



Microencapsulación de compuestos activos con quitosano

I. A. Flores - Belmont* y M. T. Jiménez - Munguía

*Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Universidad de las Américas Puebla.
Ex hacienda Sta. Catarina Mártir S/N, San Andrés Cholula, Puebla. C.P.72810, México.*

Resumen

La microencapsulación de diversos compuestos bioactivos empleando las técnicas de emulsión y extrusión, incrementa la biodisponibilidad de éstos. Además, el secado por atomización se ha reportado como una técnica muy viable, debido a que se obtienen partículas de diámetros pequeños y su aplicación es amplia. La elaboración de microcápsulas depende en gran medida del tipo de agente encapsulante utilizado. El quitosano es un biopolímero que, debido a su peso molecular y a su grado de desacetilación, resulta ser un buen material encapsulante. En la presente revisión se dan a conocer los principios de diversas técnicas de microencapsulación, en las cuales se ha utilizado al quitosano, resaltando las propiedades de éste como buen agente encapsulante.

Palabras claves: quitosano, microencapsulación, secado por atomización, extrusión, emulsión, compuestos bioactivos.

Abstract

The microencapsulation of several bioactive compounds, using the emulsification and extrusion techniques, increases the bioavailability of these. Besides, spray drying has been reported as a very efficient technology for microencapsulation due to the particles obtained of small particle diameters and its wide application. The preparation of microcapsules depends largely on the nature of the encapsulating agent used. Chitosan is a biopolymer that, due to its molecular weight and its degree of deacetylation, demonstrates to be a good encapsulating material. In this review, the principles of some microencapsulation techniques are presented, highlighting the use of chitosan as a good encapsulating agent.

Keywords: chitosan, microencapsulation, spray-drying, extrusion, emulsion, bioactive compounds.

Introducción

La estructura de los alimentos y el contenido de nutrientes son factores determinantes para la promoción de la actividad biológica de los compuestos bioactivos, los cuales benefician

a la salud (Onwulata, 2012). La microencapsulación es un procedimiento que incrementa o mantiene la viabilidad de diversos compuestos bioactivos. Actualmente, esta técnica se emplea para conservar una amplia variedad de probióticos, vitaminas, antioxidantes, sabores, entre otros.

*Programa de Maestría en Ciencia de Alimentos
Tel.: +52 222 229 2126, fax: +52 222 229 2727
Dirección electrónica: isela.floresbt@udlap.mx

Existen diversas técnicas para la microencapsulación de compuestos con actividad biológica, de las cuales, el secado por atomización, emulsificación y extrusión han reportado resultados favorables.

En la industria de alimentos se emplean diversos materiales que funcionan como recubrimiento, mejor conocidos como materiales encapsulantes. Estos materiales pueden ser de origen natural o sintético. Algunos biopolímeros biodegradables que se han sugerido en diversas investigaciones son colágeno, gelatina, albúmina, quitosano y alginato, entre otros.

Específicamente, el quitosano ha demostrado ser un excelente material encapsulante gracias a las propiedades que presenta, entre las que destacan la liberación selectiva de compuestos activos en el intestino, además de otorgar a las micropartículas mayor estabilidad, una forma más definida y un tamaño homogéneo.

En consecuencia, el propósito de esta revisión es proporcionar información acerca de las diversas técnicas de microencapsulación de compuestos activos con quitosano como material encapsulante.

Revisión bibliográfica

1. Microencapsulación de compuestos bioactivos

La microencapsulación es una técnica mediante la cual pequeñas gotas líquidas, partículas gaseosas o sólidas, se recubren con una pared polimérica porosa conteniendo una sustancia activa. El término microencapsulación en la industria de alimentos se refiere a la encapsulación de sustancias de bajo peso molecular o de

pequeñas cantidades de determinados compuestos (Parra, 2011). Lupo *et al.* (2012) se refieren a esta técnica como la obtención de una barrera que aletarga reacciones químicas, entre el compuesto activo y el medio ambiente, fomentando el aumento de la vida útil, promoviendo la liberación gradual y facilitando su manipulación al modificar el estado físico del compuesto activo.

En la industria, esta técnica ha obtenido un importante valor debido a la protección que adquieren las sustancias encapsuladas, resguardándolas de factores ambientales (calor y humedad) y salvaguardando su integridad cuando son empleadas en la elaboración de alimentos funcionales (Parra, 2011).

La selección de la técnica de microencapsulación adecuada se rige por las propiedades físicas y químicas del núcleo y el recubrimiento (material encapsulante) así como por la aplicación que se le dará a las microcápsulas obtenidas. La Tabla I muestra diferentes métodos usados para la preparación de sistemas alimentarios microencapsulados. Los materiales de recubrimiento normalmente son materiales capaces de formar películas y se pueden seleccionar de una amplia variedad de polímeros naturales o sintéticos, dependiendo el compuesto a encapsular (Desai y Park, 2005a).

2. Quitosano como agente encapsulante

Los materiales encapsulantes deben ser sustancias capaces de formar estructuras alrededor de los compuestos bioactivos (núcleo), llamadas paredes, que protejan al núcleo contra el deterioro y liberación bajo condiciones deseadas (Parra, 2011).

Estudios recientes aluden la importancia del quitosano como material encapsulante.

Tabla I. Materiales empleados para la microencapsulación de compuestos activos.

Categoría	Material encapsulante	Técnica empleada
Carbohidratos	Almidón, maltodextrina, quitosano, sólidos de jarabe de maíz, dextrina, almidón modificado, ciclodextrinas	Secado por atomización, extrusión, coacervación, inclusión
Celulosa	Carboximetilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa metilcelulosa, etil celulosa,	Coacervación, secado por atomización
Gomas	Goma acacia, agar, alginato de sodio, carragenina	Secado por atomización, emulsificación (formación de esferas)
Lípidos	Cera, parafina, cera de abejas, aceites, grasas	Emulsificación, formación de películas, liposomas
Proteína	Gluten, caseína, gelatina, albumina, péptidos	Emulsificación, secado por atomización

Adaptada de Desai y Park (2005a)

Según Lopretti *et al.* (2007), tanto el peso molecular como el grado de desacetilación (representando la porción de unidades desacetiladas) son características que hacen del quitosano un excelente material encapsulante, las cuales son determinadas por las condiciones de reacción mediante el proceso de preparación de éste.

En particular, el peso molecular del quitosano (50-2000 KDa) influye notablemente sobre el tamaño, potencial zeta, morfología y comportamiento de liberación controlada de compuestos bioactivos de las microcápsulas, así como en la eficiencia de encapsulación, cuando este compuesto es usado como material encapsulante (Desai y Park, 2006).

Como resultado de sus características, el quitosano muestra un alto potencial para la conservación efectiva de diversos compuestos bioactivos, además de una

liberación selectiva de estos compuestos (Ivanovska *et al.*, 2012).

La adición de sales (p. e. alginato de sodio) en una mezcla con quitosano, incrementa la solubilidad de los microgránulos, además de modificar las propiedades de las partículas. Específicamente, la incorporación de acetato incrementa el contenido de humedad y disminuye la densidad en los gránulos de quitosano-acetato respecto a los elaborados con una mezcla de quitosano y ascorbato. El empleo de agentes entrecruzadores (p. e. tripolifosfato) a la solución del biopolímero con sales, hace posible la modificación de la estructura de las micropartículas (Adamiee y Modrzejewska, 2005).

El planteamiento de las consideraciones antes descritas ha impulsado a la industria a investigar sobre materiales encapsulantes coadyuvantes a la microencapsulación, que

muestren una gran biocompatibilidad y garanticen la viabilidad de diversas sustancias activas, pudiendo así enriquecer la gama de productos funcionales accesibles a los consumidores.

En 1859, Rouget descubrió el quitosano, observando que al tratar a la quitina con una solución caliente de hidróxido de potasio se obtenía un compuesto soluble en ácidos orgánicos, al cual nombró “quitina modificada”. Este compuesto se tornaba de color violeta en soluciones diluidas de yoduro y ácido, mientras la quitina era verde. Hacia el año 1894, Hoppe-Seyler le otorgó el nombre de quitosano (Lárez, 2003).

La quitina es un polímero que se encuentra distribuido abundantemente en la naturaleza. Presenta una tasa de reposición alta en la biósfera (duplicando el porcentaje de reposición de la celulosa), lo que le otorga la clasificación de recurso renovable (Hernández *et al.*, 2009). La principal fuente de obtención de la quitina son los exoesqueletos de crustáceos (por ejemplo, camarones, cangrejos, langostas, entre otros).

El proceso de desacetilación completa de la quitina produce un compuesto soluble en medio ácido, mejor conocido como quitano. Cuando la desacetilación del material de partida es incompleta, se forma una mezcla de cadenas, la cual contiene diversas proporciones de unidades $\beta(1-4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa y $\beta(1-4)$ -2-amino-2-desoxi-D-glucosa. La relación existente entre éstas estriba en las condiciones de reacción, generando así compuestos con propiedades desiguales, como es el caso del quitosano (Lárez, 2003). Este compuesto es un polímero catiónico lineal, biodegradable, con un alto peso

molecular (Mármol *et al.*, 2011). Según Lárez (2006) y Paz *et al.* (2012), el quitosano se puede encontrar de forma natural en las paredes celulares de plantas y hongos; a nivel industrial la obtención de este compuesto a base de la desacetilación química o enzimática de la quitina, ha propiciado su producción a gran escala.

Lárez (2003) en su investigación afirma que la presencia de grupos aminos en la cadena polimérica del quitosano, le otorga a éste diversas propiedades que lo vuelven un material versátil, debido a la posibilidad de realizar numerosas modificaciones, entre las cuales se pueden citar el anclaje de enzimas, reacciones de injerto y obtención de películas, por mencionar algunas.

3. Técnicas de encapsulación con quitosano

Parra (2011) reporta diversas técnicas de microencapsulación, las cuales se dividen en dos: químicas y mecánicas. Esta tipificación se esquematiza en la Fig. 1, en donde se puede apreciar las subdivisiones de las clasificaciones mencionadas anteriormente.

Para fines particulares de este artículo, se han revisado diversas técnicas en las que se emplea quitosano como material encapsulante, sin embargo, las técnicas que han reportado resultados favorables y de las cuales hay mayor cantidad de aplicaciones son el secado por atomización y la extrusión.

3.1 Secado por atomización

El secado por atomización es el método de microencapsulación comúnmente empleado en la industria de alimentos. En esta técnica, una suspensión líquida o pasta de baja viscosidad, que contiene los componentes de la matriz de las micropartículas y diversos compuestos activos, se convierte en polvo de

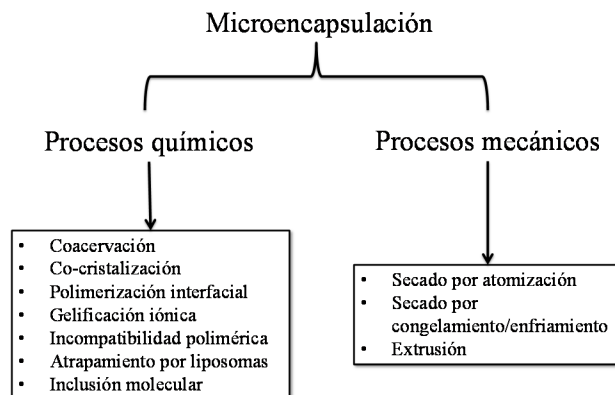


Fig. 1. Esquema de las diferentes técnicas de microencapsulación.

flujo libre. Este procedimiento implica la dispersión del material del núcleo en una solución de polímero, la cual puede ser una emulsión o dispersión. Posteriormente, la mezcla es atomizada en la cámara de secado, procedimiento que conduce a la evaporación del solvente y, por lo tanto, a la formación de microcápsulas sólidas. Entre las ventajas de esta técnica se encuentra la posibilidad de operar el procedimiento sobre una base continua. Las propiedades físicas del producto resultante, como el tamaño, forma de partículas y contenido de humedad, se pueden controlar a través de la configuración del equipo empleado y la manipulación de las variables del proceso (flujo de entrada y temperatura del secado) (Rodriguez *et al.*, 2012).

En algunas investigaciones (Desai *et al.*, 2006, Desai y Park, 2005b) el quitosano se ha utilizado como material encapsulante para proteger ácido ascórbico. Se concluye que el peso molecular del quitosano tiene una influencia notable tanto en la eficiencia de encapsulación como en el tamaño, potencial zeta, morfología de la superficie y velocidad de liberación en el intestino de las microesferas de ácido ascórbico. En general, el tamaño de partículas de vitamina C encapsuladas con quitosano osciló entre 4.1 y 4.7 μm ; sin embargo, el tamaño de

partícula se redujo ligeramente con agentes entrecruzadores como el tripolifosfato (TPP), formaldehído (FA) y glutaraldehído (GA), a una concentración de 2% p/p (Desai y Park, 2005b). La morfología de la superficie de las microcápsulas tiende a ser esférica y con una superficie lisa, sin embargo, el uso de un agente entrecruzador, específicamente FA o GA, permite obtener superficies más deprimidas (Desai y Park, 2005b). La eficiencia de la encapsulación y la tasa de liberación de este compuesto activo disminuyeron con el aumento en el peso molecular del biopolímero. Además, el ácido ascórbico no presentó problemas de dispersión en la suspensión del quitosano.

En otra investigación, en donde también encapsularon ácido ascórbico (Liu *et al.*, 2011), se demostró que tanto la temperatura de secado como el tiempo de almacenamiento de la solución de quitosano, además de la adición de lactosa, son factores que determinan la forma y las características de la superficie de las microcápsulas de quitosano. La lactosa fue añadida a la solución de quitosano, con la finalidad de controlar la viscosidad y de este modo determinar la influencia que el contenido de sólidos en la solución del biopolímero tiene sobre la morfología de las partículas. Al final se concluyó que la incorporación de

lactosa en conjunto con quitosano, sí modifica la morfología de las microcápsulas; a medida que la concentración de lactosa se incrementa se obtienen partículas con mayor grado de esfericidad y con una superficie más lisa.

Por otro lado, la microencapsulación de probióticos mediante secado por atomización es muy utilizada en la industria de alimentos; sin embargo, la aplicación del quitosano como agente encapsulante en este caso se encuentra en investigación, con la finalidad de establecer parámetros que garanticen la aplicación de este biopolímero como material de recubrimiento para la encapsulación de probióticos. En general, estos microorganismos han reportado tasas altas de supervivencia, mediante la optimización de las condiciones de la técnica y la incorporación de agentes de protección en la formulación antes del secado. Por ejemplo, Yang *et al.* (2010) reportaron que la incorporación de leche descremada, oligofructosa y povidona en formulaciones probióticas, permitió una supervivencia mayor al 60% de *Lactobacillus rhamnosus* y del 100% de *Bifidobacterium lactis*, cuando fueron encapsulados con quitosano.

Una de las principales desventajas de esta técnica es la pérdida de la viabilidad de los probióticos, resultante de la deshidratación simultánea y la inactivación térmica de las células probióticas. Ivanovska *et al.* (2012) propusieron añadir prebióticos durante el proceso de microencapsulación para disminuir las pérdidas de la viabilidad de los microorganismos encapsulados una vez que éstos se liberen. Al comparar la viabilidad de *L. casei* encapsulado con quitosano y quitosano-alginato-fructooligosacáridos, se observó que la mezcla del biopolímero más la sustancia prebiótica, incrementó la supervivencia del probiótico un total de cuatro ciclos logarítmicos, incrementando

así la viabilidad del microorganismo. Con el mismo objetivo, Kanmani *et al.* (2011) utilizaron una mezcla de quitosano-alginato de sodio más trehalosa al 5% e inulina al 1% para microencapsular *Streptococcus phocae*. Para determinar la supervivencia y la actividad metabólica o fermentativa de los probióticos, las cápsulas fueron almacenadas a -20, 4 y 35 °C durante seis meses. Al término del experimento se pudo constatar que la adición de sustancias prebióticas garantiza la supervivencia de probióticos encapsulados mediante esta técnica.

3.2 Extrusión

La microencapsulación por extrusión es una técnica de múltiples etapas. Mediante esta técnica se obtienen partículas esféricas de tamaño uniforme. El procedimiento inicia con una etapa de granulación, en donde se mezclan un agente bioactivo, estabilizadores y otros ingredientes con un aglutinante líquido (normalmente agua), para formar una masa húmeda o pasta. Posteriormente se procede a la extrusión, con tornillo o arietes, de la masa húmeda a través de un troquel que permite formar hebras cilíndricas de longitud y diámetro uniformes (Rokka y Rantamäki, 2010). Los filamentos formados se vuelven esferas al cortarlos en longitudes iguales antes del redondeo en pellets de forma esférica sobre una placa de marumerizado. Para concluir el procedimiento se procede a recoger las esferas húmedas, para secarlas en un lecho fluidizado o bien en un secador de bandeja (Bajaj *et al.*, 2010). La presión y la temperatura empleadas en este procedimiento son normalmente menos de 100 psi y alrededor de 115 °C. La funcionalidad de esta técnica se basa en la capacidad del material encapsulante de solidificarse al contacto con los líquidos, formando así una matriz que atrapa fácilmente al contenido del núcleo (Rodrigues *et al.*, 2012). En la industria de

alimentos, este método es usualmente empleado para la encapsulación de sabores y probióticos.

En diferentes estudios se investigó la viabilidad de diversos probióticos encapsulados con quitosano mediante la técnica de extrusión. Corbo *et al.* (2011) establecieron el rendimiento de encapsulación de partículas de quitosano y alginato. Para este estudio se determinó la viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii* y *L. plantarum*, los cuales se mantuvieron viables durante un periodo de 32.5 y 51.8 días, respectivamente. En general, el rendimiento de las partículas obtenidas fue del 50%. Por su parte, Ivanovska *et al.* (2012) reportaron que las células bacterianas de *L. acidophilus* y *L. casei*, sobrevivieron mejor en condiciones de pH bajo; además, *L. gasseri* y *Bifidobacterium bifidum* sobrevivieron en condiciones gastrointestinales simuladas, quedando así demostrada su viabilidad y, por lo tanto, la adecuada aplicación de la técnica para la conservación de estos probióticos.

Azarnia *et al.* (2008) encapsularon *L. rhamnosus* con quitosano y alginato (2% p/v) de sodio, y observaron que a medida que la concentración del quitosano incrementaba (0-0.3% p/v), la eficiencia del encapsulado y la viabilidad del probiótico encapsulado fueron superiores. También evaluaron la eficiencia de las partículas después de la incorporación de CaCl_2 como agente entrecruzador y encontraron que conforme las concentraciones de quitosano (1% p/v) y CaCl_2 (1M) aumentaban, se obtuvieron superficies de partícula lisas, tamaños pequeños ($<1\mu\text{m}$) y formas más homogéneas. Por otro lado, Charoenthai *et al.* (2007) emplearon la técnica de extrusión/esferonización, para la obtención de gránulos de quitosano con celulosa microcristalina y alginato de sodio. Las partículas elaboradas con quitosano de bajo

peso molecular (190 kDa) mostraron una forma más definida. Mediante esta técnica se logró utilizar al biopolímero en una concentración del 60% (p/p) con la ayuda del alginato de sodio, lo que resultó en una excelente capacidad de liberación del fármaco encapsulado. Debido a que esto último no ha sido probado en alimentos, se considera que sería interesante investigar más sobre esta técnica.

3.3 Emulsificación

La técnica de microencapsulación por emulsificación está definida como el procedimiento de dispersión de un líquido en otro en el cual es inmiscible, en donde la fase dispersa consta de la matriz que incluye el compuesto bioactivo a encapsular. Esta metodología requiere la adición de un tensoactivo para mejorar la formación y estabilidad de la emulsión, además de facilitar la distribución de tamaño de partículas. Puede realizarse utilizando el mismo mecanismo que la gelificación, tanto interna como externa. En general, el proceso de gelificación se inicia a partir de una solución de sal de alginato y una fuente de calcio externa o interna desde donde el ión calcio puede difundirse formando así una cadena polimérica, reordenando la estructura de los compuestos, y dando como resultado la formación de materiales sólidos capaces de encapsular sustancias activas (Lupo *et al.*, 2011).

Por su parte, la gelificación externa en emulsión se forma a partir de la dispersión de una mezcla de una solución quitosano-componente, en una fase continua no acuosa, después de la adición de una fuente de calcio capaz de fundirse en la fase dispersa, incidiendo así en la gelificación y dando lugar a la encapsulación. La gelificación interna se cimenta en la liberación del ión calcio desde un complejo insoluble adicionando un agente secuestrante,

contenido en una solución de quitosano-componente, el cual es dispersado en una fase continua no acuosa formando una emulsión agua en aceite (w/o). La liberación del calcio se presenta mediante la adición de un ácido orgánico soluble en la fase continua, disminuyendo el pH del medio, solubilizando la sal y dando pie a la gelificación (Lupo *et al.*, 2011).

En alimentos, este procedimiento se ha empleado para la encapsulación de *B. bifidum* y *L. acidophilus*, incrementando la viabilidad de éstos al mantener vivas el número total de bacterias probióticas encapsuladas con quitosano y alginato. Se demostró que las colonias de *L. rhamnosus* encapsuladas en una matriz de quitosano y alginato, mantuvieron su viabilidad durante más de 48 h a pH 2, mientras que los microorganismos no encapsulados no sobrevivieron a estas mismas condiciones. Los microorganismos encapsulados mediante esta técnica fueron empleados para la elaboración de quesos por Parra (2011).

En otro estudio se determinó que *L. casei* encapsulado con quitosano mediante esta técnica, disminuyó su viabilidad celular en 0.5 ciclos logarítmicos, mientras que *L. acidophilus* y *L. rhamnosus* mostraron una eficacia de atrapamiento (UFC/g encápsuladas en un sistema, en relación a las UFC/g inoculadas) del 99.8%. En contraparte, la encapsulación de *L. rhamnosus* mediante una emulsión doble empleando quitosano y sólidos de suero de leche como emulgentes, disminuyó la viabilidad del probiótico 1.5 ciclos logarítmicos (Ivanovska *et al.*, 2012).

Conclusión y comentarios finales

La microencapsulación es una técnica que promueve la subsistencia de diversas

sustancias con actividad biológica. El quitosano es un biopolímero que, recientemente, se ha empleado como material encapsulante y que ha demostrado tener biocompatibilidad con distintos compuestos bioactivos (vitaminas y probióticos). La adición de diversos compuestos al quitosano como agentes entrecruzadores, modifica sustancialmente las características de las partículas formadas. En general, tanto el secado por atomización, como la extrusión y la emulsificación, resultan ser técnicas viables para la obtención de microcápsulas de compuestos bioactivos recubiertas con quitosano, debido a que promueven la formación de microcápsulas con diámetros de partícula pequeños y formas homogéneas.

Agradecimientos

La autora Isela A. Flores Belmont reconoce al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la Universidad de las Américas Puebla (UDLAP), por el financiamiento otorgado para sus estudios de posgrado.

Referencias

- Ademiec, J. y Modrzejewska, Z. 2005. Some structural properties of spray-dried chitosan microgranules. *Drying Technology*. 23:1601-1611.
- Azarnia, S., Lee, B. H., Robert, N. y Champagne, C. P. 2008. Microencapsulation of recombinant aminopeptidase (PepN) from *Lactobacillus rhamnosus* S93 in chitosan coated alginate beads. *Journal of Microencapsulation*. 25(1):46-58.
- Bajaj, P. R., Survase, S. A., Bule, M. V. y Singhal, R. S. 2010. Studies on viability of *Lactobacillus fermentum* by microencapsulation using extrusion spheronization. *Food Biotechnology*. 24:150-164.
- Corbo, M. R., Bevilacqua, A. y Sinigaglia, M. 2011. Shelf life of alginate beads containing lactobacilli

- and bifidobacteria: characterization of microspheres containing *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. *International Journal of Food Science & Technology*. 46: 2212-2217.
- Charoenthai, N., Kleinebudde, P. y Puttipipatkachorn, S. 2007. Use of chitosan-alginate as alternative pelletization aid to microcrystalline cellulose in extrusion/spheronization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 96(9):2469-2484.
- Desai, K. G., Liu, C. y Park, H. J. 2006. Characteristics of vitamin C encapsulated tripolyphosphate-chitosan microspheres as affected by chitosan molecular weight. *Journal of Microencapsulation*. 23(1):79-90.
- Desai, K. G. y Park, H. J. 2005a. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*. 23:1361-1394.
- Desai, K. G. y Park, H. J. 2005b. Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying. *Journal of Microencapsulation*. 22(2):179-192.
- Desai, K. G. y Park, H. J. 2006. Effect of manufacturing parameters on the characteristics of vitamin C encapsulated tripolyphosphate-chitosan microspheres prepared by spray-drying. *Journal of Microencapsulation*. 23(1):91-103.
- Hernández, H., Águila, E., Flores, O., Viveros, E. L. y Ramos, M. E. 2009. Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y Vacío*. 22(3):57-60.
- Ivanovska, T. P., Petruševska-Tožil, L., Kostoska, M. D., Geškovski, N. y Grozdanov, A. 2012. Microencapsulation of lactobacillus casein in chitosan-Ca-alginate microparticles using spray-drying method. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*. 31:115-123.
- Kanmani, P., Kumar, R. S., Yuvaraj, N., Paari, K. A., Pattukumar, V. y Arul, V. 2011. Cryopreservation and microencapsulation of probiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastrointestinal conditions. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 16:1106-1114.
- Lárez, C. 2003. Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 4(2):91-109.
- Lárez, C. 2006. Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en Química*. 1(2):15-21.
- Liu, W., Duo-Wu, W., Selomulya, C. y Dong-Chen, X. 2011. Uniform chitosan microparticles prepared by a novel spray-drying technique. *International Journal of Chemical Engineering*. 2(1):1-7.
- Lopretti, M., Barreiro, F., Fernandes, I., Damboriarena, A., Ottati, C. y Olivera, A. 2007. Microencapsulación de compuesto de actividad biológica. *Publicación Anual del Laboratorio Tecnológico del Uruguay*. 2:19-23.
- Lupo, B., González, C. y Maestro, A. 2012. Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 3(1):130-151.
- Mármol, Z., Páez, G., Rincón, M., Araujo, K., Aiello, C., Chandler, C. y Gutiérrez, E. 2011. Quitina y quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. *Revista Tecnocientífica URU*. 1:53-58.
- Onwulata, C. I. 2012. Microencapsulation and functional bioactive foods. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2012:1-23
- Parra, R. A. 2011. Revisión: microencapsulación de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. 63(2):5669-5684.
- Paz, N., Fernández, M., López, O. D., Nogueira, A., García, C. M., Pérez, D., Tobella, J. L., Montes, Y. y Díaz, D. 2012. Optimización del proceso de obtención de quitosano derivada de la quitina de langosta. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 13(3):103-116.
- Rodrigues, F., Sarmiento, B., Andrade, J. y Oliveira, B. 2012. Review: can microencapsulation be a means to increase survival of probiotics in cheese? *International Journal of Probiotics and Prebiotics*. 7(2):65-80.
- Rokka, S. y Rantamäki, P. 2010. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *European Food Research and Technology*. 231:1-12.
- Sris.s, J., Seethadevi, A., Prabha, K. S., Muthuprasanna, P. y Pavitra, P. 2012. Microencapsulation: a review. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 3(1):509-531.
- Yang, D., Chi, M., Sanguansri, L., Weerakkody, R., Bugar, I. y Agustin, M. A. 2010. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG powders: relationship of powder physical properties to probiotic survival during storage. *Journal of Food Science*. 75(9):588-595.