mucilaginosas llamadas idioblastos; siendo el parénquima más abundante en estas [86]. Gracias a la capacidad de retención de agua por parte del mucílago, las cactáceas están bien adaptadas a tierras áridas y cálidas con condiciones climáticas desfavorables, como las sequías prolongadas.

En general, el mucílago obtenido de los cladodios de *Opuntia ficus-indica* ha sido descrito como un heteropolisacárido hidrofílico, con peso molecular en el rango de los $2.3 \times 10^4 - 3 \times 10^6$ g/mol. Su estructura molecular primaria la compone una cadena lineal que contiene ácido galacturónico, ramnosa y galactosa, a la cual se unen residuos de xilosa y arabinosa (en formas piranosa y furanosa) en posiciones periféricas [87]. La composición porcentual aproximada de esta mezcla compleja de polisacáridos ácidos y neutros, de naturaleza polielectrolítica, está dada como sigue: L-arabinosa (24.6-42 %), D-galactosa (21-40.1 %), D-xilosa (22-22.2 %), L-ramnosa (7-13.1 %) y ácido D-galacturónico (8-12.7 %) [88,89]; también se encuentran presentes minerales como Ca^{2+} (en mayor proporción), K^+ , Mg^{2+} , Na^+ , carbohidratos y fibra dietética soluble.

Las propiedades reológicas del mucílago de nopal, principalmente su viscosidad intrínseca, dependen de su concentración, pH y fuerza iónica [90]. La viscosidad aumenta proporcionalmente al incrementar la concentración, favoreciendo la formación de redes macromoleculares con

importantes propiedades elásticas. En cuanto al pH, mientras en la región ácida la viscosidad es menor, en la región alcalina los valores de viscosidad intrínseca son mayores y muestran tendencia a ser constantes, lo cual se debe a la ionización de los grupos carboxilo del mucílago. Por otro lado, la viscosidad disminuye al aumentar la fuerza iónica. Por ejemplo, la concentración de iones divalentes como el Ca^{2+} y el Mg^{2+} reducen más la viscosidad que la concentración de iones Na^+ o K^+ ; tal comportamiento es característico de polielectrolitos cargados negativamente [91]. Al añadir iones positivos la repulsión intermolecular se reduce y con ella la expansión de la molécula, provocando un decremento significativo de la viscosidad. En ausencia de contraiones o cuando la fuerza iónica es igual a cero, una carga negativa produce repulsiones intermoleculares fuertes, y a su vez, una molécula más expandida; esto explica la alta viscosidad del mucílago de nopal en agua desionizada. Por ende, el mucílago ha sido clasificado como un polielectrolito aniónico, cuya carga negativa corresponde a los grupos carboxílicos del ácido galacturónico, el cual constituye la columna vertebral de este polisacárido [92].

Su capacidad de retención de agua se debe a la alta concentración de grupos hidroxilo, los cuales le dan una gran capacidad de unión al agua [93]. Cuando el mucílago entra en contacto con agua, se hincha; en algunos casos forma masas gelatinosas o suspensiones coloidales muy viscosas de grandes agregados moleculares, por ello se le cataloga como hidrocoloide. Lo anterior dota al mucílago de nopal con propiedades funcionales espesantes, gelificantes, emulsionantes y encapsulantes [85], las cuales le han conferido aplicaciones en la industria cosmética, farmacéutica, de alimentos, entre otras. Por ejemplo, se ha usado como espesante, sustituyente de grasas, emulsionante y formador de películas de grado alimenticio, protector de superficies mucosas, hidratante y reparador cutáneo, en la formulación de productos antienvjecimiento, en el tratamiento de aguas contaminadas con coliformes fecales y metales pesados, como adhesivo para cal y superplastificante en morteros [89,94].

Además, este biopolímero posee actividad biológica confirmada, por lo cual se le ha considerado a su vez como nutraceutico. Su bioactividad es amplia e incluye efecto antioxidante, antiviral, anticancerígeno, hipolipemiente, hipoglucemiante, antiinflamatorio, mucoprotector, antiglicante, hepatoprotector y cicatrizante de heridas; aunado a que es un efectivo auxiliar en el tratamiento de diabetes tipo II y trastornos digestivos [94].

Considerando que este hidrocoloide funge como agente encapsulante, es de bajo costo, fácil acceso, presenta bioactividad, biocompatibilidad, biodegradabilidad y no toxicidad, en 2013 Medina y colaboradores lo usaron como material encapsulante para producir microcápsulas de ácido gálico mediante secado por aspersión. Lo describieron como un biomaterial de pared eficaz en alimentos funcionales bioactivos [95]. Posteriormente Ótalora y colaboradores realizaron la microencapsulación de betalaínas mediante secado por aspersión utilizando mucílago de nopal como encapsulante y confirmaron su gran potencial como material de pared [96]. Asimismo, Quinzio y colaboradores, al estudiar las propiedades fisicoquímicas y reológicas del mucílago de nopal concluyeron que el hidrocoloide presenta propiedades prometedoras como material encapsulante y resaltaron como ventaja su fácil extracción a partir de una fuente natural [92].

2.5.2 Alginatos

Desde el siglo XIX, las algas marrones o pardas han sido consideradas un recurso natural marino de gran valor para la obtención de biopolímeros. Pertenecientes a la clase *Phaeophyceae* e incluidas en el reino Protista, consisten principalmente en algas macroscópicas cuyo color marrón dorado se debe a un pigmento carotenoide, llamado fucoxantina. Estos organismos multicelulares fotosintéticos pueden ser desde pequeñas formas filamentosas, hasta grandes y complejas algas marinas [97]. Especies como *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ecklonia maxima*, *Lessonia nigrescens*, *Durvillaea antarctica*, *Sargassum spp* y *Macrocystis pyrifera* (Figura 7) son las feofíceas de mayor importancia comercial ya que en sus tejidos contienen polímeros naturales de gran interés industrial: alginatos [98].



Figura 7. Alga marrón *Macrocystis pyrifera* [99].

Los alginatos son los componentes estructurales de la pared celular de las algas pardas, y su función biológica principal es conferirles resistencia mecánica, flexibilidad y capacidad de enlazar agua.

En su estado natural e intercelularmente, los alginatos están presentes en forma de geles y se encuentran formando un complejo insoluble de sales de ácido algínico con varios cationes metálicos comunes en el agua de mar como Ca^{2+} , Mg^{2+} y Na^+ en diferentes proporciones, dando lugar a sales con diferentes grados de solubilidad y por lo tanto, distintos grados de viscosidad [98, 99]. Su afinidad por formar enlaces con el agua, y consecuente carácter hidrocoloide, aunado a sus versátiles propiedades, les han permitido a estos polímeros abrirse paso en muchos campos de la industria y ser el centro de diversos estudios.

Los alginatos son los polisacáridos más abundantes presentes en las algas marrones, representando hasta un 40 % de su peso seco. Han sido definidos como una familia de polisacáridos lineales aniónicos cuya estructura está conformada por copolímeros de bloques del ácido urónico: regiones homopoliméricas de ácido β -D-manurónico (M) y ácido α -L-gulurónico (G), denominadas bloques M y G (Figura 8), unidas por enlaces glicosídicos (1 \rightarrow 4) e intercaladas con regiones de estructura alterna (bloques MG).

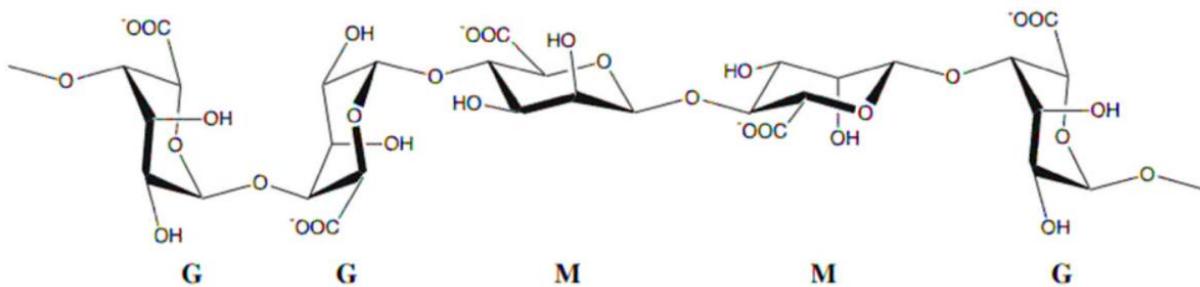


Figura 8. Estructura del alginato. Bloques de ácido β -D-manurónico (M) y α -L-gulurónico (G) [100].

Así, las cadenas de alginato contienen tres bloques diferentes: bloques MM, que contienen solo unidades de manurónico, bloques GG, tienen solo unidades de gulurónico, y bloques MG, con unidades alternas de manurónico y gulurónico. El carácter aniónico del biopolímero se debe a los grupos carboxílicos presentes a lo largo de la cadena. La carga y el volumen de estos grupos funcionales, junto con la distribución de unidades M y G, la cual varía entre especies, influyen en las propiedades del gel. Alginatos con alto contenido de M, los cuales presentan cadenas lineales, dan lugar a geles flexibles, elásticos y con poca sinéresis; alginatos con mayor contenido de G, cuyas cadenas tienen estructura de zigzag, se caracterizan por geles consistentes, rígidos, quebradizos y con sinéresis [98,101].

En cuanto a las propiedades reológicas, en los alginatos la viscosidad es la más importante y se ve influenciada por varios factores. En medio ácido la viscosidad de estos biopolímeros hidrofílicos incrementa, ya que la solubilidad del ácido algínico libre se reduce, favoreciendo que precipite en forma de gel. Variaciones de pH entre 5-10 no tienen efecto sobre esta propiedad, mientras que cambios extremos de pH (>10) causan su despolimerización. Por otro lado, al aumentar la temperatura la viscosidad de las soluciones de alginato disminuye, siendo esto un cambio reversible. No obstante, exposiciones prolongadas a tratamientos térmicos también resultan en la degradación del polímero. La fuerza iónica también ejerce efectos en la viscosidad, en presencia de sales con cationes monovalentes la viscosidad de los alginatos decrece levemente y disminuye aún más cuando la fuerza iónica es mayor. Al tratarse de un polímero aniónico, la adición de iones positivos reduce la repulsión intermolecular, ocasionando que el polímero se contraiga y por ende, la viscosidad descienda. A su vez, la viscosidad de las soluciones de alginato varía con la concentración, incrementando proporcionalmente cuando la concentración del hidrocoloide aumenta. Además, los alginatos con pesos moleculares mayores, poseen mejor poder viscosificante y espesante [102].

La naturaleza hidrocoloide de este grupo de polisacáridos, les concede propiedades gelificantes, espesantes, encapsulantes, estabilizantes y formadoras de películas. Como resultado, estos biopolímeros han encontrado usos como material ignífugo, material de recubrimiento en la industria textil, espesante, emulsificante y estabilizante en el área de alimentos, material de encapsulación en medicina, donde se aplican para inmovilizar células vivas y enzimas, y como agente encapsulante y transportador de activos en el sector farmacéutico y afines [101,103]. En la actualidad, su uso como material de pared en la tecnología de encapsulación ha incrementado considerablemente, lo cual se debe a sus características de biocompatibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad, no antigenicidad, bajo costo y a su reconocida capacidad para formar hidrogeles mediante reticulación con cationes multivalentes como Ca^{2+} , Cu^{2+} , Sr^{2+} , Al^{3+} , etc.[99,104]. Dentro de las sales de ácido algínico reconocidas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés de Food and Drug Administration) como seguras e inocuas se encuentran: el alginato de sodio, potasio, amonio y calcio; siendo este último el más usado en aplicaciones alimentarias o cosméticas debido a que el ion calcio es innato para el cuerpo humano. La obtención del gel se realiza usualmente a partir de alginato de sodio y una fuente externa de iones calcio. La gelificación ocurre en solución cuando los iones de sodio del alginato

son reemplazados por los iones de calcio de la solución salina (por ejemplo, CaCl_2) lo cual induce la reticulación, es decir, la formación de enlaces que unen cadenas adyacentes de polímero [105].

Se ha demostrado que la encapsulación con alginatos permite proteger a los compuestos encapsulados de factores adversos como calor, humedad y la influencia ácida del jugo gástrico, mejorando su estabilidad y biodisponibilidad; también la gelificación de alginatos por reticulación es una vía sencilla para generar cápsulas y perlas. Por estos motivos, Girón y colegas encapsularon β -caroteno en matrices de alginato de calcio reticuladas de manera homogénea y reportaron que el biopolímero evitó la degradación del núcleo y le concedió una mayor estabilidad química [106]. Por otro lado, Dadwaly y colaboradores microencapsularon compuestos fenólicos de limón poncil en mezclas de alginato de calcio reforzadas con otros polisacáridos a diferentes concentraciones, concluyendo que las microesferas de alginato-pectina presentaron un buen comportamiento de liberación controlada y tolerancia a las condiciones gastrointestinales [107]. Fathordoobady y colaboradores también emplearon alginato de calcio para microencapsular bioactivos, su estudio se basó en la encapsulación de betacianinas de las cáscara de la fruta del dragón rojo. Los autores documentaron que las microesferas de alginato presentaron potencial como vehículo de entrega, y que además, la vida media y la retención total de estos antioxidantes en las microperlas mejoró durante el almacenamiento, a diferencia de las betacianinas sin encapsular [108].

3. Justificación

El interés de la sociedad moderna por consumir productos naturales en lugar de productos procesados para mejorar su salud, involucra varios actores de la cadena de producción, desde el sector alimentario hasta el sector farmacéutico. En este último, se ha desarrollado una creciente preferencia por los nutraceuticos debida a la creencia de que al ser naturales exhiben menor toxicidad y efectos secundarios que los medicamentos tradicionales. Sumado a esto, la disponibilidad y el costo relativamente más económico de los agentes terapéuticos naturales contenidos en las plantas, los hace más atractivos en comparación con los fármacos. En este sentido, la alicina de ajo es un nutraceutico reconocido desde tiempos antiguos, es de fácil obtención y además posee propiedades terapéuticas potenciales. Sin embargo, su inestabilidad, volatilidad y reactividad constituyen una gran limitante para la formulación de productos efectivos. De tal manera que muchos de los nutraceuticos comerciales con alicina contienen menor porcentaje de principio activo que el reportado y no aportan todos los beneficios esperados por los consumidores.

Para hacer frente a tal problemática, se propone emplear la encapsulación con mucílago de nopal. Ya que éste es un biopolímero con propiedades gelificantes y ofrece una opción prometedora para estabilizar a la alicina. Además, el mucílago de nopal representa un agente encapsulante de fácil acceso y bajo costo porque es extraído del nopal verdura, una especie ampliamente cultivada en México. Aunado a esto, el mucílago también es un nutraceutico con actividad terapéutica reconocida, por lo cual, aparte de proteger a la alicina de factores externos y conferirle estabilidad, podría desarrollar un efecto sinérgico y potenciar las propiedades nutraceuticas de ambos compuestos.

Con el método de gelificación-precipitación se pretende superar el inconveniente de la degradación de la alicina causada en el secado por aspersion. Paralelamente, por sus condiciones de operación y funcionamiento, esta técnica constituye una opción muy conveniente ya que supone bajos requerimientos energéticos, bajo costo, alta eficiencia y no requiere solventes orgánicos, por lo cual podría considerarse un método verde.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar la estabilidad de alicina encapsulada en matrices poliméricas de mucílago de nopal/alginato mediante HPLC.

4.2 Objetivos específicos

- Definir las condiciones óptimas de encapsulación a las que se obtiene la mayor concentración de alicina estable utilizando un diseño de experimentos multifactorial.
- Evaluar la estabilidad de alicina encapsulada en función del tiempo, mediante análisis cromatográfico.
- Estudiar los cambios morfológicos y estructurales de los encapsulados usando técnicas analíticas de caracterización.

5. Metodología

En este apartado se describe la materia prima, reactivos, instrumentos, equipos y la metodología correspondiente a cada etapa del trabajo experimental. Tales etapas se presentan en el diagrama de flujo de la figura 9.

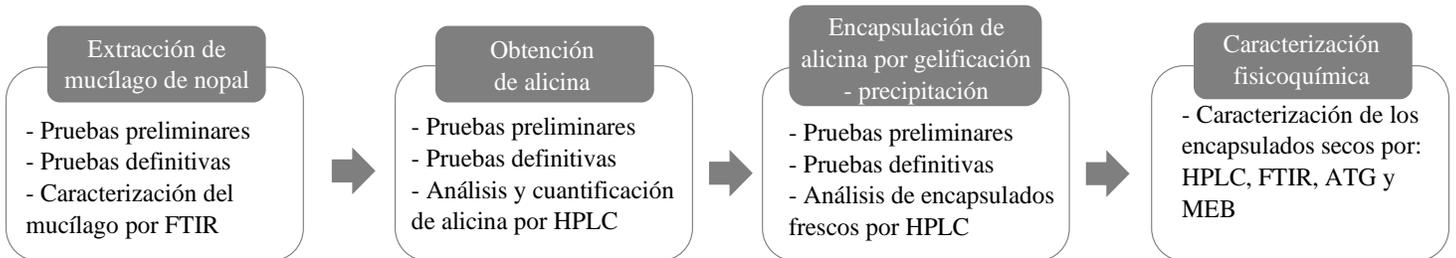


Figura 9. Representación esquemática de la metodología experimental y sus etapas.

Considerando que la meta del proyecto fue obtener encapsulados de alicina, en primer lugar se extrajo y caracterizó el material encapsulante, en este caso mucílago de nopal. A continuación, se procedió con la obtención de la alicina y, posteriormente dicha alicina fue encapsulada mediante gelificación–precipitación para dar lugar a los encapsulados o perlas. Finalmente los encapsulados de alicina fueron caracterizados mediante diversas técnicas.

5.1 Extracción del Mucílago de Nopal

• Materiales y reactivos

La materia prima para la obtención de mucílago fueron cladodios de nopal de la especie *Opuntia ficus-indica* (nopal verdura), los cuales fueron adquiridos en un supermercado local. Los reactivos utilizados fueron etanol grado industrial (96°) y agua destilada.

• Instrumentos y equipos

Se requirió cuchillo de acero inoxidable, tabla de cortar, vasos de precipitado, balanza digital, batidora de inmersión, parrillas de calentamiento con agitación magnética, termómetro de mercurio y digital, tamiz, pipetas, embudo, papel filtro, soporte universal, recipientes de aluminio, mortero de porcelana, centrífuga, refrigerador, horno eléctrico doméstico y horno de convección forzada.

5.1.1 Pruebas preliminares

La extracción del mucílago de nopal se realizó siguiendo cinco métodos diferentes con el fin de seleccionar el de mejores resultados y el más factible. Finalmente, ciertos parámetros del método elegido fueron adaptados a nivel de laboratorio, para dar lugar a la metodología de extracción definitiva.

1. Método A

Ensayo 1. La extracción del mucílago se realizó siguiendo el método reportado por Rodríguez y colaboradores con ligeras modificaciones [109]. Los cladodios de nopal fueron lavados con agua destilada y cortados en cubos de aproximadamente 1 cm^3 . Los cubos de nopal se depositaron en un vaso de precipitado de 1000 ml y con ayuda de la batidora de inmersión fueron molidos con agua destilada (en proporción 1:1 v/v) hasta obtener una mezcla homogénea. La mezcla fue sometida a baño María a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min y luego se dejó reposar durante 24 h a temperatura ambiente para que la porción vegetal precipitara. Posteriormente, el sobrenadante fue separado del sedimento vegetal utilizando pipetas y se colocó en un vaso de precipitado al cual se agregó etanol al 65 % v/v para que ocurriese la precipitación del mucílago. La mezcla anterior fue refrigerada a $6\text{ n}^{\circ}\text{C}$ durante 20 h. Transcurrido ese tiempo, el material resultante fue separado de la fase acuosa.

Ensayo 2. Se llevó a cabo la metodología antes descrita con ciertos cambios. En lugar de dejar reposar la mezcla para separar el sedimento vegetal de la fase acuosa, la mezcla fue llevada a centrifugación por 20 min a 3000 rpm. Por otro lado, la precipitación del mucílago se efectuó en relación 1:3 v/v (solución acuosa:etanol) en lugar de usar etanol al 65 % v/v, como se realizó en el Ensayo 1. Además, transcurrido el tiempo de refrigeración, la mezcla fue centrifugada por 5 min a 3000 rpm para facilitar la separación del material resultante de la solución acuosa. Finalmente, el material obtenido fue separado de la fase acuosa y se sometió a secado en un horno eléctrico convencional a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 4 h.

2. Método B

Esta metodología fue una adaptación de la propuesta por Contreras y colaboradores [110]. Los cladodios fueron lavados con agua destilada y cortados en cubos de aproximadamente 1 cm^3 para facilitar su trituración. Seguidamente fueron depositados en un vaso de precipitado de 1000 ml al cual se agregó agua destilada en proporción 1:2 (p/p). A continuación, se procedió a triturar con

ayuda de una batidora de inmersión hasta obtener una mezcla homogénea. La mezcla obtenida fue sometida a calentamiento en una parrilla a 50 °C durante 1 h bajo agitación constante. Finalizada la anterior operación, la mezcla fue filtrada con ayuda de un tamiz doméstico y a la parte acuosa se le adicionó etanol en relación 1:4 (v/v). Esta mezcla se dejó reposar durante 24 h en refrigeración a 6 °C, para que el mucílago precipitara. Transcurridas 24 h, el material resultante fue separado de la solución acuosa por medio de un tamiz doméstico y la porción sólida fue llevada a secar en un horno eléctrico convencional a 60 °C durante 4 h.

3. Método C

El siguiente procedimiento se basó en el método convencional de extracción acuosa. Se realizaron adaptaciones al procedimiento propuesto en el manual “Extracción y purificación de mucílago de nopal” publicado por el INIFAP [111]. Los cladodios fueron lavados con agua destilada y cortados en cubos de ~1 cm³. Los cubos se depositaron en un vaso de precipitado de 1000 ml y fueron macerados con agua destilada en relación 1:7 (p/p) por 24 h, en refrigeración a 6 °C. Acto seguido, la fase acuosa fue separada de la parte vegetal con un tamiz doméstico. A la solución acuosa se le adicionó etanol en proporción 1:4 (v/v), y se dejó reposar durante 24 h en refrigeración a 6 °C para precipitar el mucílago. Transcurridas las 24 h, el material obtenido fue separado de la fase acuosa con un tamiz doméstico y se secó en un horno eléctrico convencional a 70 °C por 3 h.

4. Método D

Se aplicó la metodología reportada por León-Martínez con leves cambios [112]. Los cladodios de nopal fueron lavados con agua destilada y cortados en cubos de 1 cm³. Los cubos de nopal fueron dispuestos en un vaso de precipitado de 200 ml, al cual se agregó agua destilada en una relación 1:2.5 p/p nopal-agua destilada. La mezcla fue calentada a 86 °C por 2.5 h bajo agitación. Luego, la solución acuosa de mucílago fue separada de los restos vegetales con ayuda de un tamiz doméstico. Posteriormente, la anterior solución se secó a 65 °C por 4 h en un horno eléctrico convencional.

5. Método E

Se siguió el procedimiento de extracción propuesto por Abraján-Villaseñor [113]. Los cladodios de nopal fueron lavados con agua destilada y cortados en cubos de 1 cm³. Los cubos de nopal fueron depositados en un vaso de precipitado de 250 ml, se les adicionó agua destilada en relación 1:1 p/p y fueron triturados usando una batidora de inmersión hasta obtener una mezcla homogénea.

La mezcla obtenida fue llevada a baño María a 80 °C por 5 min para escaldarla. Posteriormente, la mezcla se pasó a través de un filtro para café para remover el residuo vegetal. A la solución acuosa resultante se le agregó etanol en relación 1:3 v/v (solución acuosa:solvente) y se dejó reposar en refrigeración a 6 °C durante 24 h. Transcurrido el tiempo de refrigeración, la fase acuosa fue retirada del vaso de precipitado, usando pipetas, para que el material resultante quedara al fondo de este. El material sólido fue llevado a secar en un horno eléctrico convencional a 60 °C por 4 h.

5.1.2 Metodología seleccionada para la extracción de mucílago de nopal. Pruebas definitivas

En la presente metodología se efectuaron adaptaciones, a nivel de laboratorio, al mejor método de extracción del apartado anterior: método A – Ensayo 2. Los cladodios de nopal fueron lavados con agua destilada y cortados en cubos de aproximadamente 1 cm³. Los cubos de nopal se depositaron en un vaso de precipitado y con ayuda de la batidora de inmersión fueron molidos con agua destilada (en proporción 1:1 v/v) hasta obtener una mezcla homogénea. La mezcla fue sometida a baño María a 80 °C por 20 min y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 40 min. Seguidamente la mezcla fue llevada a centrifugar por 20 min a 2400 rpm para separar el resto vegetal de la fase acuosa. El sobrenadante fue pasado a través de papel filtro para remover cualquier porción vegetal presente y se depositó en un vaso de precipitado. A continuación, al sobrenadante se agregó etanol en relación 1:3 v/v (solución acuosa:etanol) para provocar la precipitación del mucílago y la mezcla fue refrigerada a 2 °C durante 20 h. Transcurrido ese tiempo, la mezcla fue llevada a centrifugar a 2400 rpm durante 5 min para facilitar la recolección del material resultante. Posteriormente, el mucílago fue separado de la fase líquida y se colocó en recipientes de aluminio para proceder a secarlo en el horno de convección forzada a 40 °C durante 4 h. Seguidamente, el mucílago seco fue molido en un mortero de porcelana hasta obtener un polvo fino y se pasó por un tamiz malla n° 100. Luego el mucílago en polvo fue pesado para posteriormente determinar su rendimiento mediante la siguiente ecuación:

$$R_m (\%) = \frac{w_{mp}}{w_c} \times 100 \quad \text{Ec.1}$$

donde, R_m = es el rendimiento del mucílago obtenido,

w_{mp} = es la masa del mucílago en polvo y

w_c = es la masa de los cladodios de nopal.

Finalmente, el mucílago en polvo se almacenó en un contenedor y fue dispuesto dentro de un desecador hasta su posterior uso.

5.1.3 Caracterización del mucílago de nopal por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Con el fin de identificar las señales características de mucílago de nopal, se tomó una muestra de 100 g, previamente pasados por malla #100 y se analizó por FTIR. El análisis fue realizado con un espectrofotómetro Frontier FT-IR/NIR de la serie 110711, en modo FTIR-ATR por lo cual no se requirió preparación de la muestra. El análisis se llevó a cabo en el rango de longitud de onda de 4000 a 450 cm^{-1} .

5.2 Extracción y encapsulación de alicina. Pruebas preliminares

Se realizó una serie de pruebas preliminares con el fin de determinar las condiciones adecuadas (concentración del extracto de ajo, formulación y cantidad del encapsulante, y concentración de la solución iónica) para la obtención de los encapsulados de alicina. En la tabla 2 se presentan las condiciones evaluadas en la etapa de pruebas preliminares.

Tabla 2. Condiciones evaluadas en las pruebas preliminares para la encapsulación de alicina.

	Composición del extracto de ajo (EA). ajo/agua destilada	Formulación del encapsulante	Gramos de encapsulante por cada 50 ml de EA	Solución iónica (g $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$/L agua destilada)
1.	50 g/100 ml	100 % MN	0.8	15,25,50,100,150,200
2.	50 g/70 ml	100 % MN	1.5	150
3.	50 g/50 ml	80 % MN, 20% AS	0.8	50,100,150,200
4.	50 g/50 ml	50 % MN, 50% AS	0.8	150
5.	50 g/50 ml	50 % MN, 50% AS	1.2	150
6.	50 g/50 ml	20 % MN, 80% AS	1.2	50
7.	50 g/50 ml	10 % MN, 90% AS	1.2	50

MN: mucílago de nopal, AS: alginato de sodio

La alicina, expresada como extracto de ajo se obtuvo siguiendo el método descrito por Jiang y colaboradores con ciertas modificaciones [114]. Los dientes de ajo fueron separados del bulbo, se les retiró la cáscara y se depositaron en un vaso de precipitado. Con ayuda de una batidora de

inmersión el ajo fue triturado en agua destilada durante 3 min. Se dejó que ocurriera la hidrólisis enzimática a temperatura ambiente durante 15 min y seguidamente la mezcla fue centrifugada a 2400 rpm por 10 min para separar el sólido residual de la fase líquida. Posteriormente, el sobrenadante obtenido fue filtrado al vacío y este constituyó el extracto de alicina.

En cuanto a la encapsulación, la metodología consistió en tres pasos:

- Preparación del encapsulante: el encapsulante en polvo fue disuelto en agua destilada.
- Mezcla bioactivo - encapsulante: la alicina, obtenida como extracto de ajo, fue incorporada gradualmente al encapsulante (previamente preparado) hasta obtener una mezcla homogénea.
- Gelificación–Precipitación: la mezcla bioactivo–encapsulante, fue extruida por goteo a través de una manguera de 4 mm de diámetro y con ayuda de la bomba peristáltica, sobre la solución iónica.

5.3 Diseño de experimentos

Con base en los resultados seleccionados de las pruebas preliminares, se aplicó un diseño de experimentos a fin de determinar la cantidad de tratamientos a realizar. Se variaron las condiciones en tres factores, cada uno con dos niveles, de manera que la experimentación siguió un diseño factorial 2^k , con $k = 3$ como se presenta en la Tabla 3, resultando un número de tratamientos igual a 8.

Tabla 3. Factores y niveles correspondientes al diseño de experimentos.

Factor	Unidad	Nivel 1	Nivel 2
Composición del extracto de ajo (C)	$\text{g}_{\text{ajo}}/\text{ml}_{\text{agua destilada}}$	$C_1:50/50$	$C_2: 70/50$
Formulación del encapsulante (E)	%	$E_1:80\% \text{ AS},20\% \text{ MN}$	$E_2:90\% \text{ AS},10\% \text{ MN}$
Diámetro de extrusión (D)	mm	$D_1: 4$	$D_2: 3$

MN: mucílago de nopal, AS: alginato de sodio. Cantidad de encapsulante usada: 1.2 g por cada 50 ml de extracto.

Tras realizar todas las posibles combinaciones de los tres factores, en dos niveles cada uno, se obtuvo la matriz del diseño de experimentos, la cual se muestra en la tabla 4. A cada uno de los tratamientos se les realizó una réplica.

Tabla 4. Matriz del diseño de experimentos.

Tratamiento (T)	Composición del extracto de ajo (C)	Formulación del encapsulante (E)	Diámetro de extrusión (D)	Réplica (R)
T_1	C_1	E_1	D_1	RT_1
T_2	C_1	E_1	D_2	RT_2
T_3	C_1	E_2	D_1	RT_3
T_4	C_1	E_2	D_2	RT_4
T_5	C_2	E_1	D_1	RT_5
T_6	C_2	E_1	D_2	RT_6
T_7	C_2	E_2	D_1	RT_7
T_8	C_2	E_2	D_2	RT_8

C_1, C_2, E_1, E_2 . Descritos en la Tabla 3.

Una vez obtenido el número de tratamientos por realizar se procedió a obtener la alicina y posteriormente a encapsularla.

5.4 Obtención de alicina

Considerando que la alicina es el principal compuesto bioactivo del ajo, la alicina a encapsular fue obtenida en forma de extracto de ajo.

- **Materiales y reactivos**

Con el fin de conseguir un extracto con la mayor concentración de alicina se utilizaron dos variedades de ajo (jaspeado y tigre), los cuales fueron obtenidos de campos experimentales de la Universidad Autónoma de Nuevo León en Linares. Para realizar la extracción únicamente se empleó agua destilada.

- **Instrumentos y equipos**

Se utilizaron vasos de precipitado, balanza digital, batidora de inmersión, centrífuga, bomba de vacío, embudo Büchner, matraz Kitasato y papel filtro.

5.4.1 Metodología experimental

Se seleccionó la extracción acuosa como el método más conveniente, ya que la extracción convencional con etanol requiere la posterior remoción del solvente mediante evaporación rotativa, lo cual podría degradar a la alicina. Además, la vida media de la alicina varía en dependencia del solvente con el que está en contacto [115]; por lo cual, la extracción en medio acuoso fue la más adecuada para evaluar la estabilidad del tiosulfonato por acción de la encapsulación.

La alicina en forma de extracto se obtuvo siguiendo el método descrito por Jiang y colegas con ciertas modificaciones [114]. Los dientes de ajo fueron separados del bulbo, se les retiró la cáscara y se depositaron en un vaso de precipitado. Con ayuda de una batidora de inmersión el ajo fue triturado en agua destilada durante 3 min. Se dejó que ocurriera la hidrólisis enzimática a temperatura ambiente durante 15 min y seguidamente la mezcla fue centrifugada a 2400 rpm por 10 min para separar el sólido residual de la fase líquida. Posteriormente, el sobrenadante obtenido fue filtrado al vacío y este constituyó el extracto de alicina.

5.4.2 Análisis de alicina en el extracto de ajo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Una vez obtenidos los extractos de ajo de las pruebas definitivas, y para evitar la degradación de la alicina, estos fueron analizados de inmediato por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés de High Performance Liquid Chromatography).

- **Materiales y reactivos**

Alicina (obtenida previamente), metanol grado HPLC, agua destilada grado HPLC, p-hidroxibenzoato de etilo ($C_9H_{10}O_3$) y ácido cítrico ($C_6H_8O_7$).

- **Instrumentos y equipos**

Se utilizaron matraces aforados, embudo Büchner, matraz Kitasato, jeringas desechables de 5 ml, micropipetas, filtros de membrana de nylon de 0.45 μ m, acrodiscos de nylon de 0.45 μ m, viales para HPLC, balanza analítica, bomba de vacío y baño ultrasónico. El análisis fue realizado en un equipo HPLC Agilent Technologies serie 1200 provisto de bomba cuaternaria, automuestreador, detector UV-Vis con arreglo de diodos (DAD) y columna Supelcosil LC-18 (150 x 4.6mm, 5 μ m).

- **Metodología para el análisis y cuantificación de alicina por HPLC.**

- **Preparación de la solución de estándar interno y solución de ácido cítrico**

Previo al análisis cromatográfico se procedió a preparar dos soluciones requeridas en la etapa de preparación de las muestras. Primero una solución de estándar interno de p-hidroxibenzoato de etilo, para lo cual se pesaron aproximadamente 0.53 g de etilparabeno y se colocaron en un matraz aforado de 1000 ml al cual se añadieron 500 ml de agua destilada. El matraz fue llevado a baño ultrasónico hasta disolver completamente el soluto y, posterior aforo con agua destilada. Adicionalmente, se preparó una solución de ácido cítrico 1mM. En este caso se pesaron aproximadamente 0.021 g de ácido cítrico y se aforó con agua destilada a un volumen de 100 ml.

- **Análisis por HPLC**

El análisis de alicina en los extractos se realizó por HPLC mediante el método descrito por Díaz y Jiménez [116]. Para preparar las muestras se tomaron 2 g del extracto de ajo, se añadieron a 30 g de solución de estándar interno de etilparabeno y esto se dejó reposar durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se tomó una alícuota de 2 ml de la anterior solución y se aforó con la solución de ácido cítrico a un volumen de 10 ml. Seguidamente se tomó 1 ml de la solución, se filtró con acrodisco y se dispuso en un vial de cromatografía listo para ser analizado.

Las condiciones de análisis fueron: volumen de inyección de muestra de 10 µl, fase móvil isocrática de Metanol:Agua (45:55 v/v) a flujo de 0.8 ml/min, temperatura de análisis de 25 °C y detección UV a 230 nm. Las fases móviles fueron filtradas a través de filtros de membrana de nylon de 0.45 µm y desgasificadas mediante baño ultrasónico antes de su uso. El análisis HPLC y la adquisición de datos se realizó usando el software Agilent ChemStation.

- **Cuantificación de alicina**

Posterior al análisis cromatográfico, el porcentaje de alicina presente en los extractos acuosos de ajo se determinó mediante la ecuación 2, propuesta por Suciu y colaboradores [46]:

$$\% A = \frac{S_1 m_2 * 22.75}{S_2 m_1} \quad \text{Ec.2}$$

donde, % A = porcentaje de alicina en el extracto,

S_1 = área del pico de la alicina en el cromatograma,

m_2 = cantidad de etilparabeno presente en la muestra inyectada,

S_2 = área del pico del etilparabeno en el cromatograma y

m_1 = cantidad de ajo presente en la muestra inyectada.

- Cálculo del factor de respuesta de alicina

Una vez obtenida la concentración de alicina en los extractos de ajo se procedió a calcular el factor de respuesta de este metabolito, el cual posteriormente permitió calcular la concentración de alicina en los encapsulados y en la solución iónica. El factor de respuesta entre dos analitos permite cuantificar la concentración desconocida de un analito en presencia de la concentración conocida de otro. Con el área del pico y la concentración del analito se calcula el factor de respuesta [117], como lo muestra la ecuación 3.

$$F_r = \frac{S_1}{\%A} \quad \text{Ec.3}$$

donde, F_r = factor de respuesta

S_1 = área del pico de la alicina en el cromatograma y

% A = porcentaje de alicina en el extracto.

5.5 Encapsulación de alicina por gelificación-precipitación

Mediante la técnica de gelificación-precipitación se encapsuló el extracto de ajo y se obtuvieron las perlas o esferas de alicina.

• Materiales y reactivos

Se empleó la alicina y el mucílago de nopal resultante de sus correspondientes etapas de extracción. Además, se requirió de alginato de sodio ($C_6H_8O_6$)_n, cloruro de calcio dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) y agua destilada.

- **Instrumentos y equipos**

Se usaron vasos de precipitado, varillas agitadoras de vidrio, soporte universal, manguera de 4 mm de diámetro, 2 boquillas de 3 mm de diámetro, tamiz de acero inoxidable malla n° 10 (2 mm de apertura), balanza analítica y bomba peristáltica Manostat SIMON marca Thermo Scientific.

5.5.1 Metodología experimental

La metodología de encapsulación fue la misma para todos los tratamientos. Primeramente, se montó el sistema de extrusión (Figura 10). Con ayuda de un soporte universal se colocó un extremo de la manguera, proveniente de la bomba peristáltica, a 7 cm de la superficie de la solución iónica, contenida en un vaso de precipitado. La preparación de la solución iónica consistió en disolver 7.5 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 150 ml de agua destilada. En los tratamientos con diámetros de extrusión D_2 se empleó una boquilla de 3 mm de diámetro a cada extremo de la manguera.

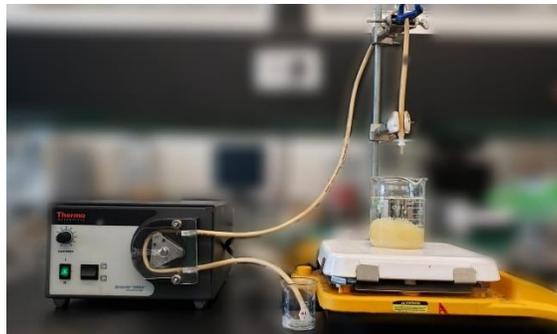


Figura 10. Sistema de extrusión.

Seguidamente se preparó el encapsulante. Con ayuda de un agitador de vidrio, 1.2 g del encapsulante a utilizar fueron integrados gradualmente en 5 ml de agua destilada hasta obtener un gel homogéneo. A continuación, 50 ml de la alicina obtenida en forma de extracto de ajo fueron incorporados rápidamente al gel encapsulante hasta lograr una solución homogénea, la cual fue llevada al sistema de extrusión.

Inmediatamente, el otro extremo de la manguera se depositó dentro de la mezcla bioactivo-encapsulante y el flujo de la bomba peristáltica fue ajustado a 0.3 ml/min. La mezcla fue extruida en forma de gotas sobre la solución iónica hasta obtener los encapsulados de alicina, los cuales se dejaron reposar en dicha solución durante 30 min.

Una vez transcurrido el tiempo de reposo y con ayuda de un tamiz de acero inoxidable, los encapsulados fueron separados de la solución iónica y se procedió a enjuagarlos tres veces con agua destilada. Posteriormente, se tomaron 0.3 g de encapsulados y se llevaron a análisis por HPLC (Sección 5.3.4); el resto de encapsulados se dejó secar sobre papel filtro durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, los encapsulados fueron almacenados en recipientes plásticos, dispuestos dentro de un desecador.

5.5.2 Análisis de alicina en los encapsulados frescos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Los encapsulados frescos, obtenidos en el apartado anterior, fueron analizados mediante HPLC. Para preparar las muestras se tomaron 0.3 g de encapsulados y, con ayuda de un mortero de porcelana, se disolvieron en 10 g de solución de etilparabeno. Seguidamente se aplicó la metodología descrita en la sección 5.4.2 para realizarles el análisis.

- Cuantificación de alicina

El porcentaje de alicina presente en los encapsulados se obtuvo empleando el factor de respuesta obtenido en la sección 5.4.3, como se muestra en la ecuación 4.

$$\%A_{ef} = \frac{S_1}{F_r} \quad \text{Ec.4}$$

donde, $\%A_{ef}$ = porcentaje de alicina presente en los encapsulados frescos,

S_1 = área del pico de la alicina en el cromatograma y

F_r = factor de respuesta

5.5.3 Análisis de alicina presente en la solución iónica por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Con el fin de determinar el porcentaje de alicina no encapsulada, se procedió a analizar la solución iónica por HPLC. Para preparar las muestras, 2 g de la solución iónica de CaCl_2 se añadieron a 10 g de solución de etilparabeno y se dejó reposar durante 30 min. Posteriormente se siguió la metodología descrita en la sección 5.4.2 para efectuar el análisis. Finalmente, para determinar el porcentaje de alicina presente en la solución iónica se empleó la ecuación 4 (sección 5.5.2).

5.6 Caracterización Físicoquímica de los encapsulados secos

En esta etapa se presentan los estudios físicoquímicos que dieron a conocer los cambios de concentración, cambios morfológicos y estructurales de los encapsulados de alicina. Los análisis se efectuaron a los encapsulados secos, es decir, habiendo transcurrido cierto tiempo desde su obtención.

5.6.1 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para conocer los cambios de concentración de alicina en los encapsulados secos se empleó HPLC. A cada tratamiento se le realizaron 2 análisis en diferentes tiempos, tal como se presenta en la tabla 5. El análisis y cuantificación de alicina se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en la sección 5.4.2; en este caso se dejó reposar las perlas secas en la solución de etilparabeno durante 5 min.

Tabla 5. Análisis por HPLC realizados a los encapsulados secos.

Tratamiento	1er análisis (días)	2do análisis (días)	Tratamiento	1er análisis (días)	2do análisis (días)
T_1	30	43	RT_1	15	29
T_2	22	36	RT_2	11	25
T_3	30	43	RT_3	15	29
T_4	22	36	RT_4	11	25
T_5	23	37	RT_5	14	28
T_6	20	34	RT_6	10	24
T_7	23	37	RT_7	14	28
T_8	16	30	RT_8	10	24

5.6.2 Análisis térmico gravimétrico (ATG)

Se analizaron aproximadamente 10 mg de encapsulados secos, en un equipo TA instruments modelo SDT Q600 que permitió la medición del cambio de peso en la muestra. El análisis se llevó a cabo empleando una velocidad de calentamiento de 5 °C/min, en un rango de temperatura de 25 °C– 600 °C en atmósfera de aire.

5.6.3 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los encapsulados fueron analizados con un espectrofotómetro Frontier FT-IR/NIR de la serie 110711, en modo FTIR-ATR por lo cual no se requirió preparación de la muestra. El análisis se llevó a cabo en el rango de longitud de onda de 4000 a 450 cm^{-1} y permitió conocer las bandas características de cada uno de los tratamientos.

5.6.4 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Con el fin de conocer la morfología de la superficie de los encapsulados, así como su análisis elemental, se utilizó la técnica analítica de MEB-EDS. El análisis se realizó en un microscopio electrónico de barrido marca PHILIPS, modelo XL30ESEM equipado con espectroscopía de dispersión de luz (EDS). Las condiciones de uso fueron voltaje de 20 keV, en modo de bajo vacío.

6. Resultados y discusión

6.1 Extracción de mucílago de nopal

6.1.1 Pruebas preliminares

A continuación, se presentan los resultados cualitativos obtenidos tras realizar la extracción del mucílago de nopal.

1. Método A

Ensayo 1. Transcurrido el tiempo de refrigeración, según lo propuesto por Rodríguez y col. [109], se esperaba que el etanol provocara la precipitación del mucílago de nopal. No obstante, se obtuvo una masa blanca flotante con aspecto gelatinoso sobre la solución acuosa (Figura 11). Una posible explicación a esta situación es que la insolubilización de los polímeros por parte del solvente no fue efectiva [113]. Esto podría significar que bajo las condiciones de extracción ensayadas, el mucílago se encuentra unido a restos de material vegetal u otros compuestos presentes en la solución, por lo cual se presentó de esa forma.



Figura 11. Resultados de la extracción con el método A. Ensayo 1.

Ensayo 2. Realizando los cambios mencionados en la metodología, los resultados obtenidos en este ensayo difirieron de los anteriores. Posterior al tiempo de refrigeración, se formó un precipitado de color blanco en el vaso de precipitado (Figura 12a), sugiriendo que se trataba de mucílago de nopal, ya que de acuerdo con la literatura consultada, la precipitación del mucílago de la fase acuosa ocurre tras la incorporación del solvente, el cual provoca la insolubilización de los polímeros [113]. El material blanco fue sometido a secado (Figura 12b); sin embargo, no se obtuvo un secado uniforme ya que los bordes del material se secaron mientras que el centro conservaba humedad (Figura 12c). Esto último pudo ser producto de la existencia de gradientes de temperatura presentes en el horno eléctrico empleado.



Figura 12. Resultados de la extracción con el método A. Ensayo 2: a) Mucílago precipitado, b) Mucílago previo al secado, c) Mucílago seco.

2. Método B

Los resultados obtenidos por esta vía fueron similares a los obtenidos en el ensayo 1, ya que tras la refrigeración se obtuvo material suspendido en lugar de material precipitado. En este caso, el material obtenido fue de color blanco verdoso, de consistencia gelatinosa y se presentó en forma de aglomerados (Figuras 13a y 13b). El material suspendido en la solución sugiere que la insolubilización de los polímeros por parte de etanol no se llevó a cabo [113]. Además, posterior a

la etapa de secado, el material se quemó, evidenciando que la atmósfera irregular de temperaturas presente en el horno eléctrico no era la adecuada para realizar esta operación. Es probable que se hayan presentado temperaturas mayores al punto de fusión de la muestra, provocando su degradación [118].

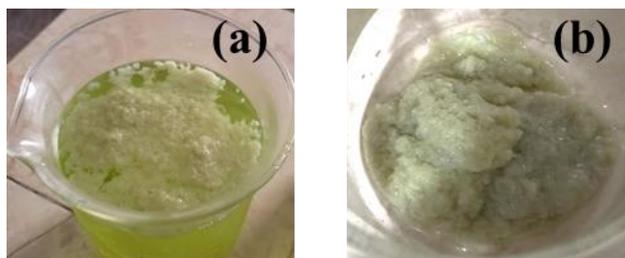


Figura 13. Resultados de la extracción con el método B. a) Material en suspensión, b) Material previo al secado.

3. Método C

La solución acuosa de mucílago de nopal, obtenida por la maceración del tejido vegetal, fue visiblemente más viscosa que las muestras anteriores. Por otro lado, tras la adición del alcohol etílico a la solución hidrocoloide, el material resultante presentó color blanco y aspecto gelatinoso. A diferencia de lo que se esperaba, el material no precipitó, manteniéndose en la superficie de la solución (Figura 14a). Una vez más, esto sugiere que el polímero pudo haber estado unido a otros compuestos, lo cual posiblemente evitó su precipitación [111]. En cuanto a la etapa de secado, esta logró concluirse sin inconvenientes, obteniéndose una muestra de color verde claro con tonalidades blancas (Figuras 14b y 14c); de acuerdo con Abraján-Villaseñor dicho color verde se debe a la presencia de células con alto contenido de clorofila [113].

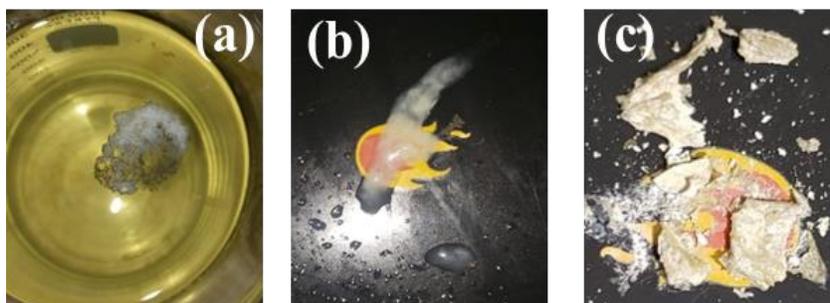


Figura 14. Resultados de la extracción con el método C. a) Material en suspensión, b) Material previo al secado, c) Material posterior al secado.

4. Método D

Tras la etapa de calentamiento, la solución acuosa de mucílago de nopal presentó una coloración café y poco viscosa (Figura 15a), lo cual sugiere que pudo haber iniciado un proceso de caramelización de azúcares en la solución acuosa de mucílago. Según Villalobos-Ruiz, la reacción de caramelización o pirólisis ocurre cuando los azúcares son calentados por encima de su punto de fusión, lo que descompone al polisacárido en sus monosacáridos. Esto hace que el material pierda sus propiedades iniciales, de ahí que ya no fuese viscoso sino líquido [118]. Además, posterior a la etapa de secado el material se caramelizó por completo y formó una película, la cual presentó color café brillante y al contacto con el agua adquirió una consistencia viscosa (Figura 15b). La recuperación del material seco no fue posible, ya que se adhirió fuertemente al recipiente donde fue depositado para su secado.

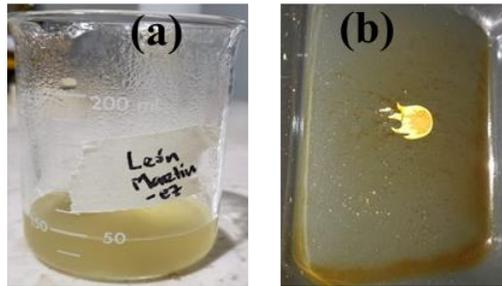


Figura 15. Resultados de la extracción con el método D. a) Solución acuosa de mucílago luego del calentamiento, b) Material caramelizado.

5. Método E

Transcurrido el tiempo de refrigeración, un material fino y de color blanco se depositó al fondo del vaso de precipitado (Figura 16a). Tal comportamiento de la muestra sugiere que el mucílago se separó claramente de la fase acuosa (se insolubilizó) gracias a la acción del alcohol etílico [113]. También se observó que la muestra adquirió un color café posterior al secado y se adhirió en forma de película al recipiente que la contenía (Figura 16b), dificultando su recuperación. Con base en el color, se dedujo que la muestra se había caramelizado y, por lo tanto, su degradación había ocurrido [118]. Este resultado se adjudicó, nuevamente, a las variaciones de temperatura dentro del horno.



Figura 16. Resultados de la extracción con el método E. a) Solución acuosa de mucílago luego del calentamiento, b) Material caramelizado.

6.1.2 Selección del método de extracción de mucílago de nopal. Pruebas definitivas

En la Tabla 6 se presenta un resumen de la información obtenida tras evaluar los cinco métodos de extracción de mucílago de nopal considerados. Se incluyen las condiciones de experimentación y parámetros de interés, como la precipitación del mucílago de nopal y su recuperación tras el secado (últimas dos columnas de la tabla).

Tabla 6. Métodos de extracción de mucílago evaluados.

		tmc (cm ³)	n:a	c (°C, min)	s:e (v/v)	T _R (°C)	t _r (h)	T _S (°C)	t _s (h)	pm	fr
M_A	E₁	1	1:1 v/v	80, 20 *	65%	16	20	-	-	No	-
	E₂	1	1:1 v/v	80, 20 *	1:3	16	20	40	4	Si	Si
M_B		1	1:2 p/p	50, 60	1:4	16	24	60	4	No	-
M_C		1	1:7 p/p	-	1:4	16	24	70	3	No	Si
M_D		1	1:2.5 p/p	86, 150	-	-	-	65	4	-	No
M_E		1	1:1 p/p	80, 5 *	1:3	16	24	60	4	Si	No

M: Método, E: Ensayo, tmc: Tamaño de cubo del nopal, n:a: Relación nopal: agua, c: Calentamiento (* baño María), s:e: Relación solución acuosa:etanol, T_R: Temperatura de refrigeración, t_r: Tiempo de refrigeración, T_S: Temperatura de secado, t_s: Tiempo de secado, pm: precipitación del mucílago, fr: facilidad de recuperación del material posterior al secado, - :no aplica.

Con base en la información de la tabla 6, se seleccionó el método A – Ensayo 2 como el procedimiento de extracción más conveniente para la obtención de mucílago de nopal. El método emplea condiciones de operación sencillas, uso moderado de reactivos, así como tiempos relativamente cortos de operación y de reposo. Además, con este método, a diferencia de los otros, fue posible replicar los resultados presentes en la literatura, en cuanto a la precipitación del mucílago tras la adición de etanol [109,110,111,113]; también fue posible recuperar el material

resultante posterior al secado. Puesto que la etapa de secado debía mejorarse se realizaron ligeras adaptaciones al método.

Una vez que el método A – Ensayo 2 fue adaptado a condiciones de laboratorio se obtuvo lo siguiente. Posterior al tiempo de refrigeración, se formó un precipitado de color blanco en el vaso de precipitado (Figura 17a), sugiriendo la presencia de mucílago de nopal, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura. La precipitación del mucílago de la fase acuosa ocurre tras la incorporación del solvente, el cual induce la insolubilización de los polímeros [113]. Tras la operación de centrifugado el material blanco fue recolectado con facilidad y se pudo apreciar con mayor claridad (Figura 17b). Dicho material fue sometido a secado y tras esta operación se obtuvo un material de color blanco con tonalidades beige (Figura 17c) el cual fue molido. Este tipo de tonalidades, presentes en mucílago de nopal que ha sido secado con aire caliente, pueden atribuirse a que el mucílago experimentó reacción de Maillard. Esta reacción se caracteriza por melanoidinas coloreadas que van desde amarillo claro hasta café muy oscuro (y en ocasiones negro) [119].



Figura 17. Resultados de la extracción del método definitivo. a) Mucílago precipitado, b) Mucílago previo al secado, c) Mucílago seco, d) Mucílago en polvo.

Concluida la etapa de molienda, se obtuvo un polvo fino de color blanco (Figura 17d) que constituyó el mucílago de nopal, y cuya apariencia fue similar al mucílago en polvo reportado en la literatura [111,119].

- Rendimiento del mucílago obtenido.

Se extrajo mucílago de nopal por lotes. Con el fin de trabajar con un polvo homogéneo, el mucílago obtenido de los diferentes lotes fue mezclado. Así, el rendimiento del mucílago fue obtenido con base en el lote final (el lote empleado para las pruebas posteriores).

El rendimiento del mucílago en polvo se determinó mediante la ecuación 1, obteniéndose un rendimiento promedio de 0.424 ± 0.02 % con base en peso fresco (cladodios sin espinas). Este valor es similar al reportado por ciertos autores para *Opuntia ficus-indica* [109,119]. El contenido de mucílago en los cladodios varía en dependencia de condiciones climáticas, como el frío y la lluvia, debido a la capacidad que presentan estos polisacáridos para absorber agua como un sistema de defensa de la planta frente a condiciones de estrés [86].

6.1.3 Caracterización del mucílago de nopal por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

El uso de esta técnica permitió identificar la presencia de los grupos funcionales característicos de mucílago de nopal. El espectrograma de infrarrojo correspondiente se muestra en la Figura 18. Se identificaron las mismas bandas de absorción reportadas en la literatura para mucílago de *Opuntia ficus-indica* [109,119,120]. En la región de 3500 a 3000 cm^{-1} se presenta la señal de estiramiento correspondiente a enlaces -OH asociados a los múltiples grupos hidroxilo de las moléculas que conforman este heteropolisacárido. La señal reportada en el intervalo de 3000 a 2875 cm^{-1} se atribuye al estiramiento C-H de grupos de piranosa, presente en la estructura del mucílago [120]. De 2200 a 2140 cm^{-1} se encuentra la señal de estiramiento para enlaces C-C . Alrededor de los 1720 cm^{-1} se identifican aldehídos característicos de los azúcares (arabinosa, ramnosa, galactosa y xilosa) que componen al mucílago. Por otro lado, la banda cercana a 1575 cm^{-1} se asocia con las vibraciones de estiramiento asimétricas del C=O de grupo carboxilos. En la región de la huella digital se observan señales intensas, comunes en este tipo de polisacáridos, como la señal alrededor de 1395 cm^{-1} atribuida al estiramiento simétrico del C=O de grupos carboxilos. Tales grupos carboxílicos forman parte de la estructura química del ácido urónico. Las bandas entre 1306 a 1037 cm^{-1} se asocian a vibraciones de estiramiento C-O-C con contribuciones de C-O-H y vibraciones de estiramiento C-C-H , del anillo de piranosa [121, 122]. Finalmente, la banda de absorción a 894 cm^{-1} indica la presencia de azúcares de configuración alfa.

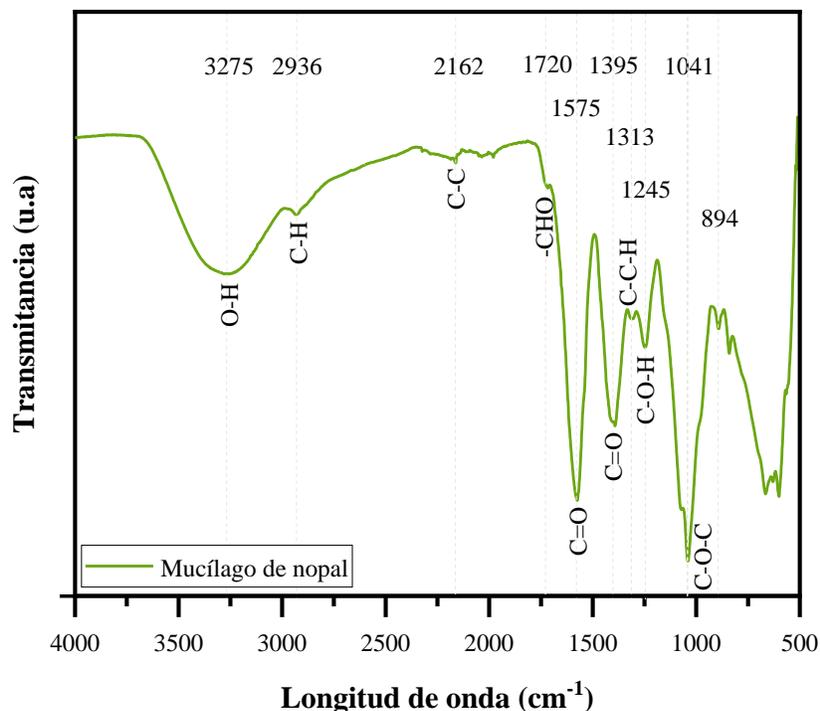


Figura 18. Espectro FTIR del mucílago de nopal en polvo

6.2 Extracción y encapsulación de alicina. Pruebas preliminares

Los resultados de estas pruebas se discuten en grupos, de acuerdo con las diferentes condiciones experimentales ensayadas. El Grupo a), corresponde a las condiciones de los ensayos 1, 2 y 3; el Grupo b) a los ensayos 4 y 5, y el grupo c) reúne los resultados de los ensayos 6 y 7 (Tabla 7).

Tabla 7. Condiciones evaluadas en las pruebas preliminares para la encapsulación de alicina. Grupos a, b y c.

	Composición del extracto de ajo (EA) ajo/agua destilada	Formulación del encapsulante	Gramos de encapsulante por cada 50 ml de EA	Solución iónica (g CaCl ₂ •H ₂ O/L agua destilada)
a)	1. 50 g/100 ml	100 % MN	0.8	15,25,50,100,150,200
	2. 50 g/70 ml	100 % MN	1.5	150
	3. 50 g/50 ml	80 % MN, 20% AS	0.8	50,100,150,200
b)	4. 50 g/50 ml	50 % MN, 50% AS	0.8	150
	5. 50 g/50 ml	50 % MN, 50% AS	1.2	150
c)	6. 50 g/50 ml	20 % MN, 80% AS	1.2	50
	7. 50 g/50 ml	10 % MN, 90% AS	1.2	50

MN: mucílago de nopal, AS: alginato de sodio

- **Grupo a**

Las pruebas de este grupo se caracterizaron por emplear un alto porcentaje (80-100 %) de mucílago de nopal como encapsulante. Los encapsulados obtenidos bajo estas condiciones no presentaron estabilidad. Al cabo de un minuto, las gotas (mezcla del extracto y del encapsulante) que caían en la solución iónica se deshacían en forma de hilos, platillos y velos (Figura 19), perdiendo completamente su forma transcurridos 10 min. Lo anterior podría atribuirse a la pureza del mucílago empleado, aunado a la ausencia de compuestos en el mucílago que promuevan una aglomeración fuerte, lo que facilita su disolución parcial o total y genera un hidrogel inestable [123].



Figura 19. Resultados de las pruebas preliminares. Grupo a.

- **Grupo b**

Considerando los resultados del grupo anterior, y las mejoras que pueden provocar las mezclas de biopolímeros en las propiedades fisicoquímicas de las dispersiones, se decidió usar partes iguales de mucílago de nopal y alginato de sodio para estas pruebas. Los resultados obtenidos presentaron mejoras en comparación con las pruebas del primer grupo. Al entrar en contacto la solución bioactivo-encapsulante con el baño gelificante, se obtuvieron masas de aspecto irregular (Figura 20) las cuales no perdieron su forma y además, precipitaron. No obstante, al separar los encapsulados de la solución iónica estos perdieron su forma inmediatamente. Lo anterior sugiere, al igual que en el caso de los ensayos del grupo a), que el mucílago de nopal carece de compuestos que permitan una aglomeración fuerte y que el porcentaje de alginato empleado no fue suficiente para lograr encapsulados estables.



Figura 20. Resultados de las pruebas preliminares. Grupo b.

- **Grupo c**

Tomando en cuenta que los encapsulados del grupo b) fueron más estables, en estas pruebas se incrementó el porcentaje de alginato de sodio en la formulación del encapsulante. Los productos de estos experimentos fueron encapsulados esféricos (Figura 21) que mantuvieron su forma aún luego de separarlos de la solución iónica. Al tratarse de formulaciones con alto contenido de alginato como material de pared, la estabilidad de las perlas obtenidas confirma la capacidad encapsulante que posee este hidrocoloide [99, 101]. Por lo anterior, se determinó este par de condiciones como las adecuadas para realizar el diseño de experimentos del presente trabajo de investigación.



Figura 21. Resultados de las pruebas preliminares. Grupo c.

6.3 Análisis de alicina en los extractos de ajo por HPLC

En la figura 22 se presentan los cromatogramas obtenidos de los extractos de ajo de cada uno de los tratamientos establecidos en el diseño de experimentos (sección 5.3). Las señales previas a los 4 min suelen asociarse a compuestos azufrados con menor actividad biológica y a la aliina restante que no terminó de transformarse [124]. Por otro lado, la alicina fue identificada a un tiempo de

retención de aproximadamente 5 min para todos los tratamientos. Finalmente, el pico de mayor intensidad (cercano a 7 min) corresponde al estándar interno (etilparabeno). El orden de elución, con alicina eluyendo antes que el estándar interno, coincidió con lo reportado en la literatura [116,125].

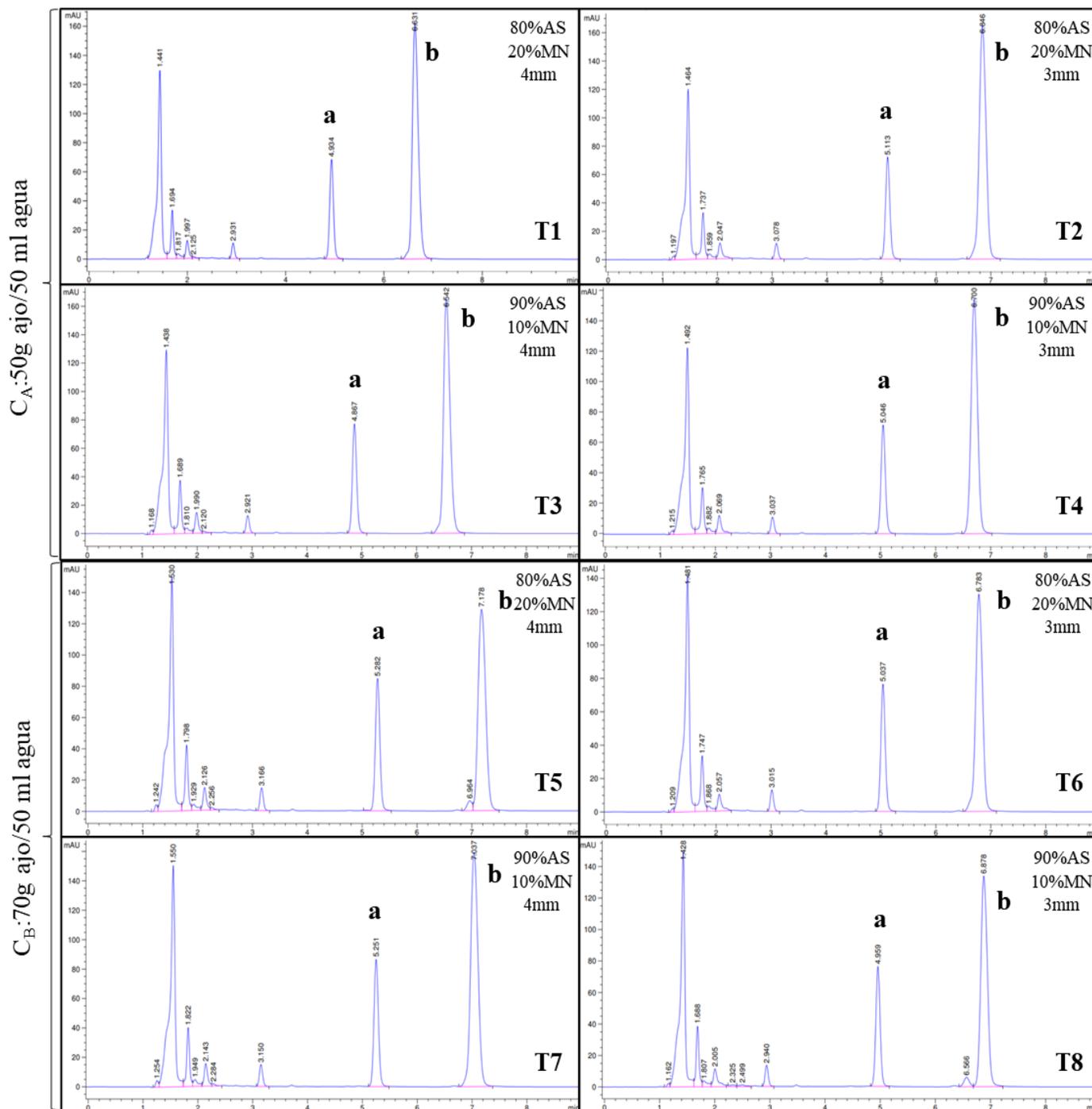


Figura 22. Cromatogramas de los extractos de ajo de los tratamientos.
a) Alicina, b) etilparabeno.

Perfiles cromatográficos similares fueron obtenidos para las réplicas de los tratamientos de los extractos de ajo (Ver Anexos A).

A partir del análisis cromatográfico se cuantificó la alicina presente en los extractos. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Porcentaje de alicina presente en los extractos de ajo.

	Tratamiento	% Alicina
C_A	T1	0.1046
	T2	0.1044
	T3	0.1007
	T4	0.1165
C_B	T5	0.1186
	T6	0.1218
	T7	0.1084
	T8	0.1256

Si bien se obtuvieron extractos de ajo con porcentajes de alicina similares, se detectó que el porcentaje promedio de alicina en los extractos de composición B (70 g ajo/50 ml agua) que corresponde a los tratamientos T5-T8 fue ligeramente mayor (0.1186 %) que en los extractos de composición A (50 g ajo/50 ml agua) que fue de 0.1065 % en promedio.

6.4 Análisis de alicina en los encapsulados frescos por HPLC



Figura 23. Encapsulados frescos de extracto de ajo.

Obtenidas las perlas (Figura 23) se analizó y cuantificó el contenido de alicina en estas. En la figura 24 se muestran los cromatogramas obtenidos para cada uno de los tratamientos. Las señales cercanas a tiempos de retención de 5 min se atribuyeron a la alicina. Por otro lado, las señales intensas alrededor de los 7 min se asociaron al estándar interno de etilparabeno [116,125].

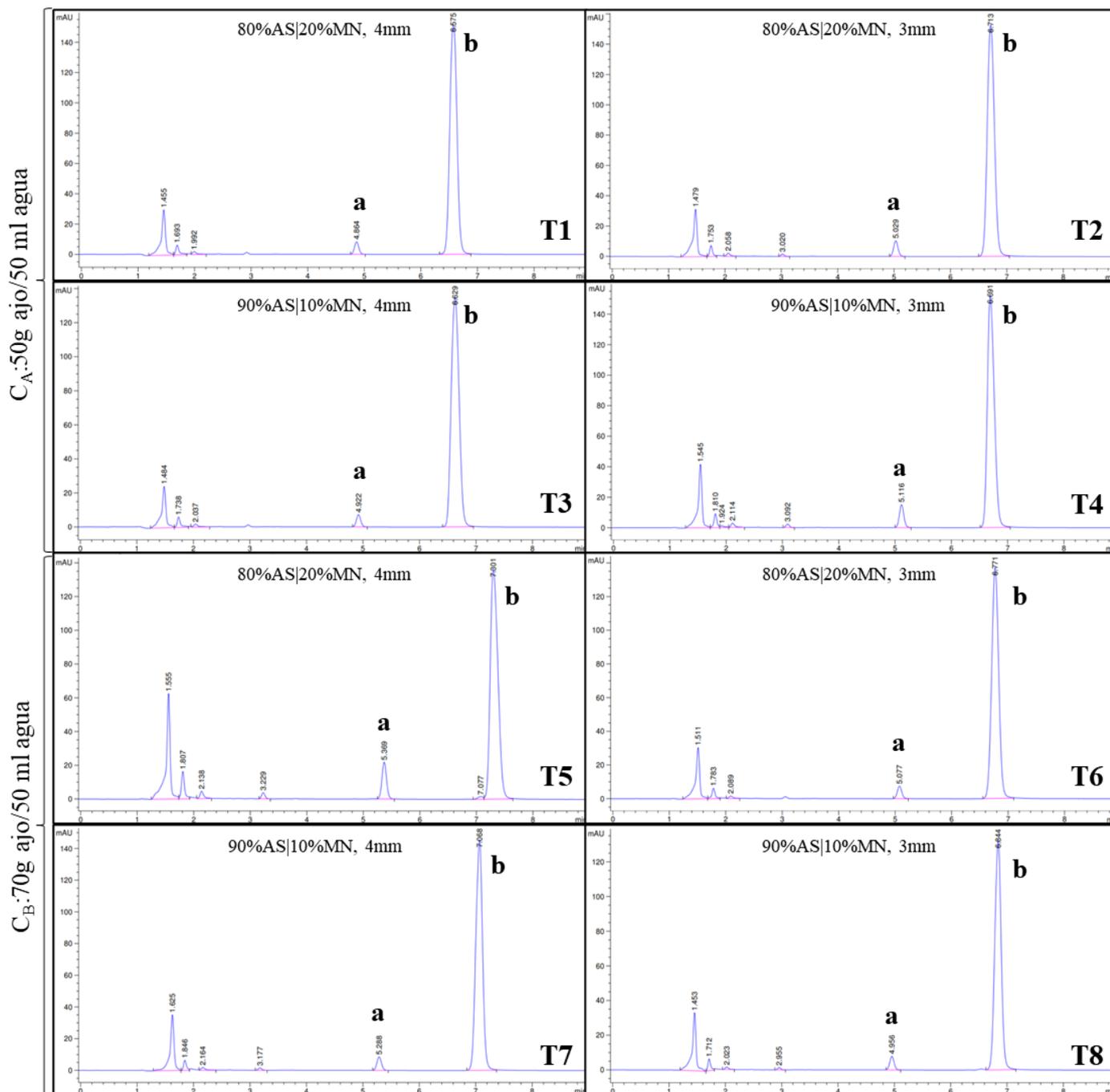


Figura 24. Cromatogramas de los encapsulados frescos. a) Alicina, b) etilparabeno.

Para las réplicas de los tratamientos de los encapsulados de alicina, se observaron perfiles cromatográficos similares (Ver Anexos A).

Para realizar la cuantificación de alicina en las perlas frescas se calculó el factor de respuesta del metabolito de acuerdo con la ecuación del apartado 5.4.2. Se obtuvo que el factor de respuesta promedio resultó de: $F_r = 3657$. Los resultados obtenidos tras cuantificar la alicina de los encapsulados frescos se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Porcentaje de alicina presente en los encapsulados frescos.

	Tratamiento	% Alicina
C_A	T1	0.01283
	T2	0.01563
	T3	0.00978
	T4	0.02291
C_B	T5	0.02742
	T6	0.01136
	T7	0.01695
	T8	0.01167

Considerando la concentración de alicina determinada en los encapsulados (Tabla 9) y en los extractos (Tabla 8), fue posible calcular la eficiencia de encapsulación. Se determinó que, en promedio, la eficiencia de encapsulación del bioactivo varió del 10 al 27 %. Es bien sabido que la eficiencia de encapsulación depende tanto del material encapsulante como de la naturaleza del principio activo a encapsular [126]. Así, es posible encontrar reportes con eficiencias de encapsulación que van del 45 al 75 % [127], también se tienen estudios en los que el porcentaje de encapsulación es del orden del 14 al 27 % [128]. Sin embargo, de acuerdo con el objetivo de la tesis, es más importante determinar cuánto logra mantenerse esta concentración en los encapsulados a lo largo del tiempo.

El bajo valor de encapsulación pudo deberse a varias razones, entre las que se analizan cuatro: i) que la alicina se perdió por degradación durante el proceso de encapsulación, ii) que parte de la alicina se quedó en la solución iónica, iii) que la alicina se perdió durante la etapa de lavado de las cápsulas, iv) que se requiriese más tiempo durante la formación de los encapsulados.

Considerando que el método de encapsulación no involucró procesos térmicos (que degradasen a la molécula) y que se realizó en tiempos ≤ 10 min (reducida exposición de la alicina al ambiente), se descarta la pérdida del metabolito por degradación química.

Con el objetivo de determinar si parte de la alicina quedó disuelta en la solución iónica, se realizó análisis cromatográfico a alícuotas de la solución iónica de cada tratamiento. En la figura 25 se presentan los cromatogramas obtenidos.

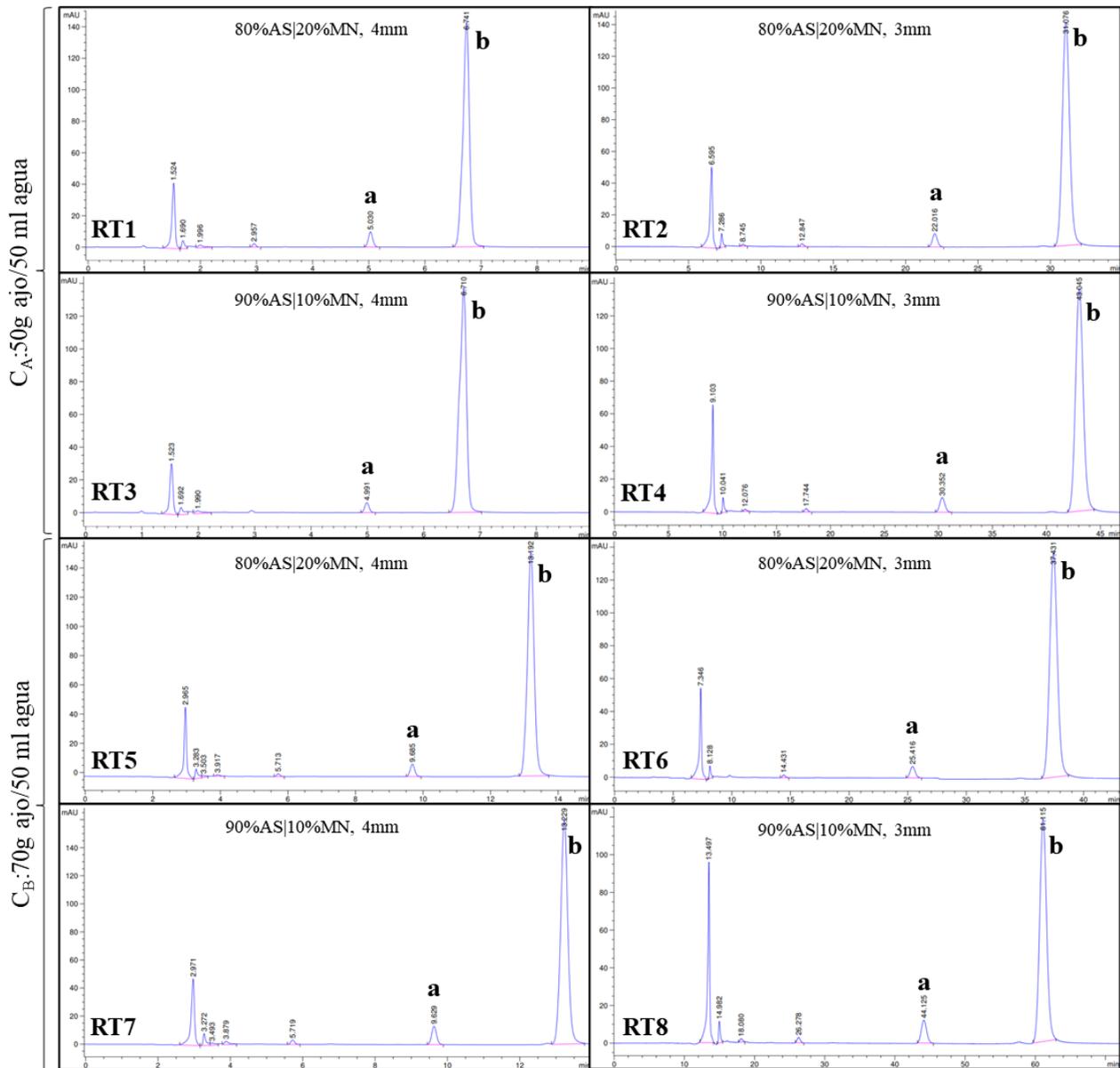


Figura 25. Cromatogramas de la solución iónica de los tratamientos. a) Alicina, b) etilparabeno.

Cromatogramas similares se obtuvieron tras analizar las soluciones iónicas de las réplicas de los tratamientos (Ver Anexos A).

La cuantificación de alicina en la solución iónica (Tabla 10) se realizó para identificar si parte de la alicina no encapsulada se quedó en ella. Se encontró que la cantidad de alicina presente en la solución iónica, tras haber retirado las perlas, fue del 10 al 47 % de la alicina cuantificada en los extractos. Que las perlas reposaran en la solución iónica por un tiempo menor al necesario pudo influir en la difusión de iones calcio a través del encapsulado, lo cual interfirió en su solidificación y por ende, facilitó que moléculas de alicina presentes en las superficies de las gotas y que no fueron captadas durante la reticulación, quedaran en la solución iónica.

Tabla 10. Porcentaje de alicina presente en la solución iónica.

	Tratamiento	% Alicina
C_A	T1	0.0122
	T2	0.0326
	T3	0.0112
	T4	0.0471
C_B	T5	0.0178
	T6	0.0360
	T7	0.0245
	T8	0.0109

Por otro lado, tomando en cuenta que la cantidad de alicina en los encapsulados estuvo en el intervalo del 10 al 27 % de la alicina contenida en los extractos, es evidente que también hubo otras pérdidas del metabolito, las cuales pudieron ocurrir durante la etapa de lavado de las perlas. A su vez, el bajo porcentaje de alicina en las perlas pudo deberse a que estas requiriesen mayor tiempo de reposo en la solución iónica, el cual permitiese una mejor solidificación del encapsulado, y evitase que moléculas de alicina dispersas en la periferia de las gotas fueran removidas durante el lavado. Inclusive, se tomó en cuenta que restos de extracto-encapsulante que quedaron en las paredes del contenedor de la mezcla y la manguera extrusora durante la encapsulación, también influyeron en la eficiencia de encapsulación.

6.5 Estudio de la estabilidad de alicina en los encapsulados por HPLC

- **Primer análisis**

Los cromatogramas obtenidos tras efectuar el primer análisis a los encapsulados secos se muestran en la figura 26. Cada uno de los análisis contiene en la parte superior derecha la indicación del tiempo al que se realizó el análisis (p. ej. 30D: 30 días). En los cromatogramas del lado derecho de la figura 26 no se observaron picos de alicina, lo que indicó la degradación total de la molécula en los encapsulados o bien cantidades por debajo del límite de detección del equipo. Por otro lado, en los cromatogramas del lado izquierdo de la figura se identificaron señales para alicina con áreas menores a las obtenidas en los encapsulados frescos, lo cual sugirió pérdidas del tiosulfonato en las perlas. Tales pérdidas coincidieron con la aparición de picos intensos a tiempos de retención entre 2-3 min, los cuales se asocian a los principales compuestos azufrados (sulfuros de dialilo, ajoenos y vinilditiinas) que resultan tras degradarse la alicina [30,124]. Factores que afectan la estabilidad de la alicina son: la temperatura, el pH, el vacío, la luz entre otros [31].

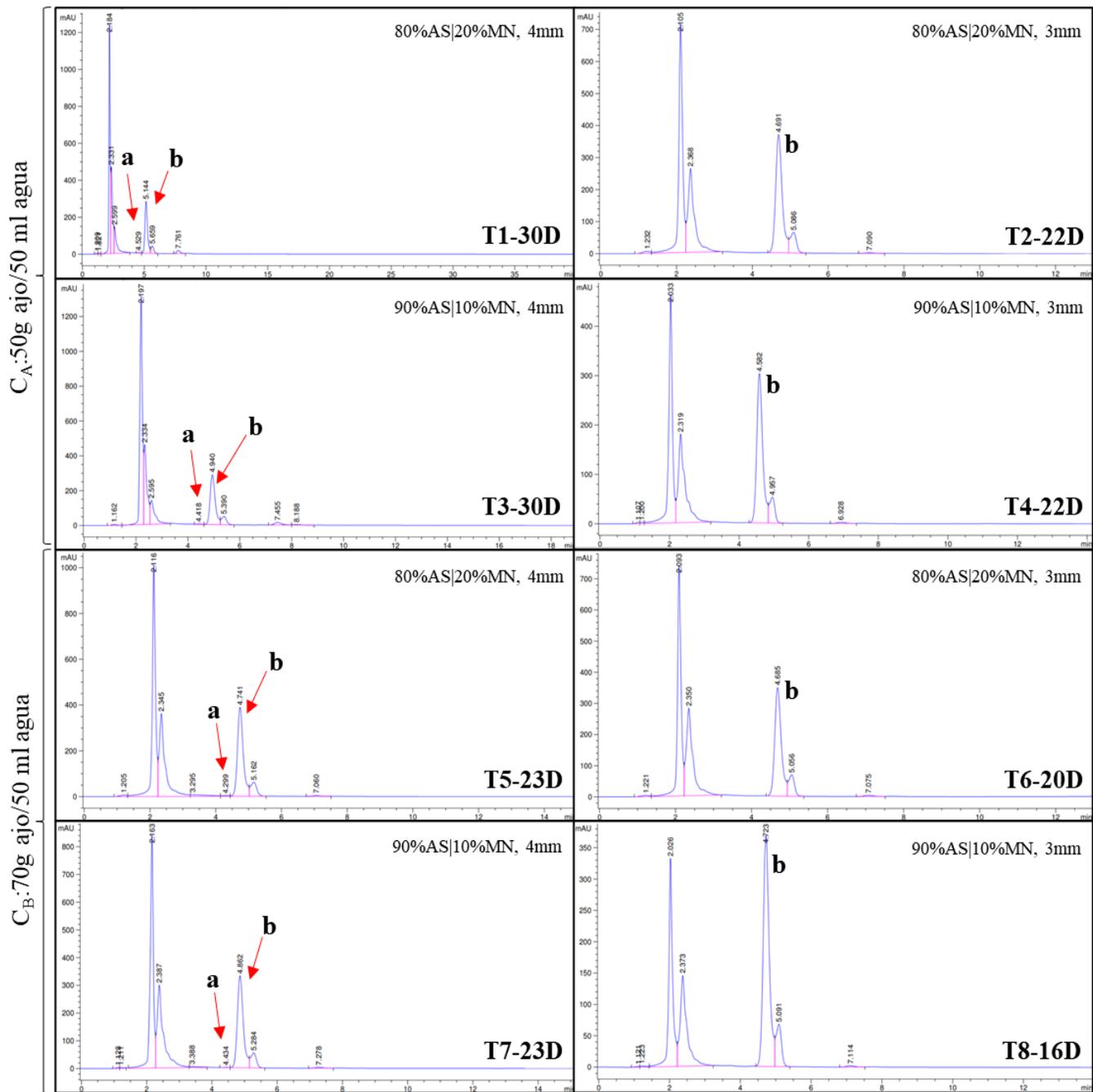


Figura 26. Cromatogramas de los encapsulados secos. Primer análisis.
a) Alicina, b) etilparabeno.

En la tabla 11 se muestran los datos de alicina presente en las microesferas secas y el porcentaje de degradación que ocurrió en cada tratamiento. Al cabo de un mes, en los encapsulados de T1 y T3 (ambos de composición A) se registró una degradación de alicina de 22 ± 2 %, lo cual sugiere que la matriz de alginato-mucílago fue estructuralmente funcional y preservó el contenido de alicina relativamente estable. Por otro lado, transcurridas 3 semanas las perlas de los tratamientos T5 y T7

(ambos de composición B) experimentaron el triple de degradación que T1 y T3. La alicina permaneció estable en los tratamientos de composición A (50 g ajo/50 ml de agua destilada) pero se degradó en mayor medida en los encapsulados de composición B (70 g ajo/50 ml de agua destilada), lo cual indicó que extractos de ajo más concentrados requieren mayor cantidad de encapsulante a fin de aumentar la protección del bioactivo (alicina) en el tiempo. En los tratamientos T2, T4, T5 y T6 un guion medio indica la ausencia de alicina.

Tabla 11. Porcentaje de alicina en los encapsulados secos. Primer análisis.

Tratamiento	% Alicina	%Degradación de alicina
T1-30D	0.009653	21.08
T2-22D	-	-
T3-30D	0.008057	24.27
T4-22D	-	-
T5-23D	0.01359	60.35
T6-20D	-	-
T7-23D	0.003632	72.77
T8-16D	-	-

En la figura 27 se presentan los cromatogramas de las réplicas de los tratamientos. La falta de picos indicativos de alicina en los encapsulados de RT3 y RT5 denotó que esta se encontraba en cantidades reducidas o se había degradado por completo. La intensidad de las primeras señales que aparecen en los cromatogramas sustentan la idea anterior; tales señales suelen asociarse a los compuestos de organoazufre producto de la degradación del tiosulfonato de dialilo [30,124]. Al ser más intensas estas señales que las que de la alicina, se dedujo que había mayor cantidad de compuestos de azufre distintos a la alicina.

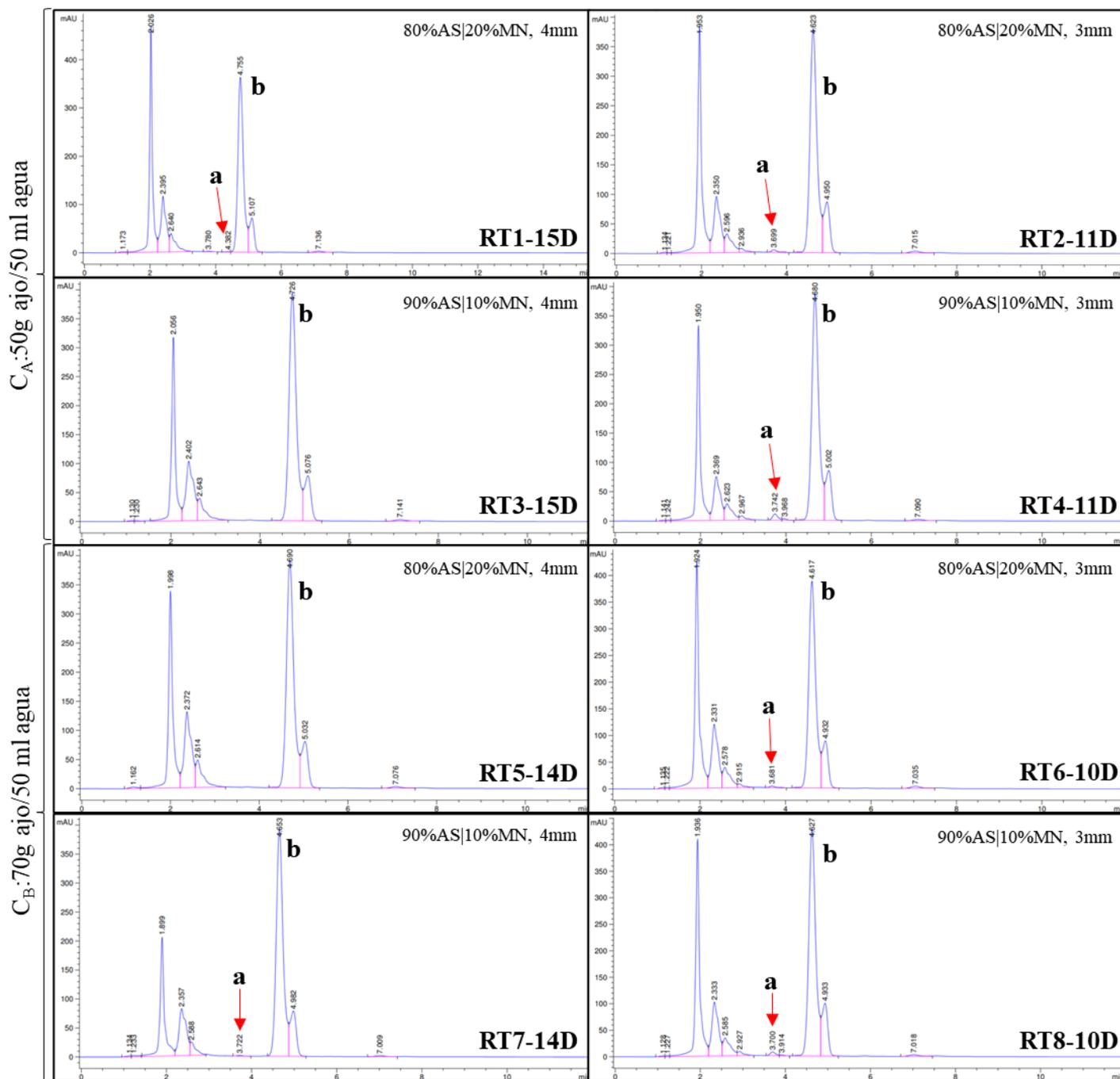


Figura 27. Cromatogramas de los encapsulados secos. Réplicas. Primer análisis.
a) Alicina, b) etilparabeno.

La tabla 12 presenta el contenido de alicina en las perlas de las réplicas. En este caso los encapsulados secos fueron analizados aproximadamente dos semanas posteriores a su obtención. Se encontró que la alicina se había degradado en un 81 ± 4 % en la mayoría de los encapsulados, lo cual se adjudicó a la naturaleza susceptible de la molécula de alicina a degradarse por la presencia

de oxígeno y luz [51]. Aunado a lo anterior, se observó que la protección del bioactivo fue más limitada en los encapsulados de composición B (70 g ajo/50 ml agua) ya que en estos la degradación de alicina fue mayor que para los encapsulados de composición A (50 g ajo/50 ml agua), sugiriendo que la dosis de encapsulante para extractos de ajo de mayor concentración debería de ser superior. Por otro lado, si bien en estos encapsulados (réplicas) la degradación de alicina ocurrió en menor tiempo, la matriz de alginato-mucílago demostró potencial encapsulante ya que la alicina presentó mayor estabilidad que en el ajo recién triturado [4] y exhibió una vida media superior a la alicina estabilizada mediante soluciones hidroalcohólicas [32].

Tabla 12. Porcentaje de alicina en las réplicas de encapsulados secos. Primer análisis.

Tratamiento	% Alicina	%Degradación de alicina
RT1-15D	0.002471	81.60
RT2-11D	0.01235	82.87
RT3-15D	-	-
RT4-11D	0.02556	77.59
RT5-14D	-	-
RT6-10D	0.008225	99.14
RT7-14D	0.002961	85.59
RT8-10D	0.01709	83.38

- **Segundo análisis**

En el segundo monitoreo se observaron picos de alicina únicamente en los cromatogramas de los encapsulados de T1 y T3, ambos analizados al mes y medio. Se infirió que los encapsulados de los demás tratamientos no contenían alicina, sino productos azufrados resultantes de su degradación, razón por la cual en la mayoría de los cromatogramas aparecieron señales intensas previas a los 4 min, corroborando la existencia de estos compuestos (Figura 28). Que tras 43 días el tiosulfonato de dialilo no se hubiese degradado totalmente en perlas de composición A (T1 y T3) dejó de manifiesto que la red biopolimérica de alginato-mucílago, en las cantidades empleadas, exhibió mayor protección del bioactivo cuando los extractos se obtuvieron en relación 1:1 ajo:agua, y por ende, había una menor carga de alicina en el extracto.

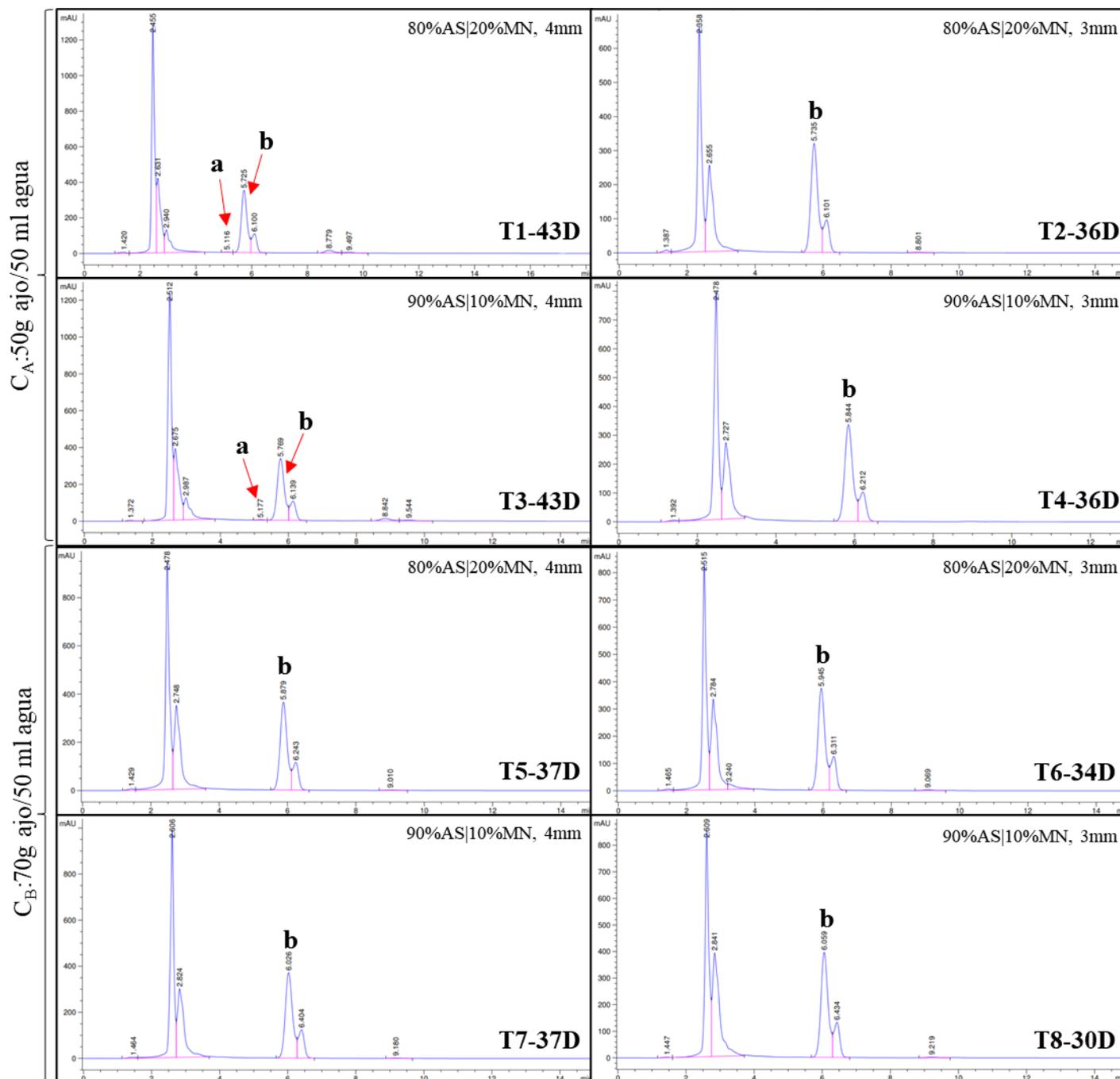


Figura 28. Cromatogramas de los encapsulados secos. Segundo análisis.
 a) Alicina, b) etilparabeno.

Los porcentajes de alicina presente en los encapsulados tras 43 días de almacenamiento se presentan en la tabla 13. Al comparar estos datos con los del análisis previo, se encontró que en 13 días los encapsulados T1 experimentaron una degradación de alicina de apenas 4 % y casi el 75 % de la alicina encapsulada inicialmente permanecía en las perlas; siendo estos encapsulados los que preservaron el mayor porcentaje de alicina estable. Por otro lado, los encapsulados T3 conservaban

aproximadamente el 60 % de la alicina que había sido cuantificada en las perlas frescas; pasados 13 días, en estos encapsulados la alicina se había degradado en un 40 %. En ambos casos la pérdida de alicina durante el almacenamiento fue baja (Figura 29), lo cual propone que el sistema de encapsulamiento alginato-mucílago posee potencial para mantener estable a la alicina.

Tabla 13. Porcentaje de alicina en los encapsulados secos. Segundo análisis.

Tratamiento	% Alicina	%Degradación de alicina
T1-43D	0.009142	25.26
T3-43D	0.006419	39.66

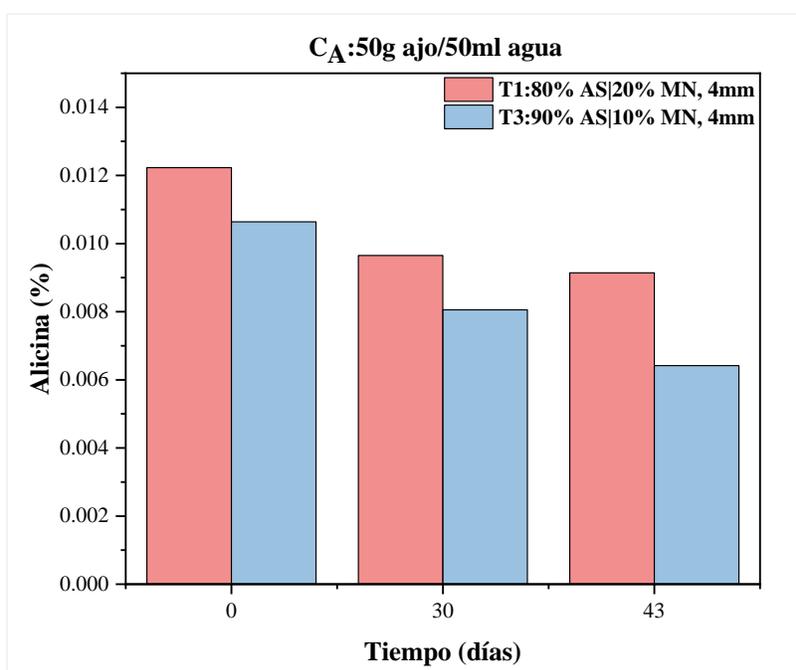


Figura 29. Estabilidad de la alicina en el tiempo. Encapsulados de los encapsulados T1 y T3.

Por otra parte, los resultados de los análisis HPLC obtenidos tras el segundo análisis se presentan en la Figura 30. Se observó que solo los encapsulados del tratamiento RT6 conservaban alicina en su estructura. Para el resto de encapsulados, la degradación de la alicina se manifestó con señales intensas previas a 4 min, las cuales se relacionan a compuestos orgánicos de azufre que aparecen cuando la alicina se degrada [30,124]. Transcurridos 24 días de almacenamiento, el porcentaje de alicina en los encapsulados de RT6 resultó de 0.004144, con una degradación del 99.56 %. Respecto al primer análisis, el contenido del tiosulfonato de dialilo en las perlas permaneció prácticamente estable pues las pérdidas registradas fueron de 0.4266 %. Lo anterior reafirma que

la matriz encapsulante de alginato-mucílago tiene la capacidad de brindar estabilidad a la molécula de alicina.

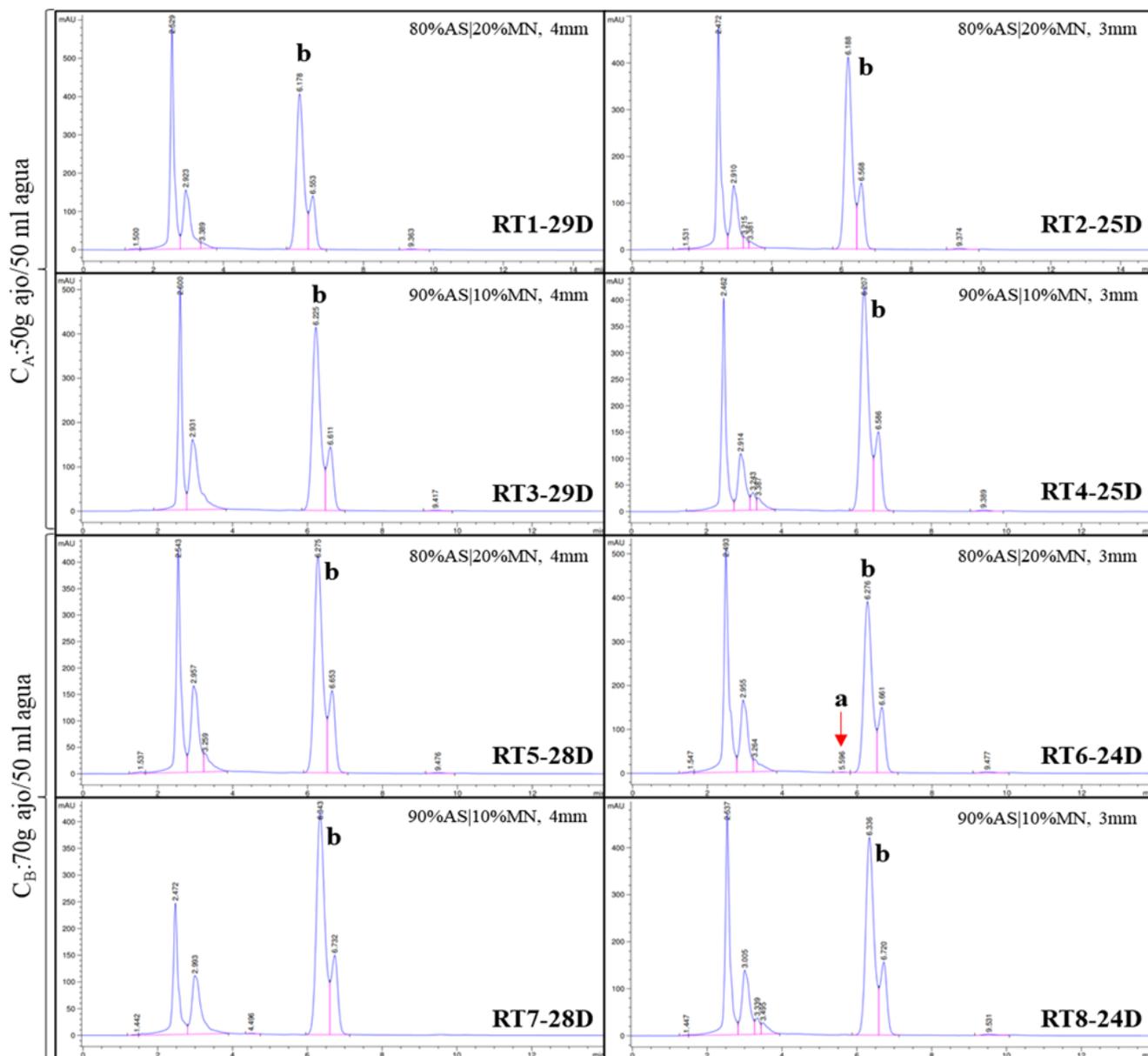


Figura 30. Cromatogramas de los encapsulados secos. Réplicas. Segundo análisis.
a) Alicina, b) etilparabeno.

6.6 Caracterización fisicoquímica de los encapsulados secos

6.6.1 Análisis térmico gravimétrico (ATG)

Los resultados de estos análisis permitieron registrar la pérdida de peso que experimentaron los encapsulados durante el calentamiento. En la figura 31 se pueden apreciar los termogramas ATG

de los primeros ocho tratamientos y del alginato de sodio. En cuanto a este último, se observó que su degradación térmica ocurrió en cuatro etapas, lo que a su vez coincidió con lo reportado en la literatura para sistemas basados en alginatos [104]. En la primera etapa (26-184 °C) se llevó a cabo la pérdida del agua ligada físicamente al alginato, lo cual se tradujo en pérdidas cercanas al 15 % en peso. La segunda etapa (184-228 °C) registró pérdidas en peso de alrededor del 17 %, las cuales se asociaron a la liberación del agua unida químicamente a grupos hidroxilo y carboxilo; tal liberación cesa la reticulación y provoca el colapso de la red de hidrogel, sin embargo, no degrada a las cadenas de polímero. En la tercera etapa (228-286 °C) ocurrió la degradación de las cadenas poliméricas que constituían la estructura hidrocarbonada del alginato, dando lugar a la formación de material carbonáceo (principalmente oligómeros y monómeros). Durante la última etapa (286-548 °C) los residuos carbonosos producto de la tercera etapa experimentaron degradación. Pérdidas en peso de aproximadamente 15 % fueron identificadas durante las dos últimas etapas.

Por otro lado, al comparar las curvas ATG de los diferentes tratamientos se observó que estas siguieron un patrón similar. La pérdida de peso se llevó a cabo en tres etapas, lo cual coincidió con lo reportado en la literatura para ATG de extractos de ajo encapsulado [51,60]. En la etapa I, entre 26 a 170 °C, se registraron pérdidas cercanas al 8.5 % en peso las cuales se asociaron a la evaporación de las moléculas de agua de las perlas y a compuestos volátiles del extracto de ajo (alicina y otros compuestos azufrados) presentes en la superficie de los encapsulados. Por otro lado, en la etapa II, entre aproximadamente 170 a 500 °C, se presentó la mayor pérdida de porcentaje en peso (48-54 %). En esta etapa, las pérdidas se adjudicaron a la descomposición de los carbohidratos, proteínas y otros componentes de la matriz alginato-mucílago, que generan residuos carbonizados. Aquí también ocurre la degradación de los compuestos de ajo que quedaron desprotegidos. Durante la etapa III, hasta los 600 °C, se produjeron pérdidas cercanas al 16 % en peso las cuales se atribuyeron a la degradación de compuestos inorgánicos contenidos en el extracto de ajo [59]. Los encapsulados fueron térmicamente estables hasta aproximadamente 170 °C, que representó la temperatura máxima a la que el complejo alginato-mucílago mantuvo protegidos a los compuestos termosensibles del extracto de ajo (alicina y otros organosulfurados).

La figura 31 permitió identificar que, si bien en el rango de temperatura de 180-500 °C tanto los tratamientos como el alginato presentaron un perfil termogravimétrico similar, de los 26-180 °C el biopolímero presentó una pérdida en peso de aproximadamente el doble (15 %) que las que

experimentaron los tratamientos (8.5 %). Que la pérdida de peso en los encapsulados comenzara a una mayor temperatura (~100 °C), a diferencia del alginato cuya pérdida de peso se dio desde el inicio del análisis, se asoció a que acción conjunta alginato-mucílago como matriz encapsulante confirió mayor estabilidad térmica a los encapsulados.

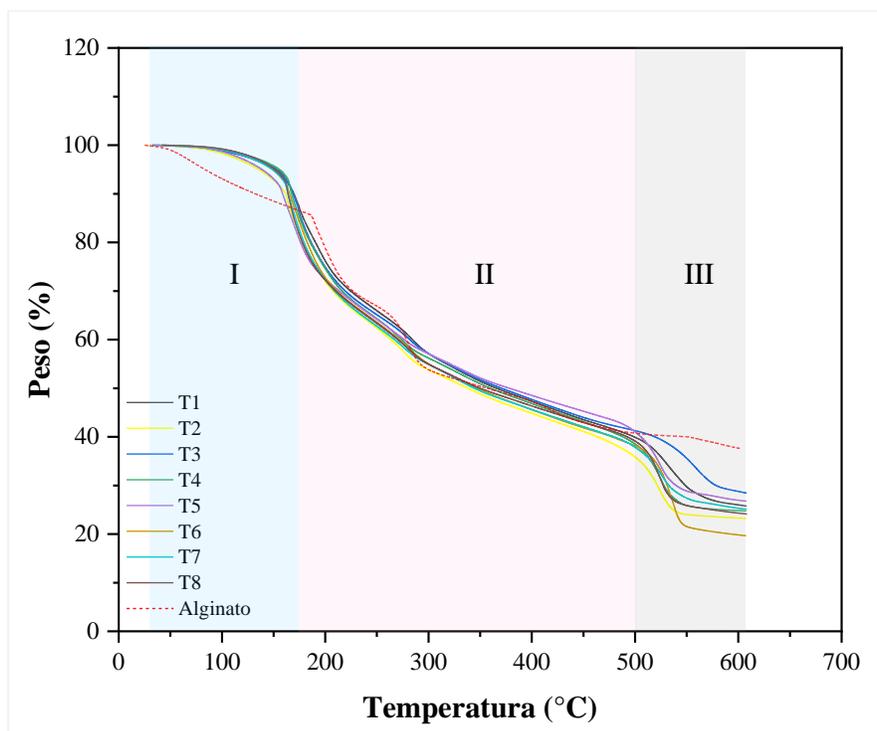


Figura 31. Espectros ATG de los encapsulados secos y el alginato.

6.6.2 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

El uso de esta técnica permitió conocer las bandas características de los encapsulados. En la Figura 32 se presentan los espectros de FTIR de los encapsulados de los primeros cuatro tratamientos (T1, T2, T3 y T4). Se pudo observar que los espectrogramas presentaron perfiles de banda parecidos, lo cual sugirió la presencia de grupos funcionales similares tanto en el extracto de ajo como en la matriz de alginato-mucílago, ya que estos aparecieron en los mismos rangos de número de onda. En la región de 3500 a 3000 cm^{-1} , correspondiente a la vibración de estiramiento -OH , la señal identificada se asocia a la presencia de enlaces de hidrógeno intramoleculares en todas las muestras. La señal cercana a los 2924 cm^{-1} se atribuye a vibraciones de estiramiento de enlaces C-H (comunes a ambos polímeros y al extracto de ajo) [59,120,129]. Los bandas alrededor de los 1600

cm^{-1} y 1413 cm^{-1} , corresponden a la vibración asimétrica y simétrica respectivamente, del $\text{C}=\text{O}$ de grupos carboxilos (coincidente para mucílago y alginato), mientras que para alicina, se ha reportado la banda de estiramiento $\text{C}=\text{C}$ a los 1674 cm^{-1} [130]. En el rango espectral de 1202 a 953 cm^{-1} se identificaron bandas atribuidas al estiramiento de enlaces $\text{C}-\text{C}$, $\text{C}-\text{O}$ y a la torsión de enlaces $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ y $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ presentes en el alginato y mucílago, así como en polisacáridos como la inulina, que podría estar presente en el extracto de ajo [57,129]. Dentro de este mismo rango, a los 1025 cm^{-1} , la literatura también reporta una fuerte vibración de estiramiento en el enlace $\text{S}=\text{O}$, característico de tiosulfatos como la alicina y algunos polisacáridos del alginato [131,132].

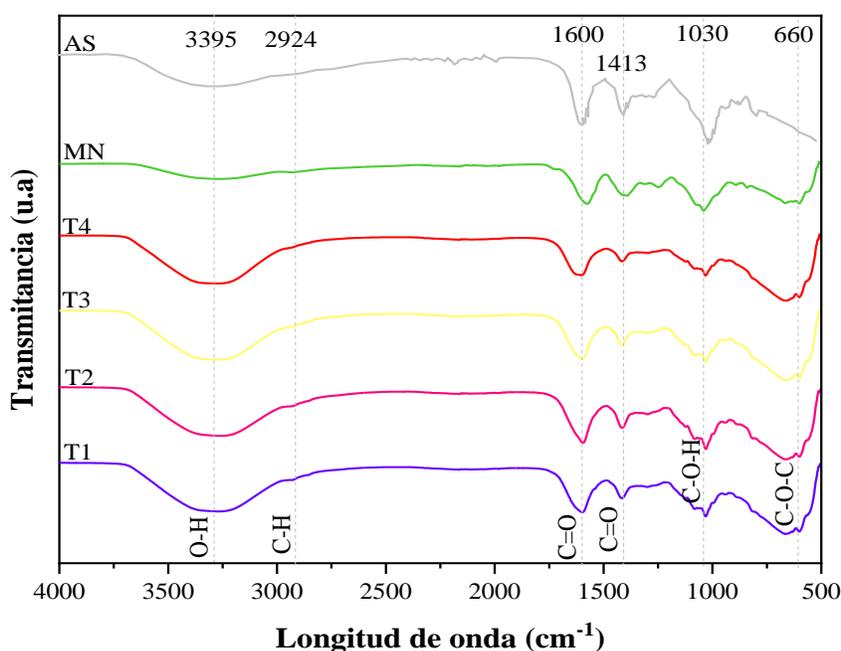


Figura 32. Espectros FTIR de los encapsulados de los tratamientos: T1, T2, T3, T4, MN(mucílago) y AS (alginato).

En la figura 33 se muestran los espectrogramas de infrarrojo del resto de encapsulados (T5, T6, T7 y T8). Tanto el extracto de ajo como la matriz encapsulante contenían los mismos grupos químicos ya que se obtuvieron patrones similares. Se distinguieron cinco bandas, al igual que en la figura 32: la primera ($3500-3000 \text{ cm}^{-1}$), asociada a estiramientos de enlaces $-\text{OH}$. La segunda ($2995-2880 \text{ cm}^{-1}$), correspondiente a enlaces $\text{C}-\text{H}$ de la estructura polimérica y del extracto de ajo[59,129]. Por otra parte, la tercera ($1746-1472 \text{ cm}^{-1}$) y cuarta ($1472-1370 \text{ cm}^{-1}$) banda, atribuidas a vibraciones asimétricas y simétricas del $\text{C}=\text{O}$. Finalmente, la quinta banda ($1204-962 \text{ cm}^{-1}$), en la que ocurren estiramientos de $\text{C}-\text{C}$, $\text{C}-\text{O}$, $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ y $\text{C}-\text{O}-\text{C}$.

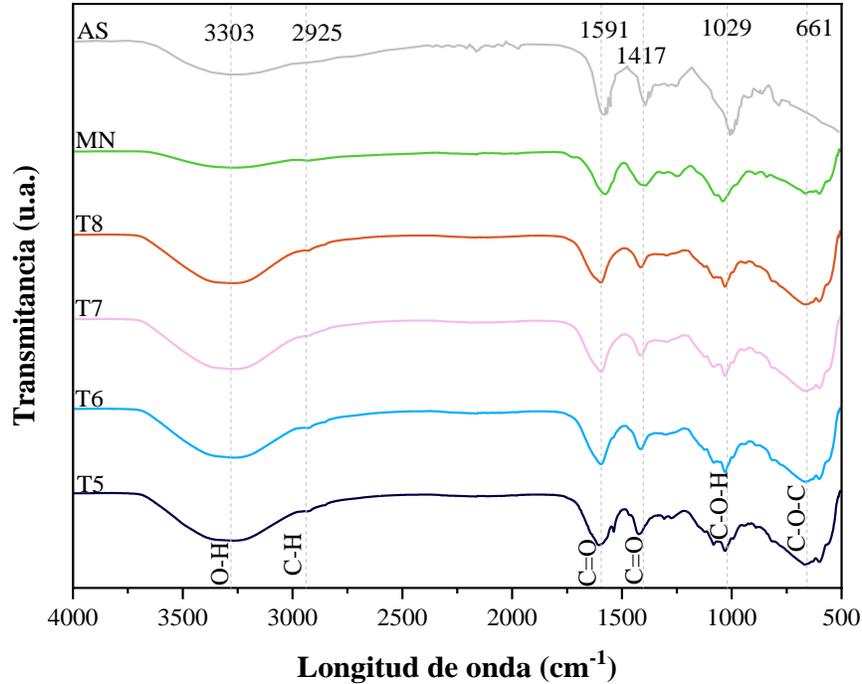


Figura 33. Espectros FTIR de los encapsulados de los tratamientos: T5, T6, T7, T8, MN(mucílago) y AS (alginate).

La ausencia de picos o señales nuevas en los espectrogramas FTIR de los encapsulados, en contraste con los patrones de infrarrojo de alginato y mucílago, sugirió que no hubo reacción química entre los grupos funcionales de la matriz de alginato-mucílago y los compuestos del extracto de ajo, y por ende, el proceso de encapsulación se llevó a cabo mediante interacciones físicas [130].

6.6.3 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

En la Figura 34 se presentan las imágenes de las perlas secas. Los encapsulados presentaron formas esféricas irregulares, superficies homogéneas y topografías exteriores rugosas, sin evidencia de grietas o fisuras. Las microesferas de los tratamientos T1, T2, T6 y T8 mostraron superficies con mayor rugosidad, lo cual se asoció a una mayor pérdida de agua que provocó la contracción de la red polimérica, los encapsulados de los tratamientos restantes tenían superficies corrugadas más atenuadas, debido a que posiblemente la matriz encapsulante no había sufrido una deshidratación completa. Por otro lado, en todos los encapsulados (a excepción de los encapsulados de los tratamientos T1 y T8) se observaron concavidades muy marcadas, las cuales se atribuyeron a que el agua se evaporó de manera muy rápida, provocando la contracción de la esfera [59].

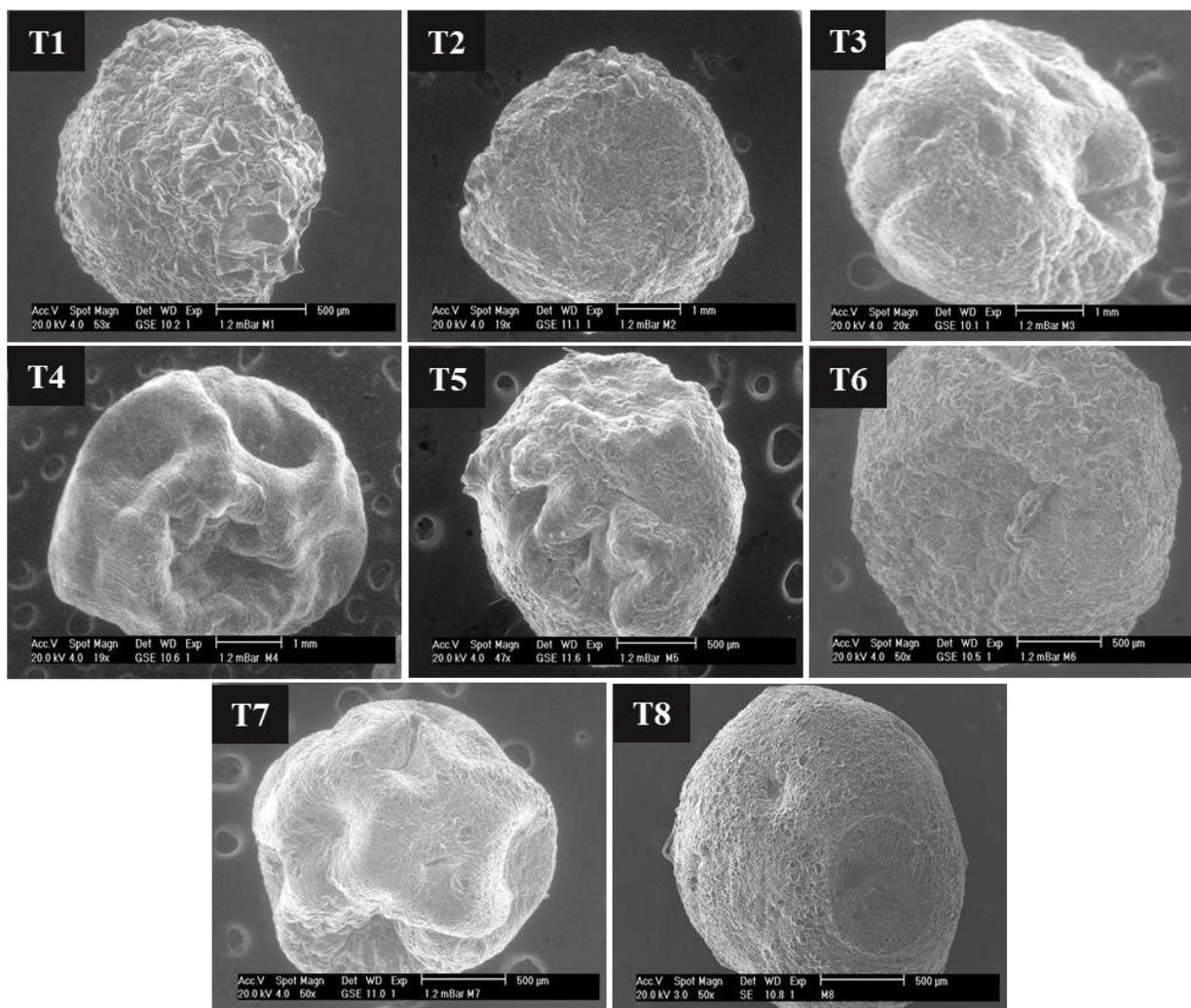


Figura 34. Micrografías de los encapsulados secos.

Por otro lado, con fines comparativos, también fueron analizadas por MEB microesferas de alginato-mucílago sin extracto de ajo (Figura 35). A pesar de que en estas esferas las superficies no resultaron tan rugosas como en las perlas de alicina, su morfología fue similar. No obstante, en las imágenes MEB de ambos encapsulados (Figura 35a y 35b), se distinguieron zonas más oscuras y otras de mayor claridad que no se observaron en los encapsulados de extracto de ajo. Considerando que la matriz alginato-mucílago contenía agua en su estructura y que las esferas se encontraban en un desecador previo a su análisis, la aparición de las zonas descritas anteriormente indicó la presencia de moho. En las figuras 35a.1 y 35b.1 se observaron filamentos en las superficies de las esferas. El crecimiento en forma de filamentos pequeños caracteriza a la especie *Cladosporium*, un hongo de interiores que se desarrolla en superficies de materiales orgánicos cuando los ambientes son húmedos y con poca ventilación [133]. Lo anterior confirmó la actividad

antifúngica que posee la alicina, pues a pesar de que los encapsulados con extracto de ajo fueron almacenados bajo las mismas condiciones y por mayor tiempo, no hubo presencia fúngica en estos.

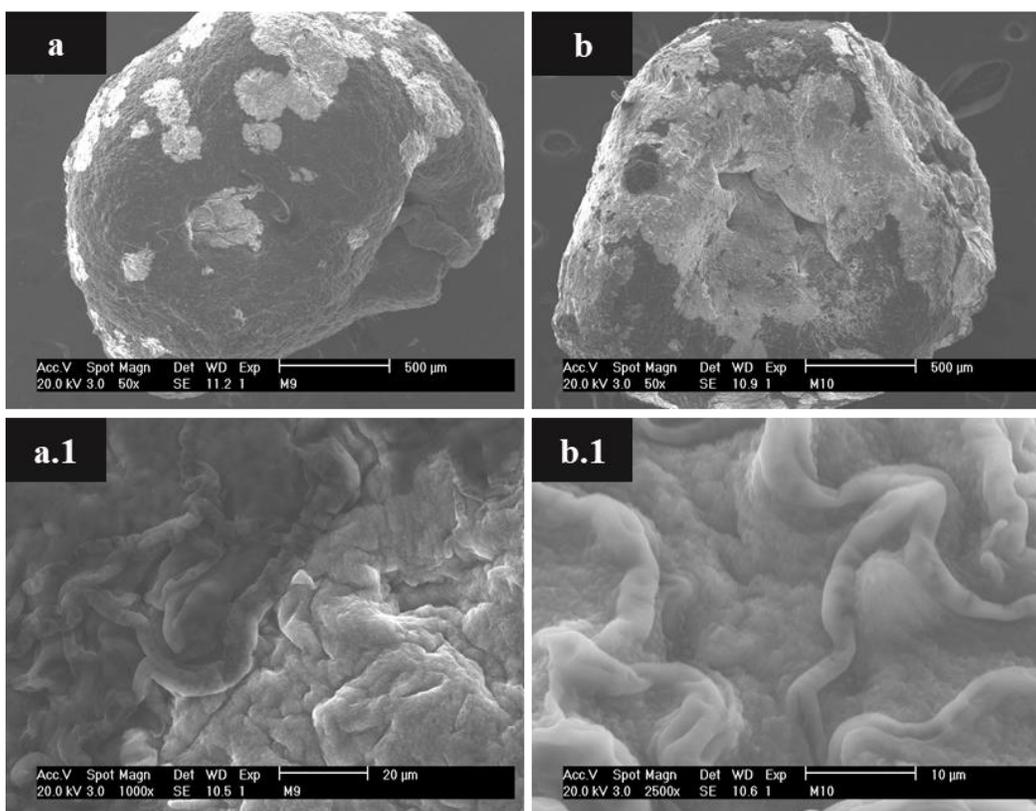


Figura 35. Micrografías de esferas de alginato-mucílago y sus correspondientes superficies.
a) E1:(80 % AS/20 % MN, 4 mm), b) E2:(90 % AS/10 % MN, 4 mm).

Por otra parte, mediante los análisis EDS (Figura 36) se identificaron los elementos principales de los encapsulados obtenidos. La superficie de los encapsulados contenía principalmente O, C, Ca, Cl y en menores cantidades elementos como P, S, K, Si, Al, Mg y Na. A modo de representación, en la figura 36 se presenta el espectro EDS de los encapsulados del tratamiento 1 (Espectros de los demás tratamientos en Anexos B). A su vez, estos análisis permitieron comprobar la ausencia de agentes extraños o impurezas en las muestras.

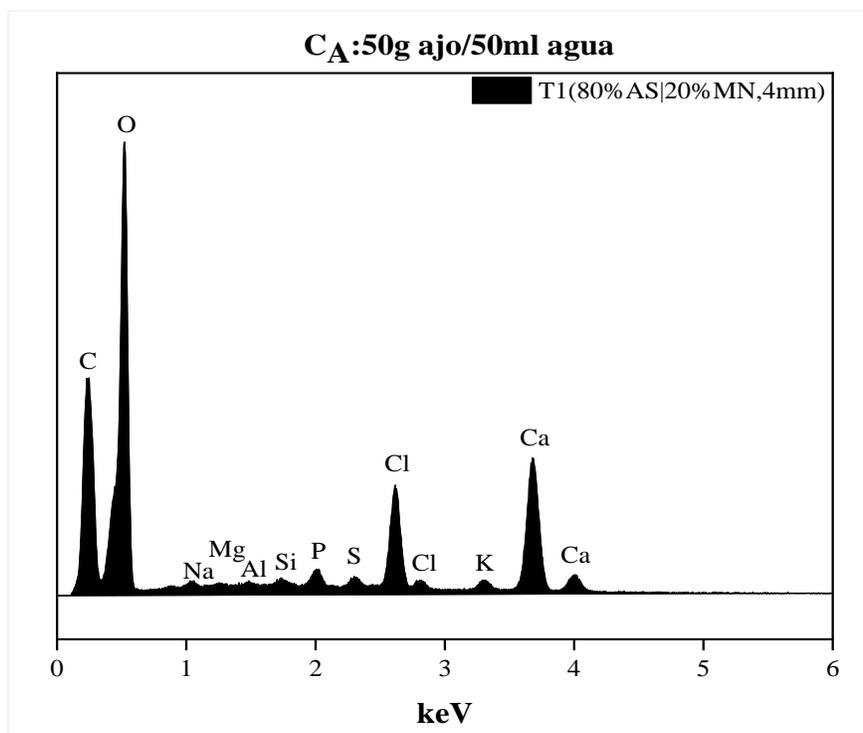


Figura 36. Espectro EDS de los encapsulados del tratamiento T1.

7. Conclusiones

- Se determinaron las condiciones empleadas en el Método A - Ensayo 2 como las adecuadas para realizar la extracción de mucílago de nopal. El rendimiento promedio de mucílago en polvo fue de 0.424 ± 0.02 % con base en peso fresco.
- La encapsulación de extractos de ajo de composición A (50 g ajo/50 ml agua) y de composición B (70 g ajo/50 ml agua) en sistemas alginato-mucílago de formulación 80 % AS|20 % MN y 90 % AS|10 % MN, mediante la técnica de gelificación-precipitación permitió obtener encapsulados esféricos y estables.
- Los encapsulados de los tratamientos T1 y T3 conservaron más del 50% de la alicina encapsulada inicialmente, siendo las condiciones óptimas de encapsulación las aplicadas a los encapsulados T1(50 g ajo/50 ml agua, 80 % AS|20 % MN, 4 mm) en los cuales se obtuvo la mayor concentración de alicina estable. Tras 43 días de almacenamiento estas perlas conservaron alrededor del 75 % de la alicina que había sido encapsulada.
- El análisis térmico gravimétrico (ATG) reveló que los encapsulados fueron térmicamente estables hasta aproximadamente 170 °C, que representó la temperatura máxima a la que el complejo alginato-mucílago mantuvo protegidos a los compuestos termosensibles del extracto de ajo (dentro de ellos la alicina).
- Los resultados de los análisis por FTIR a los encapsulados mostraron la ausencia de grupos funcionales diferentes a los de alginato y mucílago, sugiriendo que no hubo reacción química entre el agente activo y el agente encapsulante, y por lo tanto, la encapsulación del extracto de ajo en la red de alginato-mucílago se llevó a cabo mediante interacciones físicas.
- Por medio de la técnica de MEB se observó que los encapsulados conservaron estructuras esféricas irregulares, con superficies rugosas y sin presencia de grietas. Por su parte, al comparar encapsulados de extracto de ajo versus encapsulados sin extracto, fue posible constatar la actividad antifúngica que posee la alicina.

8. Referencias

- [1] G.M. Rishton. Natural Products as a Robust Source of New Drugs and Drug Leads: Past Successes and Present Day Issues. *Am. J. Cardiol.* 101 (2008) 41–49.
- [2] R. C. Gupta, *Nutraceuticals. Efficacy, Safety and Toxicity*, 1a. ed., Academic Press, Hopkinstown, 2016.
- [3] W.J.J. Chan, A.J. McLachlan, E.J. Luca, J.E. Harnett. Garlic (*Allium sativum* L.) in the management of hypertension and dyslipidemia – A systematic review. *J. Herb. Med.* 19 (2020) 1–11.
- [4] V. Lanzotti, F. Scala, G. Bonanomi. Compounds from *Allium* species with cytotoxic and antimicrobial activity. *Phytochem. Rev.* 13 (2014) 769–791.
- [5] B. Salehi, P. Zucca, I.E. Orhan, E. Azzini, C.O. Adetunji, S. Anwar, S.K. Banerjee, F. Sharopov, D. Rigano, J. Shari, L. Armstrong, M. Martorell, A. Sureda, N. Martins, Z. Selamo, Z. Ahmad. Allicin and health : A comprehensive review. *Trends Food Sci. Technol.* 86 (2019) 502–516.
- [6] B. Strehlow, U. Bakowsky, S.R. Pinnapir-eddy, J. Kusterer, G. Mielke, M. Keusgen. A Novel Microparticulate Formulation with Allicin In Situ Synthesis. *J. Pharm. Drug Deliv. Res.* 5 (2016) 1-6.
- [7] Y. Liang, J. Zhang, Q. Zhang, Z. Wang, Z. Yin, X. Li, J. Chen, L. Ye. Release test of alliin / alliinase double-layer tablet by HPLC — Allicin determination. *J. Pharm. Anal.* 3 (2013) 187–192.
- [8] A. Ali, U. Ahmad, J. Akhtar, Badruddeen, M.M. Khan. Engineered nano scale formulation strategies to augment efficiency of nutraceuticals. *J. Funct. Foods* 62 (2019) 103554.
- [9] R. C. Andújar, L. A. Fincias. *Nutrición y salud. SEMERGEN.* 35 (2009) 443–449.
- [10] P. K. Mukherjee, R.K Harwansh, S. Bahadur, V. Duraipandiyan, N. A. Al-Dhabi (Eds), in: *Factors to Consider in Development of Nutraceutical and Dietary Supplements*, Elsevier Inc. Kolkata, 2017, pp. 653–661.

- [11] H.R. Ramírez-Concepción, L.N. Castro-Velasco, E. Martínez-Santiago. Efectos Terapéuticos del Ajo (*Allium Sativum*). *Salud y Adm.* 3 (2016) 39–47.
- [12] E. Block, *Garlic and Other Alliums—The Lore and The Science*, 1a. ed., Royal Society of Chemistry, New York, 2010.
- [13] K. Khushwinder (Ed.), in: *Functional nutraceuticals: past, present, and future*, Academic Press, Chandigarh, 2016, pp. 41–78.
- [14] M. Taroncher, P. Vila-Donat, J. Tolosa, M.J. Ruiz, Y. Rodríguez-Carrasco. Biological activity and toxicity of plant nutraceuticals: an overview. *Curr. Opin. Food Sci.* 42 (2021) 113–118.
- [15] A. González-Sarrías, M. Larrosa, A. García-Conesa, M.T. Francisco, T. Barberán, J.C. Espín. Nutraceuticals for older people: facts, fictions and gaps in knowledge. *Maturitas* 75 (2013) 313–334.
- [16] L. Vicente, M. Prieto, A.I. Morales. Eficacia y seguridad de la quercetina como complemento alimenticio. *Toxicología* 30 (2013) 171–181.
- [17] K. Victor (Ed.), in: *Allium sativum*, Academic Press, Dschang, 2017, pp. 363–377.
- [18] C.B. Oosthuizen, A.M. Reid, N. Lall, in: N. Lall (Ed.), *Garlic (*Allium sativum*) and Its Associated Molecules, as Medicine*, Academic Press, Pretoria, 2018, pp. 277–295.
- [19] N. Bhagyalakshmi, R. Thimmaraju, L. Venkatachalam, K.N.C. Murthy, R. V. Sreedhar. Nutraceutical applications of garlic and the intervention of biotechnology. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr. Food Sci. Nutr.* 45 (2005) 607–621.
- [20] N. Martins, S. Petropoulos, I. Ferreira. Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre-and postharvest conditions: A review. *Food Chem.* 211 (2016) 41–50.
- [21] X.-B. Si, X.-M. Zhang, S. Wang, Y. Lan, S. Zhang, L.-Y. Huo. Allicin as add-on therapy for *Helicobacter pylori* infection: A systematic review and meta-analysis. *World J. Gastroenterol.* 25 (2019) 6025–6040.

- [22] M.C.H. Gruhlke, C. Nicco, F. Batteux, A.J. Slusarenko. The effects of allicin, a reactive sulfur species from garlic, on a selection of mammalian cell lines. *Antioxidants* 6 (2017) 1–16.
- [23] M. González Maza, G. Guerra Ibañez, J.C. Maza Hernández, A. Cruz Dopico. Revisión bibliográfica sobre el uso terapéutico del ajo. *Rev. Cuba. Med. Física y Rehabil.* 6 (2014) 61–71.
- [24] J. Wang, X. Zhang, H. Lan, W. Wang. Effect of garlic supplement in the management of type 2 diabetes mellitus(T2DM): a meta-analysis of randomized controlled trials. *Food Nutr. Res.* 61 (2017) 1-9.
- [25] M.E. Rybak, E.M. Calvey, J.M. Harnly. Quantitative determination of allicin in garlic: supercritical fluid extraction and standard addition of alliin. *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 682–687.
- [26] J. Borlinghaus, F. Albrecht, M.C.H. Gruhlke, I.D. Nwachukwu, A.J. Slusarenko. Allicin: Chemistry and biological properties. *Molecules* 19 (2014) 12591–12618.
- [27] D. Ilic, V. Nikolic, L. Nikolic, M. Stankovic, L. Stanojevic, M. Cakic. Allicin and related compounds: Biosynthesis, synthesis and pharmacological activity. *Facta Univ. - Ser. Physics, Chem. Technol.* 9 (2011) 9–20.
- [28] A. Marchese, R. Barbieri, A. Sanches-silva, M. Daglia, S. Fazel, N. Jonaidi, M. Izadi, M. Ajami, S. Mohammad. Antifungal and antibacterial activities of allicin : A review. *Trends Food Sci. Technol.* 52 (2016) 49–56.
- [29] R. Leontiev, N. Hohaus, C. Jacob, M.C.H. Gruhlke, A.J. Slusarenko. A comparison of the antibacterial and antifungal activities of thiosulfinate analogues of allicin. *Sci. Rep.* 8 (2018) 1–19.
- [30] S.H. Omar, N.A. Al-Wabel. Organosulfur compounds and possible mechanism of garlic in cancer. *Saudi Pharm. J.* 18 (2010) 51–58.
- [31] P. Prati, C.M. Henrique, A.S. De-Souza, V.S. Nunes Da Silva, M.T. Bertoldo Pacheco. Evaluation of allicin stability in processed garlic of different cultivars. *Food Sci. Technol.* 34 (2014) 623–628.

- [32] H. Wang, X. Li, X. Liu, D. Shen, Y. Qiu, X. Zhang, J. Song. Influence of pH, concentration and light on stability of allicin in garlic (*Allium sativum* L.) aqueous extract as measured by UPLC. *J. Sci. Food Agric.* 95 (2015) 1838–1844.
- [33] J. Reiter, A.M. Hübbers, F. Albrecht, L.I.O. Leichert, A.J. Slusarenko. Allicin, a natural antimicrobial defence substance from garlic, inhibits DNA gyrase activity in bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* 310 (2020) 1-13.
- [34] M.C.H. Gruhlke, B. Hemmis, U. Noll, R. Wagner, H. Lühring, A.J. Slusarenko. The defense substance allicin from garlic permeabilizes membranes of *Beta vulgaris*, *Rhoeo discolor*, *Chara corallina* and artificial lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1850 (2015) 601–611.
- [35] A. Muller, J. Eller, F. Albrecht, P. Prochnow, K. Kuhlmann, J.E. Bandow, A.J. Slusarenko, L.I.O. Leichert. Allicin induces thiol stress in bacteria through S-allylmercapto modification of protein cysteines. *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 11477–11490.
- [36] B. Salehi, F. Sharopov, M. Martorell, J. Rajkovic, A. Ademiluyi, M. Sharifi-Rad, P. Fokou, N. Martins, M. Iriti, J. Sharifi-Rad. Phytochemicals in *Helicobacter pylori* infections: What are we doing now? *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018) 1–34.
- [37] G. Bachrach, A. Jamil, R. Naor, G. Tal, Z. Ludmer, D. Steinberg. Garlic allicin as a potential agent for controlling oral pathogens. *J. Med. Food* 14 (2011) 1338–1343.
- [38] E. Chmelíková, D. Němeček, M. Dvořáková, I. Heroutová, M. Sedmíková. Organo-sulphur garlic compounds influence viability of mammalian cells: A review. *Sci. Agric. Bohem.* 49 (2018) 9–16.
- [39] M. López-Luengo. El ajo. *Offarm.* 26 (2007) 78–81.
- [40] A. Elkayam, E. Peleg, E. Grossman, Z. Shabtay, Y. Sharabi. Effects of allicin on cardiovascular risk factors in spontaneously hypertensive rats. *Isr. Med. Assoc. J.* 15 (2013) 170–173.

- [41] M.P. McRae. A review of studies of garlic (*Allium sativum*) on serum lipids and blood pressure before and after 1994: does the amount of allicin released from garlic powder tablets play a role? *J. Chiropr. Med.* 4 (2005) 182–190.
- [42] L.D. Lawson, Z.J. Wang, D. Papadimitriou. Allicin Release under Simulated Gastrointestinal Conditions from Garlic Powder Tablets Employed in Clinical Trials on Serum Cholesterol. *Planta Medica. J. Med. Plant Nat. Prod. Res.* 67 (2001) 13–18.
- [43] L.D. Lawson, S.M. Hunsaker. Allicin Bioavailability and Bioequivalence from Garlic Supplements and Garlic Foods. *Nutrients* (2018) 1–49.
- [44] I. Arnault, J.P. Christidès, N. Mandon, T. Haffner, R. Kahane, J. Auger. High-performance ion-pair chromatography method for simultaneous analysis of alliin, deoxyalliin, allicin and dipeptide precursors in garlic products using multiple mass spectrometry and UV detection. *J. Chromatogr. A* 991 (2003) 69–75.
- [45] G. Gebreyohannes, M. Gebreyohannes. Medicinal values of garlic: A review. *Int. J. Med. Med. Sci.* 5 (2013) 401–408.
- [46] A. Suciu, V. Tamas, G. Alexandru, N. Bordei. Evaluation of allicin stability in lyophilized aqueous garlic extract for new pharmaceutical solid formulations with bioavailable allicin. *J. EcoAgriTourism* 12 (2016) 47–52.
- [47] H. Fujisawa, K. Suma, K. Origuchi, T. Seki, T. Ariga. Thermostability of allicin determined by chemical and biological assays. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72 (2008) 2877–2883.
- [48] H. Fujisawa, K. Suma, K. Origuchi, H. Kumagai, T. Seki, T. Ariga. Biological and chemical stability of garlic-derived allicin. *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 4229–4235.
- [49] S.C. Wilde, J.K. Keppler, K. Palani, K. Schwarz. β -Lactoglobulin as nanotransporter for allicin: Sensory properties and applicability in food. *Food Chem.* 199 (2016) 667–674.
- [50] M.C. Otálora, J.G. Carriazo, L. Iturriaga, C. Osorio, M.A. Nazareno. Encapsulating betalains from *Opuntia ficus-indica* fruits by ionic gelation: Pigment chemical stability during storage of beads. *Food Chem.* 202 (2016) 373–382.

- [51] L. Tavares, L. Santos, C.P. Zapata Noreña. Bioactive compounds of garlic: A comprehensive review of encapsulation technologies, characterization of the encapsulated garlic compounds and their industrial applicability. *Trends Food Sci. Technol.* 114 (2021) 232–244.
- [52] Y. Wang, J. Shao, Z. Wang, Z. Lu. Study of allicin microcapsules in β -cyclodextrin and porous starch mixture. *Food Res. Int.* 49 (2012) 641–647.
- [53] V.D. Nikolic, M. Stankovic, A. Kapor, L. Nikolic, D. Cvetkovic, J. Stamenković. Allylthiosulfinate: β -cyclodextrin inclusion complex: Preparation, characterization and microbiological activity. *Pharmazie* 59 (2004) 845–848.
- [54] Q. Lu, P.M. Lu, J.H. Piao, X.L. Xu, J. Chen, L. Zhu, J.G. Jiang. Preparation and physicochemical characteristics of an allicin nanoliposome and its release behavior. *LWT - Food Sci. Technol.* 57 (2014) 686–695.
- [55] C.M.B. Pinilla, C.P. Zapata Noreña, A. Brandelli. Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles, containing garlic extract, with antilisterial activity in milk. *Food Chem.* 220 (2017) 470–476.
- [56] C.M.B. Pinilla, A. Brandelli. Antimicrobial activity of nanoliposomes co-encapsulating nisin and garlic extract against Gram-positive and Gram-negative bacteria in milk. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 36 (2016) 287–293.
- [57] C.M.B. Pinilla, R.C.S. Thys, A. Brandelli. Antifungal properties of phosphatidylcholine-oleic acid liposomes encapsulating garlic against environmental fungal in wheat bread. *Int. J. Food Microbiol.* 293 (2019) 72–78.
- [58] T. Kinalski, C.P. Zapata Noreña. Effect of spray drying encapsulation of garlic extract on inulin and thiosulfinate contents. *J. Food Meas. Charact.* 13 (2019) 2438–2447.
- [59] L. Tavares, C.P. Zapata Noreña. Encapsulation of garlic extract using complex coacervation with whey protein isolate and chitosan as wall materials followed by spray drying. *Food Hydrocoll.* 89 (2019) 360–369.
- [60] L. Tavares, H.L.B. Barros, J.C.P. Vaghetti, C.P. Zapata Noreña. Microencapsulation of Garlic Extract by Complex Coacervation Using Whey Protein Isolate/Chitosan and Gum

Arabic/Chitosan as Wall Materials: Influence of Anionic Biopolymers on the Physicochemical and Structural Properties of Microparticles. *Food Bioprocess Technol.* 12 (2019) 2093–2106.

[61] E. Nava-Reyna, G. Michelena-Álvarez, A. Iliná, J.L. Martínez-Hernández. Microencapsulación de componentes bioactivos. *Investig. Cienc.* 66 (2015) 64–70 .

[62] M. Saifullah, M.R.I. Shishir, R. Ferdowsi, M.R. Tanver Rahman, Q. Van Vuong. Micro and nano encapsulation, retention and controlled release of flavor and aroma compounds: A critical review. *Trends Food Sci. Technol.* 86 (2019) 230–251.

[63] M. Lengyel, N. Kállai-Szabó, V. Antal, A.J. Laki, I. Antal. Microparticles, microspheres, and microcapsules for advanced drug delivery. *Sci. Pharm.* 87 (2019) 1–31.

[64] Agrolytix GmbH. Microencapsulation. 2014. Tomado de:

<https://www.agrolytix.com/en/technology/microencapsulation>.

[65] L.M.C Sagis, *Microencapsulation and microspheres for food applications*, 1a. ed., Academic

Press, London, 2015.

[66] J.S. Sri, A. Seethadevi, K.S. Prabha, P. Muthuprasanna, P. Pavitra. Microencapsulation: A review. *Int. J. Pharma Bio Sci.* 3 (2012) 512–531.

[67] N.A. Guevara-Bretón, T. Jiménez-Munguía. Encapsulación: técnicas y aplicaciones en la industria alimentaria. *Temas Sel. Ing. Aliment.* 2 (2008) 36–49.

[68] J. Rodríguez, M.J. Martín, M.A. Ruiz, B. Clares. Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. *Food Res. Int.* 83 (2016) 41–59.

[69] M.L. Zambrano-Zaragoza, D. Quintanar-Guerrero. Novel Techniques for Extrusion, Agglomeration, Encapsulation, Gelation, and Coating of Foods. *Encycl. Food Secur. Sustain.* 1 (2019) 379–392.

[70] V. Nedovic, A. Kalusevic, V. Manojlovic, S. Levic, B. Burgaski. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Sci.* 1 (2011) 1806 – 1815.

- [71] C. Perignon, G. Ongmayeb, R. Neufeld, Y. Frere, D. Poncelet. Microencapsulation by interfacial polymerisation: Membrane formation and structure. *J. Microencapsul.* 32 (2015) 1–15.
- [72] A. Trojanowska, M. Giamberini, I. Tsibranska, M. Nowak, Ł. Marciniak, R. Jatrزاب, B. Tylkowski. Microencapsulation in food chemistry. *J. Membr. Sci. Res.* 3 (2017) 265–271.
- [73] V. Suganya, V. Anuradha. Microencapsulation and Nanoencapsulation: A Review. *Int. J. Pharm. Clin. Res.* 9 (2017) 233–239.
- [74] K. Bruyninckx, M. Dusselier. Sustainable Chemistry Considerations for the Encapsulation of Volatile Compounds in Laundry-Type Applications. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 7 (2019) 8041–8054.
- [75] M.E. Ramírez, in: V. M. Sandoval-Peraza, T. Cu-Cañetas, G. Peraza-Mercado, P. O. Acereto-Escoffié (Eds.), *Introducción en los procesos de encapsulación de moléculas nutraceuticas*, OmniaScience. México, 2017, pp. 181–218.
- [76] G.C. Rodríguez-Jiménes, D.E. Páramo-Calderón, H. Wall-Martínez, V.J. Robles-Olvera, G. Valerio-Alfaro, M.A. García-Alvarado. Effect of Process Variables on Spray-Dried Garlic Juice Quality Evaluated by Multivariate Statistic. *Food Bioprocess Technol.* 7 (2014) 2434–2442.
- [77] R.E. González, A. Tarón, L.B. Morón. Formación de microcápsulas de tamaño controlado por gelación iónica utilizando mezclas biopoliméricas binarias. *Inf. Tecnol.* 26 (2015) 31–38.
- [78] J.Y. Leong, W.H. Lam, K.W. Ho, W.P. Voo, M.F.X. Lee, H.P. Lim, S.L. Lim, B.T. Tey, D. Poncelet, E.S. Chan. Advances in fabricating spherical alginate hydrogels with controlled particle designs by ionotropic gelation as encapsulation systems. *Particuology* 24 (2016) 44–60.
- [79] M. Palencia, T.A. Lerma, V. Garcés, M.A. Mora, J.M. Martínez, S.L. Palencia, *Biopolymers and bioplastics: from green chemistry to eco-friendly polymers*, Elsevier, Inc. Cali, 2021, pp. 23–34.
- [80] D. Rodríguez-Gómez, V. López-Ramírez, A.G. Alpizar-Negrete, M.E. Calixto-Olalde, en: *Mujeres en la Ciencia Biología*, O. Vargas Delgado (Ed.), *Biopolímeros: de principio a fin*,

Querétaro, ECORFAN®, 2020, pp. 107–129.

[81] Natural biopolymers as nanocarriers for bioactive ingredients used in food industries, in: A.M. Grumezescu (Ed.), *Encapsulations*, Academic Press, 2016: pp. 793–829.

[82] M.H. Abd El-Salam, S. El-Shibiny, in: A.M. Grumezescu (Ed.), *Natural biopolymers as nanocarriers for bioactive ingredients used in food industries*, Academic Press, Cairo, 2016, pp. 793–829.

[83] M. Aragona, E.R. Lauriano, S. Pergolizzi, C. Faggio. *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller as a source of bioactivity compounds for health and nutrition. *Nat. Prod. Res.* 32 (2018) 2037–2049.

[84] M.Q. Marin-Bustamante, J.J. Chanona-Pérez, N. Guemes-Vera, I. Arzate-Vázquez, M.J. Perea-Flores, J.A. Mendoza-Pérez, G. Calderón-Domínguez, R.G. Casarez-Santiago. Evaluation of physical, chemical, microstructural and micromechanical properties of nopal spines (*Opuntia ficus-indica*). *Ind. Crops Prod.* 123 (2018) 707–718.

[85] R. Gheribi, Y. Habibi, K. Khwaldia. Prickly pear peels as a valuable resource of added-value polysaccharide: Study of structural, functional and film forming properties. *Int. J. Biol. Macromol.* 126 (2019) 238–245.

[86] E. Sepúlveda, C. Sáenz, E. Aliaga, C. Aceituno. Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia* spp. *J. Arid Environ.* 68 (2007) 534–545.

[87] C. Sáenz-Hernández, J. Corrales-García, G. Aquino-Pérez, in: P. S. Nobel (Eds.), *Nopalitos,*

mucilage, fiber and cochineal, University of California Press. Berkeley, Los Angeles,

London, 2002, pp. 211–234.

[88] F.M. León-Martínez, L.L. Méndez-Lagunas, J. Rodríguez-Ramírez. Spray drying of nopal mucilage (*Opuntia ficus-indica*): Effects on powder properties and characterization. *Carbohydr. Polym.* 81 (2010) 864–870.

- [89] L. Vargas Rodríguez, G. Arroyo Figueroa, C.H. Herrera Méndez, A. Pérez Nieto, M.I. García Vieyra, J.R. Rodríguez Núñez. Physical properties of mucilage prickly pear. *Acta Univ.* 26 (2016) 8–11.
- [90] C.M. Messina, R. Arena, M. Morghese, A. Santulli, G. Liguori, P. Inglese. Seasonal characterization of nutritional and antioxidant properties of *Opuntia ficus-indica* [(L.) Mill.] mucilage. *Food Hydrocoll.* 111 (2021) 1–7.
- [91] L. Medina-Torres, E. Brito-De La Fuente, B. Torrestiana-Sanchez, R. Katthain. Rheological properties of the mucilage gum (*Opuntia ficus indica*). *Food Hydrocoll.* 14 (2000) 417–424.
- [92] C. Quinzio, C. Ayunta, M. Alancay, B.L. de Mishima, L. Iturriaga. Physicochemical and rheological properties of mucilage extracted from *Opuntia ficus indica* (L. Miller). Comparative study with guar gum and xanthan gum. *J. Food Meas. Charact.* 12 (2017) 459–470.
- [93] R. Malviya, P. Srivastava, G.T. Kulkarni. Applications of Mucilages in Drug Delivery -A Review. *Adv. Biol. Res. (Rennes).* 5 (2011) 1–7.
- [94] R.L. Torres-Ponce, D. Morales-Corral, M.D.L. Ballinas-Casarrubias, G.V. Nevárez-Moorillón. El nopal: planta del semidesierto con aplicaciones en farmacia, alimentos y nutrición animal. *Rev. Mex. Ciencias Agrícolas* 6 (2015) 1129–1142.
- [95] L. Medina-Torres, E.E. García-Cruz, F. Calderas, R.F. González Laredo, G. Sánchez-Olivares, J.A. Gallegos-Infante, N.E. Rocha-Guzmán, J. Rodríguez-Ramírez. Microencapsulation by spray drying of gallic acid with nopal mucilage (*Opuntia ficus indica*). *LWT - Food Sci. Technol.* 50 (2013) 642–650.
- [96] M.C. Otálora, J.G. Carriazo, L. Iturriaga, M.A. Nazareno, C. Osorio. Microencapsulation of betalains obtained from cactus fruit (*Opuntia ficus-indica*) by spray drying using cactus cladode mucilage and maltodextrin as encapsulating agents. *Food Chem.* 187 (2015) 174–181.
- [97] J.D. Wehr, in: J.D. Wehr, R.G. Sheath, J.P. Kociolek (Eds.), *Brown Algae*, Academic Press, New York, 2015, pp. 851–871.
- [98] G. Skjåk-Bræk, K.I. Draget, in: K. Matyjaszewski, M. Möller (Eds.) *Alginates: Properties and Applications*, Elsevier, Inc. Trondheim, 2012, pp. 213–220.

- [99] I.H. Lone, E. Kowsalya, L. Jeyanthi Rebecca. Alginate fiber from brown algae. *Der Pharm. Lett.* 8 (2016) 68–71.
- [100] C. Bennacef, S. Desobry-Banon, L. Probst, S. Desobry. Advances on alginate use for spherification to encapsulate biomolecules. *Food Hydrocoll.* 118 (2021) 1–14.
- [101] G.C. Avendaño - Romero, A. López Malo, E. Palou. Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas Sel. Ing. Aliment.* 1 (2013) 87–96.
- [102] B. Lupo Pasin. Estudio de la gelificación de alginatos para encapsulación: caracterización, preparación y aplicaciones en alimentos funcionales. Tesis de doctorado. Universitat de Barcelona, 2014.
- [103] C.T. Nordgård, K.I. Draget, in: G.O. Phillips, P.A. Williams (Eds.), *Alginates* Woodhead Publishing, Trondheim, 2021, pp. 805–829.
- [104] I.I. Kabir, C.C. Sorrell, S.S. Mofarah, W. Yang, A.C.Y. Yuen, M.T. Nazir, G.H. Yeoh. Alginate/Polymer-Based Materials for Fire Retardancy: Synthesis, Structure, Properties, and Applications. *Polym. Rev.* 61 (2021) 357–414.
- [105] K. Chaturvedi, K. Ganguly, U.A. More, K. Raghava Reddy, T. Dugge, B. Balaram Naik, T.M. Aminabhavi, M.N. Noolvi, in: Md. Saquib Hasnain, A. Kumar Nayak (Eds.), *Sodium alginate in drug delivery and biomedical areas*, Academic Press, Dharwad, 2019, pp. 59-100.
- [106] J. Girón-Hernández, P. Gentile, M. Benlloch-Tinoco. Impact of heterogeneously crosslinked calcium alginate networks on the encapsulation of β -carotene-loaded beads. *Carbohydr. Polym.* 271 (2021) 1–8.
- [107] V. Dadwal, R. Joshi, M. Gupta. Formulation, characterization and in vitro digestion of polysaccharide reinforced Ca- alginate microbeads encapsulating citrus medic L. phenolics. *Lwt* 152 (2021) 1–11.
- [108] F. Fathordoobady, M. Jarzębski, A. Pratap-Singh, Y. Guo, Y. Abd-Manap. Encapsulation of betacyanins from the peel of red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus* L.) in alginate microbeads. *Food Hydrocoll.* 113 (2021) 1–11.

- [109] L. Vargas Rodríguez, Z. Arroyo Gamiño, R. Fuentes Ramírez, D. Contreras López. Mucilago de nopal y su aplicación en la obtención de biopolímeros. *Nat. y Tecnol.* 5 (2018) 24–33.
- [110] K.P. Contreras-Lozano, Y. Aguas-Mendoza, G. Salcedo-Mendoza, R. Olivero-Verbel, G. Mendoza-Ortega. El Nopal (*Opuntia ficus-indica*) como coagulante natural complementario en la clarificación de agua. *Prod. + Limpia* 10 (2015) 40–50.
- [111] V.S. Domínguez Canales, J.A. Zegbe Domínguez, M.D. Alvarado Nava, J. Mena Covarrubias. Extracción y purificación de mucílago de nopal. INIFAP, 2011.
- [112] F. M. León Martínez. Secado por aspersion de mucílago de nopal (*Opuntia ficus indica*) y su efecto en las propiedades reológicas de los polvos reconstituidos, Tesis de maestría. CIIDIR-IPN-Unidad Oaxaca, 2010.
- [113] M. A. Abraján Villaseñor. Efecto del método de extracción en las características químicas y físicas del mucílago del nopal (*Opuntia ficus-indica*) y estudio de su aplicación como recubrimiento comestible. Tesis de doctorado. Universidad Politécnica de Valencia, 2008.
- [114] H. Jiang, Z. Xing, Y. Wang, Z. Zhang, B. Kumah Mintah, M. Dabbour, Y. Li, R. He, L. Huang, H. Ma. Preparation of allicin-whey protein isolate conjugates: Allicin extraction by water, conjugates' ultrasound-assisted binding and its stability, solubility and emulsibility analysis. *Ultrason. Sonochem.* 63 (2020) 1-8.
- [115] M. A. Córdova Betancourt. Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum*, L.): Implicaciones analíticas. Tesis de maestría. CIIDIR-IPN-Unidad Oaxaca, 2010.
- [116] L. Díaz J., K. Jiménez L. en: Simposio de Metrología, Validación de un Método de Extracción de Alicina en Ajo y su Cuantificación por HPLC, Santiago de Querétaro, pp. 1–6.

- [117] K. Rome, A. McIntyre. Intelligent use of relative response factors in gas chromatography-flame ionisation detection. *Chromatogr. Today* (2012) 52–56.
- [118] R. Villalobos Ruiz. Morteros de cal con mucílago de nopal (*Opuntia Ficus Indica*) como aditivo: Evaluación de las propiedades mecánicas en base al método de extracción empleado. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de San Luís Potosí, 2014.
- [119] Y. C. Rodríguez Henao. Evaluación del mucílago de nopal (*Opuntia Ficus-Indica*) como agente estabilizante en néctar de maracuyá (*Passiflora Edulis*). Tesis de licenciatura. Universidad De la Salle, 2017.
- [120] A. Guardiola de León. Extracción y caracterización de mucílago del nopal (*Opuntia Ficus Indica* (L.) Miller) de cinco cultivares, en tres estados de maduración. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León, 2018.
- [121] F.M. León-Martínez, P.F.D.J. Cano-Barrita, L. Lagunez-Rivera, L. Medina-Torres. Study of nopal mucilage and marine brown algae extract as viscosity-enhancing admixtures for cement based materials. *Constr. Build. Mater.* 53 (2014) 190–202.
- [122] F.M. León-Martínez, P.F. d. J. Cano-Barrita, F. Castellanos, K.B. Luna-Vicente, S. Ramírez-Arellanes, C. Gómez-Yáñez. Carbonation of high-calcium lime mortars containing cactus mucilage as additive: a spectroscopic approach. *J. Mater. Sci.* 56 (2021) 3778–3789.
- [123] D. Soto, H. Oliva. Métodos para preparar hidrogeles químicos y físicos basados en almidón: Una revisión. *Rev. Latinoam. Metal. y Mater.* 32 (2012) 1-24.
- [124] T. Miron, A. Rabinkov, D. Mirelman, L. Weiner, M. Wilchek. A Spectrophotometric Assay for Allicin and Alliinase (Alliin lyase) Activity: Reaction of 2-Nitro-5-thiobenzoate with Thiosulfates. *Anal. Biochem.* 265 (1998) 317–325.
- [125] A.M. Farías-campomanes, C.N. Horita, M.A.R. Pollonio, M.A.A. Meireles. Allicin-Rich Extract Obtained from Garlic by Pressurized Liquid Extraction: Quantitative Determination of Allicin in Garlic Samples. *Food Public Heal.* 4 (2014) 272–278.

- [126] Z. Fang, B. Bhandari. Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends Food Sci. Technol.* 21 (2010) 510–523.
- [127] C. Goncalvez da Rosa, C. Dellinghausen Borges, R.C. Zambiasi, J. Kuhn Rutz, S. Rickes da Luz, D. Krumreich, Fernanda, E. Valmir Benvenuti, M. Ramos Nunez. Encapsulation of the phenolic compounds of the blackberry (*Rubus fruticosus*). *LWT - Food Sci. Technol.* 58 (2014) 527–553.
- [128] Y. Hu, G. Kou, Q. Chen, Y. Li, Z. Zhou. Protection and delivery of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) peel extracts by encapsulation of whey protein concentrate nanoparticles. *LWT* 99 (2019) 24–33.
- [129] L. Montes, M. Gisbert, I. Hinojosa, J. Sineiro, R. Moreira. Impact of drying on the sodium alginate obtained after polyphenols ultrasound-assisted extraction from *Ascophyllum nodosum* seaweeds. *Carbohydr. Polym.* 272 (2021) .
- [130] N.M.N. Affendi, N. Mansor, R. Mathialagan. Development and characterization of allicin using palm stearin as a binder on urea granules. *J. Plant Nutr.* 43 (2020) 621–628.
- [131] P. Maheswari, S. Ponnusamy, S. Harish, M.R. Ganesh, Y. Hayakawa. Hydrothermal synthesis of pure and bio modified TiO₂: Characterization, evaluation of antibacterial activity against gram positive and gram negative bacteria and anticancer activity against KB Oral cancer cell line. *Arab. J. Chem.* (2020) 3484–3497.
- [132] Y. Ore B., E.R. Pichilingue L., A.C. Valderrama Negrón. Extracción y caracterización del alginato de sodio de la macroalga *Macrocystis pyrifera*. *Rev. la Soc. Química del Perú.* 86 (2020) 276–287.
- [133] F.J.J. Segers, K.A. van Laarhoven, H.P. Huinink, O.C.G. Adan, H.A.B. Wösten, J. Dijksterhuis. The indoor fungus *Cladosporium halotolerans* survives humidity dynamics markedly better than *Aspergillus niger* and *Penicillium rubens* despite less growth at lowered steady-state water activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 82 (2016) 5089–5098.

9. Anexos

Anexos A - Cromatogramas

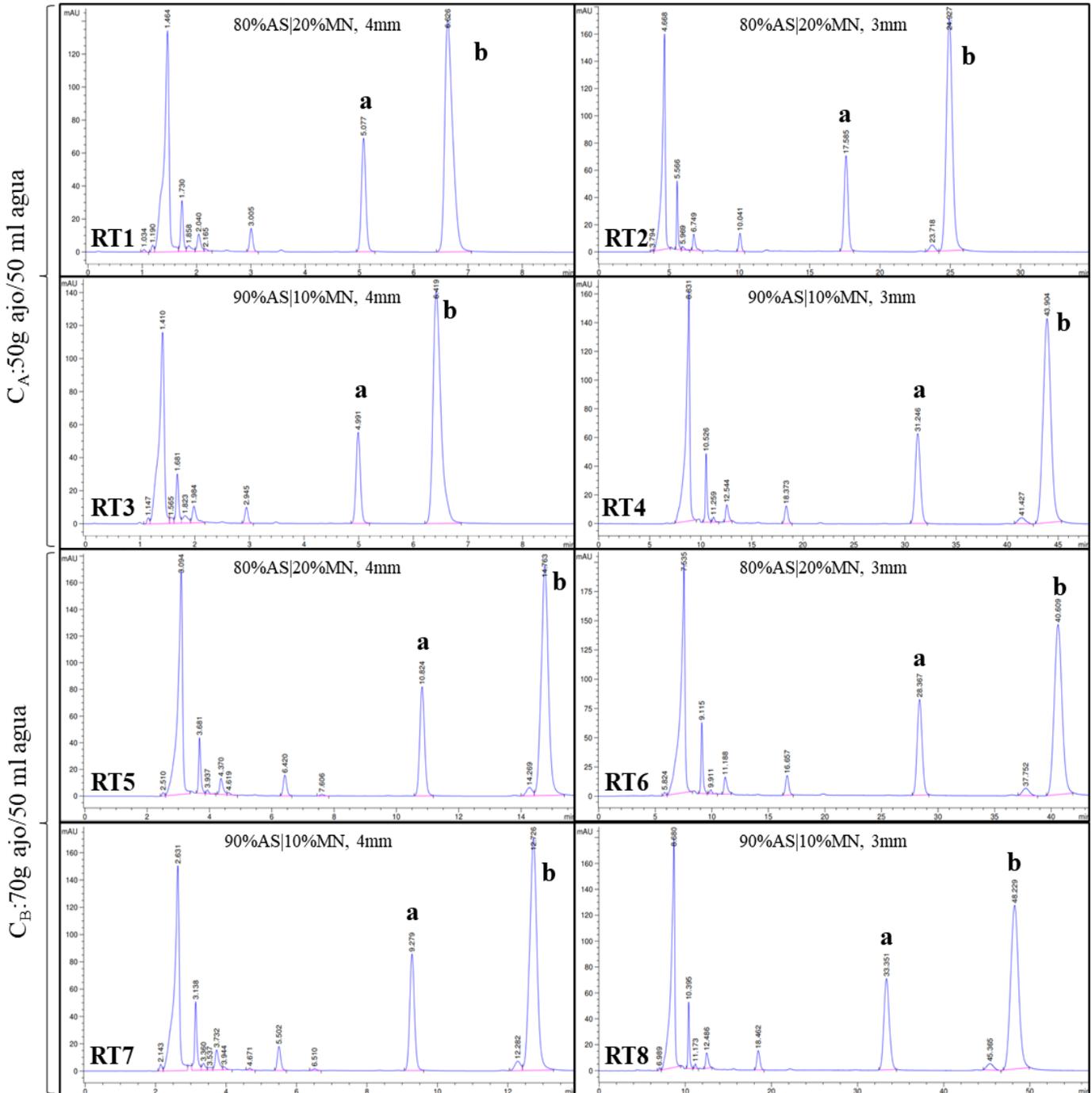


Figura A. I. Cromatogramas de los extractos de ajo. Réplicas de los tratamientos.
a) Alicina, b) etilparabeno.

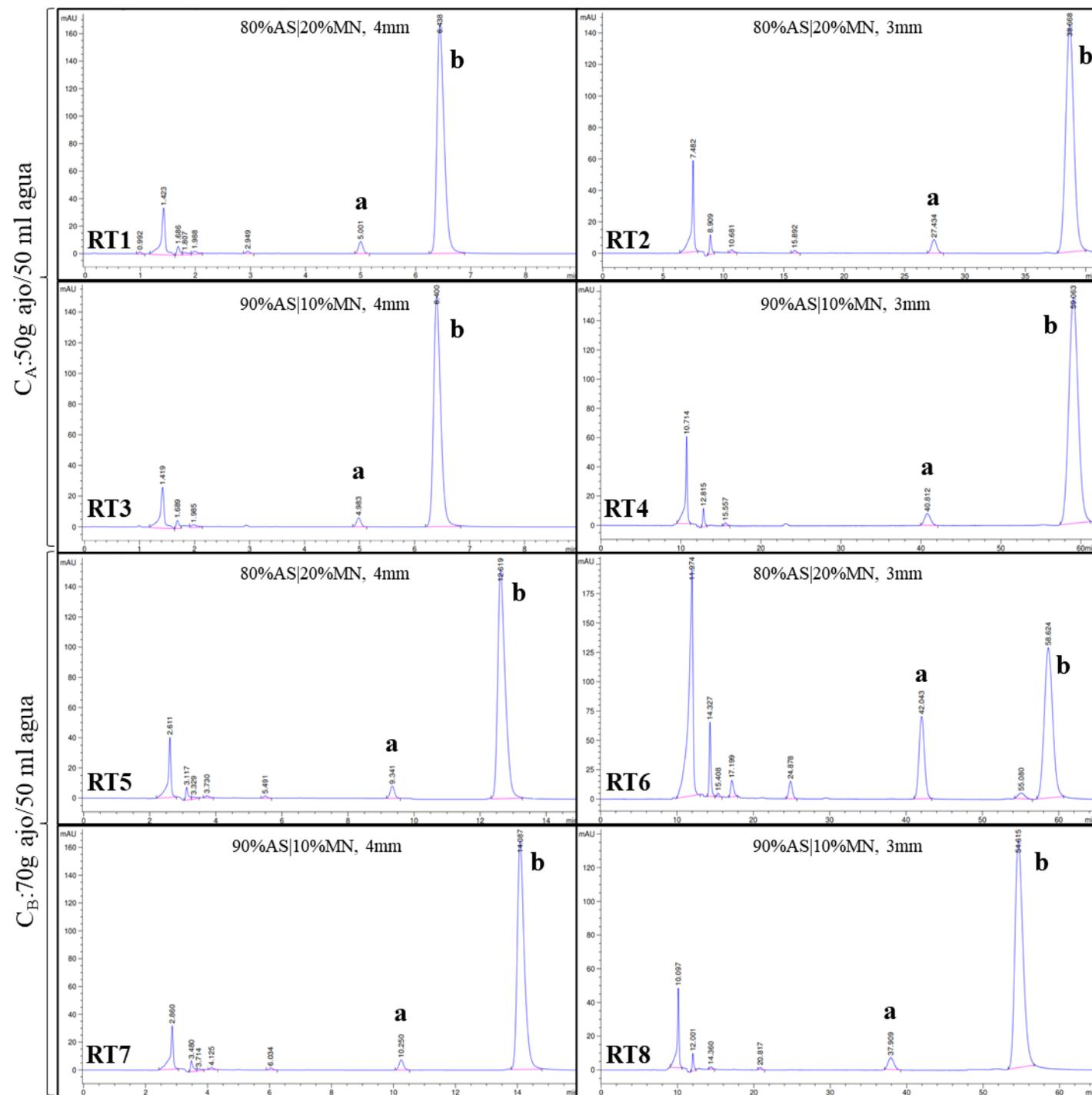


Figura A. 2 Cromatogramas de los encapsulados frescos. Réplicas. a) Alicina, b) etilparabeno.

C_A:50g ajo/50 ml agua

C_B:70g ajo/50 ml agua

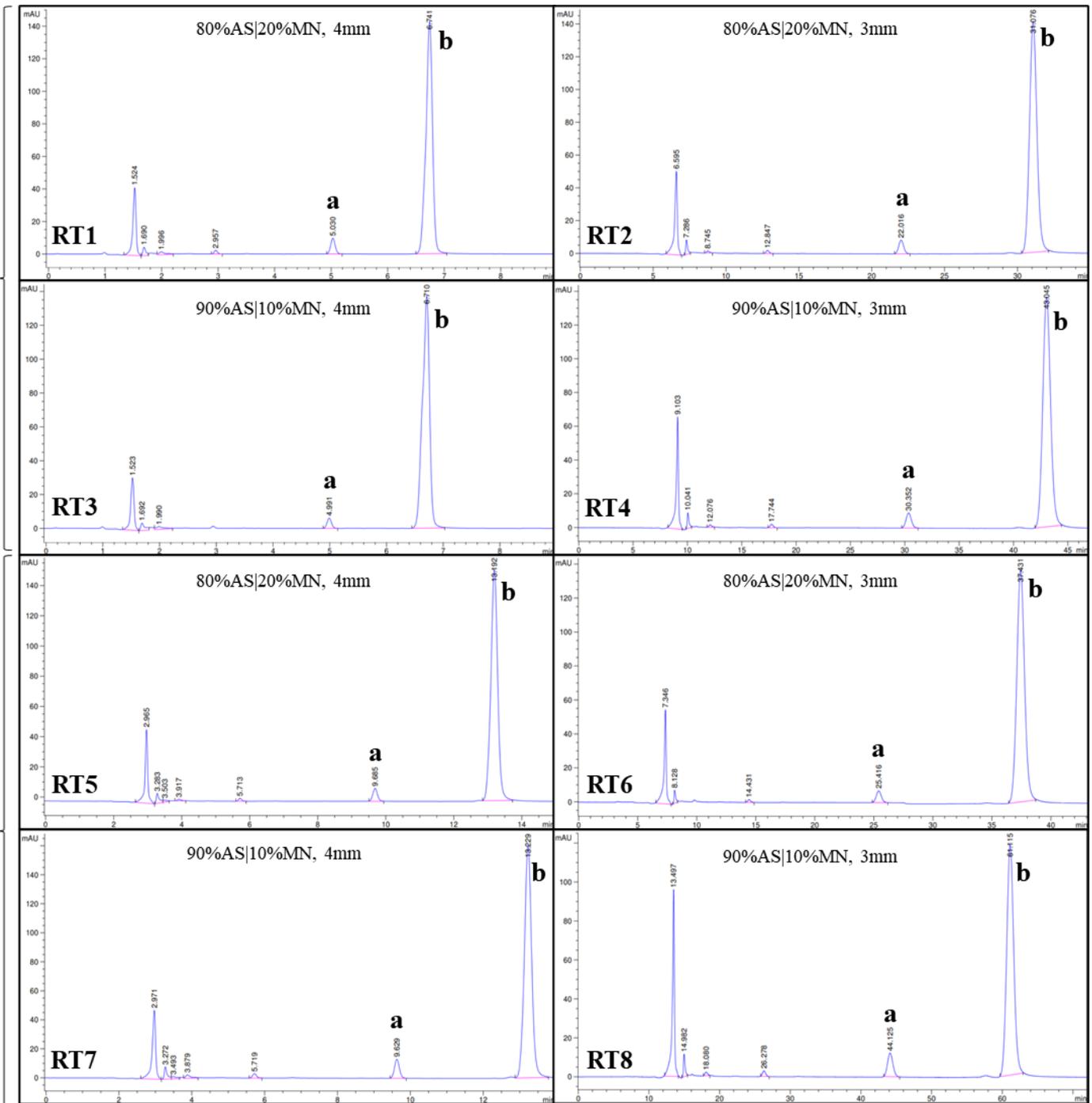


Figura A. 3. Cromatogramas de la solución iónica de las réplicas de los tratamientos.
a) Alicina, b) etilparabeno.

Anexos B – Espectros EDS

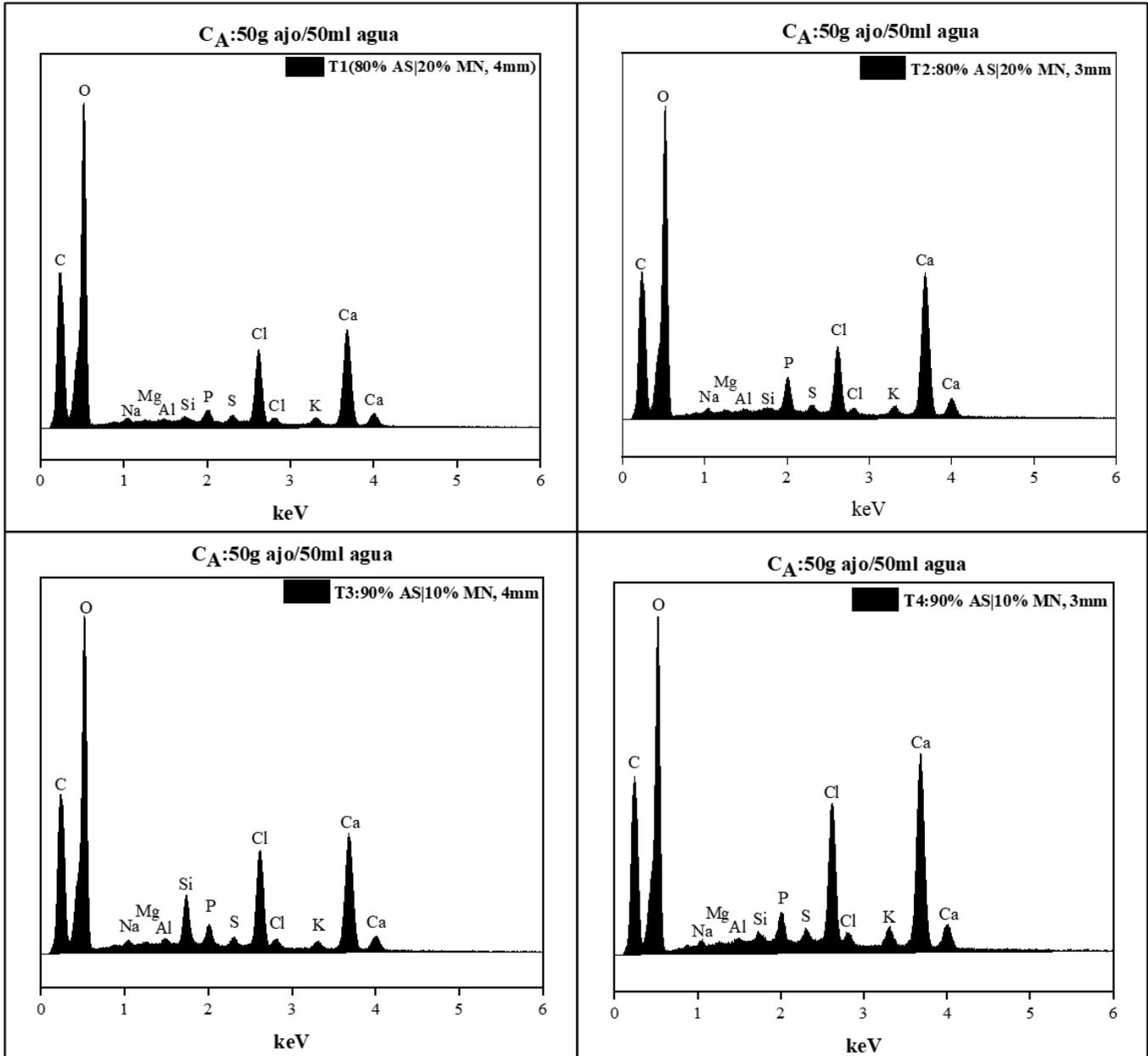


Figura B. 1. Espectros EDS de los encapsulados de los tratamientos de composición A.

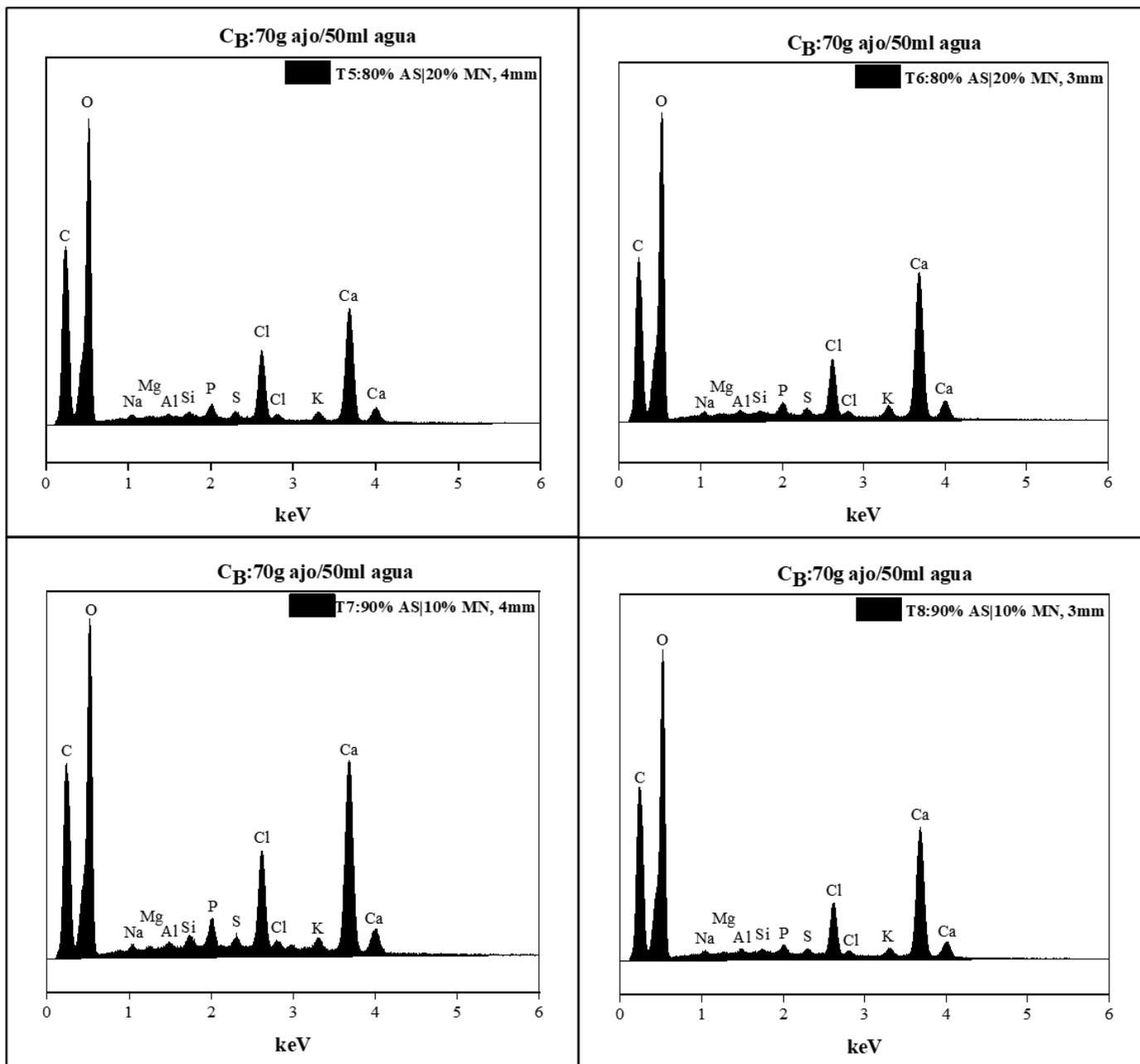


Figura B. 2. Espectros EDS de los encapsulados de los tratamientos de composición B.

Anexos C – Encapsulados secos



Figura C. 1. Encapsulados secos de extracto de ajo.



Figura C. 2. Encapsulados secos de extracto de ajo. Réplicas de los tratamientos.