



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Aportes al desarrollo de un producto microencapsulado a base de aceite esencial de tomillo con posible aplicación en producción avícola

Sandra Xilena Ojeda Gómez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia

2021

Aportes al desarrollo de un producto microencapsulado a base de aceite esencial de tomillo con posible aplicación en producción avícola.

Sandra Xilena Ojeda Gómez

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Farmacéuticas

Directora:

Ph.D. Sc., M Sc., Q.F. Yolima Baena Aristizábal.

Línea de Investigación:

Diseño y desarrollo de productos fitofarmacéuticos.

Grupo de Investigación:

TECPRONA

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2021

A la familia que formé, mi esposo Nick y mi hija María Celeste. Gracias por el apoyo, el tiempo prestado y la comprensión.

A la familia que me formó, mis padres y hermanos, no habría pisado este peldaño sin los sacrificios previos.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.


Sandra Xilena Ojeda Gómez

Fecha 26/11/2021

Agradecimientos

A la profesora Yolima Baena Aristizábal, por haberme aceptado como su tesista, por todas las enseñanzas y orientaciones impartidas, por su tiempo, apoyo, paciencia y disposición para lograr los objetivos.

Al profesor Germán Matiz Melo, por sus asesorías, apoyo y provisión de algunos elementos necesarios para efectuar ensayos.

Al profesor Jorge Ariel Martínez, por su asesoría en lo relacionado al análisis de cromatografía de gases.

A la Universidad Nacional de Colombia, a la Facultad de Ciencias, principalmente al Departamento de Farmacia, docentes y administrativos, donde pude llevar a cabo esta formación y adquirir los conocimientos y competencias para llegar a este punto. Igualmente, a la Vicerrectoría de investigación y la Alianza con la Universidad de Cundinamarca, por proveer la financiación de la presente investigación.

A los laboratoristas Jorge, Patricia, Rigoberto y Dora, por su gran colaboración en las oportunidades que lo requerí.

A mis compañeras y compañeros de los grupos de investigación TECPRONA y SILICOMOBA, quienes fueron no sólo un apoyo técnico significativo sino una compañía agradable que en algunos casos se transformó en una gran amistad: Alejandro Guiza, Angie Yepes, Juan Carrascal, Lina Sanabria, David Porras, Angie Sánchez, Aura Moreno, Laura Martínez, Lorena Arévalo, Valentina Preciado, Valentina Beltrán y a los demás integrantes del grupo de investigación.

A los compañeros de maestría que me asistieron cuando fue necesario: Álvaro Sierra, Angélica Velandia, Alexander Puentes y Daniel Parra.

Resumen

Aportes al desarrollo de un producto microencapsulado a base de aceite esencial de tomillo con posible aplicación en producción avícola

El aceite esencial de tomillo (AET) ha sido propuesto y respaldado por diversas investigaciones para su uso como promotor de crecimiento en pollos de engorde, sin embargo, su aplicación directa se dificulta debido a su inestabilidad asociada a su alta volatilización y oxidación. El objetivo de esta investigación fue microencapsularlo mediante secado por aspersión para mejorar sus propiedades farmacotécnicas y de estabilidad, empleando como biopolímeros de recubrimiento a la goma arábiga (G), la maltodextrina (M) y al almidón de ñame succinatado (AÑS). Se establecieron las condiciones de emulsificación y, mediante la aplicación de un diseño estadístico experimental (DEE), las de microencapsulación. El AET fue identificado y cuantificado por cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas, sus componentes mayoritarios fueron D-limoneno (45,65%), timol (18,26%) y p-cimeno (15,30%). El quimiotipo identificado no coincidió con los reportados de *Thymus Vulgaris*, por lo cual se nombró como quimiotipo D-limoneno. Las condiciones de obtención de las micropartículas fueron: relación aceite/biopolímeros 1:6, biopolímeros G/M/AÑS, flujo de nitrógeno 601 L/h, flujo de aspiración 32 m³/h, flujo de alimentación 3 mL/min y temperatura de inyección 138°C. Se caracterizaron las microcápsulas obtenidas en cuanto a propiedades organolépticas, rendimiento del proceso (48,5%), eficiencia de encapsulación (87,47%), eficiencia de carga (78,83%), tamaño de partícula (74,50 µm), span (2,36), fluidez (baja) y morfología (entre esférica y ovalada). El ensayo de estabilidad evidenció la protección física que proporcionó la cubierta polimérica al AET para disminuir su volatilización y las pérdidas presentadas podrían estar relacionadas con la porosidad de la matriz y la posible degradación de los componentes que hacen parte del aceite. Se sugiere que este microencapsulado cumple con las propiedades farmacotécnicas básicas para evaluar su posible aplicación como promotor de crecimiento en la producción de pollos de engorde.

Palabras clave: aceite esencial de tomillo, promotor de crecimiento, microencapsulación, secado por aspersion, almidón modificado.

Abstract

Contributions to the development of a microencapsulated product based on thyme essential oil with possible application in poultry production

Thyme essential oil (TEO) has been proposed and supported in different researchs for its use as a growth promoter in broilers. However, its direct application is difficult due to its instability related to its high volatilization and oxidation. The aim of this research was to microencapsulate it by spray drying to improve its pharmacotechnical and stability properties, using gum arabic (G), maltodextrin (M) and succinated yam starch (SYS) as coating biopolymers. The emulsification conditions were established and, through the application of an experimental statistical design (ESD), the microencapsulation conditions. TEO was identified and quantified by gas chromatography coupled to mass spectroscopy; its main components were D-limonene (45.65%), thymol (18.26%) and p-cymene (15.30%). The identified chemotype did not coincide with those reported for *Thymus Vulgaris*, and for that reason it was named the D-limonene chemotype. The conditions for obtaining the microparticles were: oil/biopolymers ratio 1:6, G/M/SYS biopolymers, nitrogen flow 601 L/h, aspiration flow 32 m³/h, feeding flow 3 mL/min and temperature of injection 138°C. The microcapsules obtained were characterized in terms of organoleptic properties, process yield (48,5%), encapsulation efficiency (87,47%), loading capacity (78,83%), particle size (74,50 µm), span (2,36), fluidity (low) and morphology (between spherical and oval). The stability test evidenced the physical protection provided by the polymeric coating to the TEO to reduce its volatilization and the losses presented could be related to the porosity of the matrix and the possible degradation of the components that are part of the oil. It is suggested that this microencapsulate meets the basic pharmacotechnical properties to evaluate its possible application as a growth promoter in the production of broilers.

Keywords: thyme essential oil, growth promoter, microencapsulation, spray drying, modified starch.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras	XV
Lista de tablas	XVI
Lista de Símbolos y abreviaturas	XVIII
Introducción	1
Objetivos	4
1. Aspectos teóricos	5
1.1 Producción avícola	5
1.2 Fisiología del pollo	6
1.2.1 Aspectos de la fisiología aviar que influyen en el diseño de los sistemas	6
1.3 Aditivos promotores de crecimiento	8
1.4 Restricciones y problemas asociados a los APC	9
1.5 Aceites esenciales como alternativa a los APC	12
1.5.1 Mecanismos de acción de los aceites esenciales	14
1.6 Aceite esencial de tomillo	16
1.6.1 Inestabilidad del aceite esencial de tomillo	20
1.7 Microencapsulación	23
1.7.1 Secado por aspersion/atomización (Spray drying)	24
1.8 Biopolímeros	26
1.9 Estado del arte	28
2. Metodología	35
2.1 Materiales y Equipos	35

2.1.1	Materiales	35
2.1.2	Equipos	35
2.2	Métodos.....	36
2.2.1	Obtención y modificación del almidón de ñame	36
2.2.2	Caracterización de materias primas.....	38
2.2.2.1	Aceite esencial de tomillo.....	38
2.2.2.2	Almidón de ñame modificado.....	39
2.2.3	Preparación de las emulsiones	40
2.2.4	Elaboración de las microcápsulas.....	42
3.	Resultados	49
3.1	Caracterización de las materias primas	49
3.1.1	Aceite esencial de tomillo.....	49
3.1.2	Almidón de ñame modificado.....	53
3.1.3	Condiciones de emulsificación y caracterización	56
3.1.4	Microencapsulación y caracterización de las microcápsulas.....	58
4.	Conclusiones y recomendaciones.....	67
4.1.	Conclusiones	67
4.2.	Recomendaciones.....	70
	Bibliografía	71

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Representación de una microcápsula (120).....	23
Figura 1-2: Morfología de las microcápsulas (120)	24
Figura 1-3: Principales procesos involucrados en el secado por aspersión (121)	25
Figura 3-1: Cromatograma del aceite esencial de tomillo (20 μ L/980 μ L), obtenido mediante GC/MS con impacto electrónico.	50
Figura 3-2: Aspecto del almidón de ñame succinatado.	54
Figura 3-3: Aspecto de las emulsiones formadas después de 24 h en reposo.	55
Figura 3-4: Espectro infrarrojo del almidón de ñame nativo y del almidón modificado por succinatación	56
Figura 3-5: Aspecto de las emulsiones seleccionadas para el DEE.....	57
Figura 3-6: Influencia de los factores frente a <i>t</i> y su significancia en las variables respuesta	59
Figura 3-7: Aspecto de las micropartículas de la formulación definida.....	62
Figura 3-8: Aspecto microcápsulas de aceite esencial de tomillo visualizadas por microscopía electrónica de barrido	63
Figura 3-9: Aspecto microcápsulas vacías visualizadas por microscopía electrónica de barrido.....	63
Figura 3-10: Comportamiento de la concentración del D-limoneno en función del tiempo a 30°C, 75% de humedad relativa (n=5).....	65

Lista de tablas

Tabla 1-1: Investigaciones reportadas sobre el uso del tomillo, sus partes y su aceite esencial como promotores de crecimiento en aves de corral	18
Tabla 1-2: Estudios de aplicabilidad del tomillo en producción avícola realizados en Colombia hasta el año 2021	29
Tabla 1-3: Investigaciones relacionadas con la microencapsulación de aceite esencial o extractos de tomillo	30
Tabla 1-4: Estudios que reportan el uso de almidones modificados en microencapsulación	34
Tabla 2-1: Ensayos previos para determinar las condiciones de emulsificación	41
Tabla 2-2: Factores y niveles del diseño estadístico experimental.....	43
Tabla 2-3: Experimentos del diseño estadístico experimental fraccionado 2 ⁵	43
Tabla 3-1: Perfil de composición del aceite esencial de tomillo obtenido mediante GC/MS.....	49
Tabla 3-2: Componentes mayoritarios del aceite esencial de tomillo reportados por otros investigadores en Colombia.....	52
Tabla 3-3: Grado de sustitución de los lotes de almidón hidrolizado y lipofilizado con reactivo OSA.....	54
Tabla 3-4: Capacidad emulsificante de los almidones de ñame modificado y nativo.....	55
Tabla 3-5: Condiciones de emulsificación del aceite esencial de tomillo con las matrices seleccionadas.....	57
Tabla 3-6: Condiciones para la obtención de los experimentos del diseño estadístico experimental	58
Tabla 3-7: Resultados de las variables caracterizadas para los experimentos del diseño estadístico experimental	58
Tabla 3-8: Resultados del análisis estadístico del diseño estadístico experimental	60
Tabla 3-9: Condiciones seleccionadas para la formulación de microcápsulas.....	60

Tabla 3-10: Resultados de la variación de la concentración de D-limoneno, para tres lotes del aceite esencial de tomillo microencapsulado, en función del tiempo a 30°C y 75% de humedad relativa.....	64
---	----

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos

Símbolo	Término
<i>L</i>	Litro
<i>h</i>	Hora
<i>m</i> ³	Metro cúbico
<i>mL</i>	Mililitro
<i>min</i>	Minuto
°C	Grado centígrado
μm	Micrómetro
<i>t</i>	Tonelada
<i>mt</i>	Millones de toneladas
<i>mm</i>	Milímetro
<i>Da</i>	Dalton
%	Porcentaje
<i>g</i>	Gramo
μL	Microlitro
<i>km</i>	Kilómetro
<i>N</i>	Normalidad
<i>cps</i>	Centipoises
<i>rpm</i>	Revoluciones por minuto
<i>mg</i>	Miligramo
<i>nm</i>	Nanómetro

Abreviaturas

Abreviatura Término

<i>APC</i>	Antibiótico(s) promotor(es) de crecimiento
<i>TGI</i>	Tracto gastrointestinal
<i>OMS</i>	Organización Mundial de la Salud
<i>FAO</i>	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
<i>FDA</i>	Agencia de Administración de Alimentos y Medicamentos
<i>UE</i>	Unión Europea
<i>G/M</i>	Goma arábica y maltodextrina
<i>G/M/AÑS</i>	Goma arábica, maltodextrina y almidón de ñame succinatado
<i>AÑS</i>	Almidón de ñame succinatado
<i>T/SL</i>	Niveles de tolerancia
<i>MRL</i>	Niveles de residuos máximos
<i>ATP</i>	Adenosin trifosfato
<i>FCR</i>	Tasa de conversión alimenticia
<i>HDL</i>	Colesterol de alta densidad
<i>LDL</i>	Colesterol de baja densidad
<i>T</i>	Temperatura
<i>OSA</i>	Anhídrido octenil succínico
<i>SEM</i>	Microscopia electrónica de barrido
<i>GC/MS</i>	Cromatografía de gases acoplada a detector de masas
<i>PS</i>	Porcentaje de sustitución
<i>AG</i>	Anhidroglucosa
<i>ER</i>	Emulsión remanente
<i>DEE</i>	Diseño estadístico experimental
<i>EE</i>	Eficiencia de encapsulación

Introducción

La industria avícola es un sector de gran importancia en el país y en el mundo, gracias al cual disponemos de alimentos que son incluidos con alta frecuencia y proporción en nuestra nutrición, como la carne y los huevos de pollo. Desde 1950, esta industria ha utilizado aditivos promotores de crecimiento, principalmente antibióticos, en la alimentación de pollos de engorde con el fin de incrementar la productividad y competitividad (1), dado que estos productos mejoran el estatus fisiológico y nutricional del ave (2).

Sin embargo, en el 2006 se prohibió completamente el uso de antibióticos como promotores de crecimiento (APC) en Europa (3), de acuerdo con la directriz EC/1831/2003, fundamentándose en los problemas de salud pública que actualmente se presentan por causa de la resistencia de los patógenos a los antibióticos y que, en este caso, se favorece por resistencia cruzada y residuos en los tejidos (4). Se ha planteado un horizonte en el que a nivel mundial se dé una prohibición del uso de los APC; de hecho, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ya ha sentado esta posición en el Plan mundial sobre la resistencia antimicrobiana. En el objetivo cuatro de este plan, propone a los estados miembros adoptar medidas para el abandono gradual del uso de los antibióticos en el fomento del crecimiento de los animales y la protección de las cosechas, en ausencia de un análisis de riesgos y la reducción en el uso no terapéutico de los medicamentos en la salud animal (5). Aunado a esto, las preferencias de los consumidores de hoy en día se encaminan hacia el uso de productos de origen natural, ya que buscan poner en práctica los conceptos ambientalistas y bajo el impulso de la creencia que éstos ofrecen mayor seguridad y menor toxicidad que los productos de origen sintético.

En Colombia, los APC son aprobados por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), y hasta la fecha su única reglamentación está dada por la Resolución 1966 de 1984 (6), donde se permite el uso de estos antimicrobianos si no son utilizados en la farmacoterapia humana ni para el tratamiento de enfermedades en la misma especie. Cabe destacar que en la Imprenta Nacional de Colombia (7), se encuentra publicado el proyecto de ley 104 de 2008 del Senado de la República, el cual en su artículo seis planteaba como objetivo reducir gradualmente el número de antibióticos usados en la producción pecuaria y, en un lapso no mayor a cinco años, prohibir el uso de APC en las granjas animales.

Debido a lo expuesto anteriormente, se visualiza que la reglamentación en Colombia se orientará a la prohibición de estos productos. Se hace necesario, entonces, la disponibilidad de alternativas en promotores de crecimiento, las cuales permitan modificar la flora intestinal potenciando la ganancia de peso en las aves sin constituir un riesgo de salud pública, ya que el no uso de éstos tiene consecuencias negativas tales como la disminución de la productividad e incremento de la aparición de enfermedades (8).

Se han planteado y utilizado diversas alternativas a los antibióticos en la alimentación tales como ácidos orgánicos, enzimas, pre y probióticos y especialmente hierbas y productos a base de hierbas, como aceites esenciales. Diversos estudios han investigado y respaldado la utilización de aceites esenciales como alternativa para la optimización de la producción de pollos de engorde (4), los cuales son catalogados como “generalmente reconocidos como seguros (GRAS)” por la Agencia de Administración de Alimentos y Medicamentos FDA (9). Desde la antigüedad, la humanidad ha utilizado las plantas con fines terapéuticos para su aplicación tanto en humanos como en animales, algunos de estos efectos se dan por los compuestos que provienen de sus aceites esenciales.

El aceite esencial de tomillo, proveniente de la especie *Thymus vulgaris*, es conocido por sus propiedades antimicrobianas (10), antifúngicas (11), antioxidantes, antiinflamatorias, entre otras; ha sido estudiado y propuesto como una interesante opción de promotor de crecimiento de tipo natural para aves de corral (12). No obstante, por sus características volátiles y susceptibilidad a la oxidación, estas propiedades no pueden ser aprovechadas en todo su potencial bajo el estado natural del aceite esencial (13).

El objetivo de este estudio fue microencapsular aceite esencial de tomillo utilizando como material de recubrimiento una mezcla de biopolímeros, almidón de ñame modificado con anhídrido octenil succínico (OSA), goma arábica y maltodextrina, con el propósito de proporcionarle protección frente a la oxidación y evitar o disminuir la volatilización de sus componentes permitiéndole así la estabilidad requerida para su uso en la alimentación de pollos de engorde.

La presente investigación hace aportes a una formulación de aceite esencial de tomillo con potencial uso como promotor de crecimiento, para la obtención de micropartículas mediante la técnica de secado por aspersión y su caracterización.

Objetivos

Objetivo general

Microencapsular aceite esencial de tomillo empleando biopolímeros que le confieran propiedades farmacotécnicas y de estabilidad adecuadas para su uso potencial en la alimentación de pollos de engorde.

Objetivos específicos

Plantear un diseño estadístico experimental que permita seleccionar las condiciones del proceso para la obtención de los sistemas en estudio.

Evaluar las propiedades farmacotécnicas y de estabilidad de los sistemas obtenidos de manera que sean adecuadas para su uso potencial en la alimentación en pollos.

1. Aspectos teóricos

1.1 Producción avícola

La avicultura o producción avícola es la práctica de criar aves con un objetivo comercial, el cual puede dividirse en dos grandes nichos: la venta de huevos y la venta de carne (14). A nivel mundial, la producción de carne de pollo ha experimentado un alto crecimiento a través de los últimos 50 años. Según estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la producción creció de 7,5 millones de toneladas (mt) en 1961 a 92,8 mt en 2012, con un crecimiento promedio anual de 4,9%, superando el consumo de la carne de res y logrando la segunda posición en producción después de la carne de cerdo (15). En Colombia, la avicultura también ha tenido un crecimiento constante, se aumentó la producción desde 30 mil toneladas de carne de pollo en 1961 a un poco más de un millón en 2012, representando un crecimiento del 7,1% promedio anual, incrementando el aporte del 7,0% en 1961 al 50,4% en 2012. (16).

Es importante anotar que actualmente la nutrición aviar está encaminada a superar los retos y dificultades de la producción comercial industrial tales como rendimientos de producción en el menor tiempo y costo y la prevención de enfermedades zoonóticas como salmonelosis y campilobacteriosis. Por tal razón, se ha buscado optimizar las funciones del aparato digestivo como los procesos de digestión y absorción de nutrientes, la barrera intestinal, respuesta inmune y microflora a un mínimo nivel de empleo de nutrientes y alcanzando las necesidades de mantenimiento y productividad (8).

1.2 Fisiología del pollo

El pollo, nombre científico *gallus domesticus*, es una subespecie doméstica que procede de la especie *Gallus gallus* (gallo rojo de la jungla) (17), es un ave gregaria la cual ha sido utilizada durante siglos por el hombre como parte de su alimentación, dadas las facilidades para su cría y producción en comparación con otros animales.

El sistema digestivo de esta especie está conformado por boca, esófago, buche, proventrículo, molleja, intestino delgado, intestino grueso y cloaca (18). El tránsito del alimento empieza en la boca y luego es conducido hacia el buche, cavidad donde se mezcla con el mucus para su remojo. Seguidamente pasa hacia el proventrículo o estómago glandular, donde el alimento es mezclado con ácidos gástricos. Luego éste ingresa a la molleja, en la cual es triturado mediante la compresión con piedras de carbonato de calcio o *grits*. Finalmente, el alimento continúa el recorrido hacia el intestino delgado, pasa luego al intestino grueso y desemboca en la cloaca. La velocidad de digestión es rápida, se reporta una duración entre tres y cinco horas (19).

1.2.1 Aspectos de la fisiología aviar que influyen en el diseño de los sistemas

Los pollos tienen un pobre sentido del gusto y del olfato, por lo cual, a la hora de comer, se basan principalmente en lo visual; de esta manera, seleccionan el alimento por la medida, el color y la forma de partícula (17).

En cuanto a la preferencia por tamaño de partícula, Moran sugirió que podría estar relacionado con las dimensiones del pico y la forma más cómoda de tomar el alimento; debido a esto, la edad del pollo de engorde tendrá influencia en la selección del tamaño del alimento (20). Algunos investigadores han estudiado estos efectos, tales como Lott y colaboradores, quienes concluyeron que los pollos recién nacidos no seleccionan las partículas con un diámetro geométrico medio (DGM) mayor de 1,19 mm, sino por el contrario reducen el consumo (21). A su vez, Nir y colaboradores encontraron un DGM adecuado de 0,7-0,9 mm para pollitos en dietas basadas en maíz, mientras que los pollos adultos prefieren partículas superiores a 1,20 mm (22,23). Huang y De Beer reportaron

preferencia por tamaños de partícula entre 0,86 – 2,0 mm en pollitos de 1 a 14 días de edad, rechazando partículas inferiores a 0,86 mm (24). Aunado a la preferencia de los pollos, se ha respaldado el uso de partículas groseras por favorecer el peristaltismo digestivo y la utilización de nutrientes, mientras que las partículas pequeñas pueden causar atrofia de la molleja, cuya función es de trituración (22).

En cuanto a la forma del alimento, diversos estudios respaldan la granulación como la mejor estrategia para mejorar la productividad, en comparación con el material en polvo (25–27). Lo anterior, debido a que reduce la selección y los residuos, mientras aumenta la digestibilidad de los nutrientes y el consumo de pienso (28).

Cabe anotar que los APC son administrados con el alimento (29), mientras que para administrar medicamentos la primera opción es por el agua de bebida y secundariamente en el alimento (30).

Por otro lado, se ha estimado que la absorción del aceite esencial de tomillo podría darse en el estómago y el intestino delgado proximal del pollo, con base en lo reportado en un estudio de Michels y colaboradores sobre la degradación *in vitro* y la cinética de paso *in vivo* de carvacrol, timol, eugenol y trans-cinamaldehído a lo largo del tracto gastrointestinal (TGI) en lechones, quienes concluyeron que estos compuestos se absorbieron principal o casi completamente en el estómago y en el intestino delgado proximal después de la administración oral (31). Por su parte, Ocel'ová y colaboradores determinaron el contenido de timol en segmentos intestinales individuales (duodeno, yeyuno, íleon, ciego y colon) de pollos de engorde después de cuatro semanas de suplementación dietética con diferentes concentraciones de aceite esencial de tomillo, concluyendo que se da una absorción intensiva de timol en las secciones iniciales del tracto digestivo (32). No se han reportado estudios sobre la cinética de paso de aceites esenciales o sus compuestos en pollos a lo largo del TGI. Sin embargo, teniendo en cuenta la rápida velocidad de digestión mencionada anteriormente (entre tres y cinco horas) (19), se infiere que la concentración liberada para el sistema propuesto debe lograrse en un corto tiempo. Aunque en un principio se pretendía evaluar la liberación de los sistemas que se desarrollaron, por motivo de la pandemia por Covid-19 fue necesario solicitar reajuste de objetivos eliminando de la tesis esta fase.

1.3 Aditivos promotores de crecimiento

Un promotor del crecimiento o ergotrópico es definido como cualquier elemento que, al ser incorporado en pequeñas cantidades en la dieta, logra acelerar el crecimiento del animal, reflejándose en un aumento de su peso y talla, requiriendo menor tiempo y comida para alcanzar el peso necesario para el sacrificio. En otros términos, es aquella sustancia capaz de aumentar la velocidad de crecimiento, mejorar la conversión alimenticia disminuyendo el consumo de alimento y disminuir la morbilidad y mortalidad (33). Bajo esta aplicación se utilizan antimicrobianos, enzimas, ácidos grasos, hormonas, probióticos, prebióticos y aceites esenciales o extractos de plantas.

Desde los años cuarenta se descubrió que los antibióticos podían mejorar el rendimiento del crecimiento de las aves de corral y a partir de entonces han sido ampliamente utilizados por la industria avícola (33).

Un antibiótico promotor de crecimiento (APC) es aquel empleado en dosis bajas o subterapéuticas en la alimentación rutinaria del animal para destruir o inhibir bacterias, mejorando la conversión alimenticia y la ganancia de peso y reduciendo la morbilidad y mortalidad debido a enfermedades infecciosas (8). Se ha estimado que el promedio del mejoramiento del crecimiento está entre 4 - 8% y la eficiencia alimenticia entre 2 - 5% (34).

Generalmente, los APC tienen un efecto predominante contra los microorganismos Gram positivos, y se han propuesto varios modos de acción para su actividad; sin embargo, el efecto más reconocido es a través de un mecanismo metabólico antibacteriano (35). Las hipótesis planteadas sobre sus mecanismos de acción son:

- Protección de nutrientes contra infecciones bacterianas.
- Mejor absorción de nutrientes por la disminución de la barrera del intestino delgado (flora microbiana) o una pared intestinal más delgada.
- Disminución de la producción de toxinas de las bacterias intestinales que deprimen el crecimiento (amoníaco y ácido láctico).
- Reducción en la incidencia de infecciones intestinales subclínicas.

- Disminución de procesos inflamatorios que generan gastos energéticos e inmunológicos en el huésped.
- Aumento de la tasa de división celular de los enterocitos alterando la barrera intestinal, favoreciendo la translocación bacteriana e inhibiendo la máxima absorción de nutrientes.
- Menor competencia por el uso de nutrientes con los microorganismos.

1.4 Restricciones y problemas asociados a los APC

El problema principal asociado al uso de los APC es la resistencia a los antibióticos, la cual ha sido ampliamente reportada por investigaciones científicas. La resistencia a los antimicrobianos es definida por la OMS como la capacidad que tienen los microorganismos de impedir que los antimicrobianos actúen contra ellos. En consecuencia, los tratamientos habituales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten (5). Esta resistencia se deriva de un fenómeno evolutivo natural de los microorganismos, ya que, al ser expuestos al antimicrobiano, los más sensibles mueren y sobreviven aquellos resistentes, estos transmiten los genes resistentes a su descendencia. Debido a la variación genética normal en las poblaciones bacterianas, los organismos individuales portan mutaciones que hacen que los antibióticos sean ineficaces, transmitiendo una ventaja de supervivencia a la cepa mutada (36). Dado que muchos antibióticos pertenecen a la misma clase de medicamentos, la resistencia a un agente antibiótico concreto puede llevar a la resistencia a toda una clase conexas, es lo que se conoce como resistencia cruzada. Además, la resistencia que se manifiesta en un organismo puede propagarse de forma rápida e impredecible, por ejemplo, mediante el intercambio de material genético entre diferentes bacterias (37–39).

El uso de antibióticos en la industria ganadera con fines productivos contribuye al problema general de la resistencia a los antibióticos (40), constituyéndose en una amenaza significativa, ya que los organismos resistentes a patógenos en los animales están listos para ingresar al suministro de alimentos y podrían diseminarse ampliamente en dichos productos (41–46). Se han encontrado, por ejemplo, bacterias comensales en productos cárnicos frescos, las cuales pueden ser reservorios para genes resistentes que podrían transferirse potencialmente a organismos patógenos en humanos (47,48).

Adicionalmente, han reportado diferentes clases de compuestos antimicrobianos (comúnmente en concentraciones $>100 \mu\text{g/L}$) en lagunas de almacenamiento de desechos porcinos y múltiples clases de compuestos antimicrobianos en muestras de aguas superficiales y subterráneas recolectadas cerca de las granjas avícolas y porcinas, demostrando que los desechos animales utilizados como fertilizantes para cultivos también son una fuente de residuos antimicrobianos en el medio ambiente (49,50) .

El Comité Suizo realizó el primer paso hacia el control del uso de APC en 1969. Este organismo restringió su empleo en ausencia de prescripciones veterinarias y en 1971 prohibió el uso sub-terapéutico de tetraciclinas y otros antibióticos de amplio espectro en las dietas para animales (8). En 1986, Suiza estableció la prohibición parcial sobre el uso de antibióticos en granjas de animales y fue el primer país en hacerlo. Se intensificaron los argumentos en contra de los APC con las investigaciones sobre cepas multi-resistentes de *Staphylococcus* a principios de los noventa.

En octubre de 1997, la OMS organizó una conferencia para considerar el "impacto médico del uso de agentes antibacterianos en los animales destinados a la alimentación", en la cual se reconoció la importancia de los agentes antibacterianos en los animales y los beneficios de su uso. Por otra parte, se consideró la preocupación sobre el impacto en la salud pública y médica que podría generarse por el uso de los APC, aceptando que la magnitud de este impacto seguía siendo desconocida. Finalmente, se recomendó que los APC deberían eliminarse, principalmente si presentan alguna relación posible con la resistencia a los compuestos utilizados en la salud humana, que deberían revisarse las prácticas nacionales sobre el uso de agentes antibacterianos en animales, que la resistencia debería mantenerse bajo vigilancia y que se consideraran de forma activa las alternativas a los antibióticos promotores del crecimiento que no representaran riesgo a la salud humana (35).

La Unión Europea (UE) prohibió la comercialización y el uso de antibióticos como promotores del crecimiento en la alimentación animal a partir del primero de enero de 2006. Desde entonces, el uso de antibióticos sólo está permitido con la prescripción veterinaria para aplicaciones directas o como alimento medicado, fundamentándose en

las recomendaciones de la OMS, la FAO y la Organización Mundial para la Salud Animal (51).

Estados Unidos ha prohibido un gran número de antibióticos tales como la avoparcina, ardacina, espiramicina, tilosina, virginiamicina, carbadox y olanquinox, y aquellos que son permitidos están bajo estricta reglamentación por parte de la FDA y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). En 2015, adoptaron el Plan de acción nacional para combatir las bacterias resistentes a los antibióticos con el objetivo de reducir la propagación de la resistencia a los antibióticos a través de la administración a todos los niveles (52).

En la mayoría de los países se han establecido niveles de tolerancia (T/SL) o niveles de residuos máximos (MRL) de los antibióticos en los tejidos de animales destinados para el consumo humano, bajo el concepto de que el fármaco puede ser usado sin riesgo en la terapéutica humana. En el Codex Alimentarius se han establecido T/SL y MRL de muchos antibióticos. Un país puede establecer sus propios niveles o aceptar los del Codex Alimentarius.

En Colombia, las regulaciones al respecto están bajo responsabilidad del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). La normatividad relacionada está consignada en la Resolución 1966 de 1984 (6); al igual que muchos países, se permite el uso de los APC sólo si no son utilizados en la farmacoterapia humana, tampoco se permite para la antibioticoterapia en la misma especie. No obstante, en el proyecto de Ley 104 de 2008 del Senado de la República se incluyó como objetivo “reducir gradualmente el número de antibióticos usados en la producción pecuaria y, en un lapso no mayor a cinco años, prohibir el uso de antibióticos como promotores del crecimiento en las granjas animales” (7). Se puede deducir que el horizonte en Colombia será migrar hacia regulaciones más exigentes hasta la prohibición total del uso de APC, adoptando los lineamientos internacionales de países de alta regulación.

No obstante, también se presentan consecuencias negativas por la prohibición de los APC sin reemplazo por alternativas, como las que se describen a continuación (35):

- Efectos económicos dados los efectos negativos en la productividad. También conlleva un gran esfuerzo en el ajuste de las dietas y las técnicas de gestión.

- Efectos en la salud animal. La eliminación de APC puede aumentar los problemas de salud en pollos, por ejemplo, aparición de enteritis necrótica, y en cerdos donde la mortalidad posterior al destete aumenta.
- Efectos ambientales. Se ha calculado que la eliminación de los APC aumenta sustancialmente la contaminación ambiental debido al mayor número de animales necesarios para producir la misma cantidad de alimento.
- Efectos en el consumo de antibióticos. La abolición del uso de APC puede conducir a una reducción global en el uso general de agentes antibacterianos, no obstante, podría presentarse un aumento del uso de antibióticos terapéuticos.

Del impacto que tendría la abolición total del uso de los APC en nuestro país como el que ha tenido en la UE, ha surgido la necesidad de proponer, diseñar y disponer de alternativas a los APC que ofrezcan los mismos beneficios sin representar un riesgo para la salud pública. Los investigadores han estudiado los aceites esenciales, enzimas digestivas, pre y pro-bióticos, ácidos orgánicos, entre otros (53–57).

1.5 Aceites esenciales como alternativa a los APC

Los aceites esenciales son sustancias líquidas, mezclas de compuestos volátiles, aislados de plantas medicinales, de carácter lipofílico y con fuertes propiedades aromáticas (58). Son sintetizadas por las plantas como metabolitos secundarios ejerciendo funciones de defensa frente a organismos patógenos, herbívoros e incluso contra otras plantas (8). Asimismo, las protegen de procesos abióticos que causan estrés, como la desecación y la radiación ultravioleta y también sirven para atraer a organismos beneficiosos como los polinizadores (59). Estos efectos son logrados gracias a sus propiedades como antibacterianos, antioxidantes, antivirales, antifúngicos e insecticidas. Presentan una composición química compleja pues derivan de la mezcla de sustancias orgánicas como hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, terpenos, entre otros, de peso molecular menor de 400 Da y presión de vapor suficientemente alta para volatilizarse a temperatura ambiente (60).

Los aceites esenciales pueden contener entre 20 y 60 compuestos de diferentes estructuras químicas, los cuales pueden variar en su concentración. Sus propiedades y actividad biológica son atribuidas a los componentes mayoritarios (20-70%) (61), aunque se considera que su bioactividad es debida al sinergismo de su diversidad bioquímica. Se ha indicado que los terpenos son los componentes fundamentales de los aceites esenciales, por ejemplo el timol, un monoterpeno derivado natural de fenol de cimeno, isómero con el carvacrol, que se encuentra presente en cantidades significativas en el aceite del tomillo (62).

Hay diversos métodos para la extracción de aceites esenciales tales como la destilación, el ultrasonido, el empleo de grasas animales para absorber los compuestos volátiles (enfleurage), el arrastre con vapor y fluidos supercríticos; son seleccionados según las necesidades y la relación costo/beneficio (63). Las técnicas más empleadas son métodos de destilación simple o físicos, como la hidrodestilación y la metodología del arrastre por vapor, ya que son de fácil empleo y bajos costos de producción (64).

Diversos investigadores han demostrado que los aceites esenciales poseen propiedades antibacterianas, antimicóticas, antiparasitarias, insecticidas, antioxidantes, antiinflamatorias (65), analgésicas, anticancerígenas, anticoccidiales y como promotores de crecimiento (8). Otras actividades fisiológicas comprenden funciones diuréticas y endocrinológicas. Se ha indicado que los aceites esenciales pueden influir en el sistema inmune mejorando la eficacia de los granulocitos y los macrófagos (4).

Los aceites esenciales constituyen una alternativa atractiva a los APC, se enmarcan tanto en el perfil de la agricultura y la alimentación actual, como en las tendencias del consumidor moderno que considera los productos naturales mejores y más seguros. Son catalogados como “generalmente reconocidos como seguros (GRAS)” por la FDA y respaldados por diversas investigaciones para su utilización como aditivos promotores de crecimiento (4).

En comparación con los APC, los aceites esenciales presentan la ventaja que, al ser mezclas de compuestos en lugar de compuestos únicos, es menos probable que se manifiesten fenómenos de resistencia (4). También se ha afirmado que las hierbas aromáticas y los aceites esenciales mejoran el sabor y la palatabilidad de los piensos, lo

que se puede asociar con el incremento en la ingesta de alimento. Se ha evidenciado que los aceites esenciales y compuestos aromáticos pueden afectar favorablemente funciones intestinales. Asimismo, presentan mejor biodegradabilidad comparados con antibióticos y conservantes químicos disponibles en el mercado (62) .

No obstante, hay una marcada desventaja de los aceites esenciales respecto a los APC debido a la variabilidad o heterogeneidad de sus compuestos y una menor capacidad inhibitoria, lo que conlleva a suministrar dosis bastante elevadas, entre 10 y 100 veces la dosis normal de un APC (3), lo cual no resulta rentable.

1.5.1 Mecanismos de acción de los aceites esenciales

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales no se atribuye a solo un mecanismo debido a la diversa variedad de componentes químicos presentes, se plantea que se da a varios niveles en las células microbianas (66). Se ha sugerido que esta acción antimicrobiana depende del carácter lipofílico o hidrofílico del aceite esencial. Se han propuesto efectos bactericidas y bacteriostáticos (capsaicina, carvacrol, cinamaldehido, eugenol, alicina, cineol, y curcumina) e incluso efectos coccidiostáticos (carvacrol) (67).

Se ha demostrado que los compuestos fenólicos pueden interferir con el metabolismo celular a través de diversos mecanismos como complejo-sustrato, disrupción de la membrana, la inactivación de las enzimas y la quelación de metal (68). Estos grupos poseen un anillo aromático, un grupo hidroxilo y otros grupos, como el tertbutilo o el isopropilo, que alteran la polaridad y la topografía de la molécula y por lo tanto pueden cambiar la afinidad de la misma con sitios de unión diferentes en la bacteria así como la hidrofobicidad y descripciones estéricas (tamaño molecular y forma) influyen en su actividad antibacteriana (8). La disrupción de las membranas contribuye al modo de acción de los grupos fenólicos como el eugenol, carvacrol y el timol. A diferencia de muchos antibióticos, los constituyentes hidrofóbicos de los aceites esenciales son capaces de entrar en el periplasma de las bacterias Gram-negativas a través de las proteínas de la membrana externa (69).

Un modo de acción de los compuestos de aceites esenciales como antimicrobianos es el rápido agotamiento de la reserva de adenosín trifosfato (ATP) intracelular reduciendo su síntesis y, simultáneamente, promoviendo su hidrólisis (4). Esto se lleva a cabo mediante la reducción del potencial eléctrico transmembrana, que es la fuerza impulsora de la síntesis de ATP, lo que potencia la permeabilidad protónica de la membrana, permitiendo la fuga de iones, como potasio y fosfato, y provocando alteraciones de la presión osmótica de las células (69–71). Asimismo, se han observado cambios en las composiciones de ácidos grasos de las membranas celulares bacterianas a dosis subletales de varios compuestos de aceites esenciales (72).

Otro modo de acción reportado es el del carvacrol, el cual previene la síntesis de flagelina, causando que las células bacterianas sean afiladas y, por lo tanto, no motrices. Debido a esto, las células son significativamente menos capaces de adherirse a las células epiteliales, conllevando a que cepas potencialmente patógenas de las bacterias no sean infecciosas (73).

Como modificadores digestivos, se han demostrado que los aceites esenciales utilizados como aditivos para la alimentación de los pollos de engorde pueden mejorar las actividades de la tripsina y la amilasa en homogeneizados tisulares del páncreas, así como el contenido de quimo yeyunal (74–76).

En cuanto a su actividad antioxidante, se fundamenta principalmente en los compuestos fenólicos en el aceite esencial o en otras fracciones fitoquímicas, aunque algunas sustancias no fenólicas también pueden mostrar un considerable antioxidante potencial (4). Gracias a esta actividad, se contribuye a la protección de los lípidos de alimentación ante el daño oxidativo. De igual forma, los aceites esenciales pueden afectar el metabolismo de los lípidos en el animal: un suministro dietético de aceite de tomillo o timol a ratas envejecidas mostró un efecto beneficioso sobre las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, así como sobre la composición de ácidos grasos poliinsaturados en diversos tejidos. Se observaron mayores niveles de enzima y concentraciones más altas de ácidos grasos poliinsaturados en fosfolípidos del cerebro en los animales que recibieron el suplemento respecto a los controles no tratados (77).

El mecanismo de la acción antioxidante de los aceites esenciales no se conoce con seguridad. No obstante, se ha sugerido que el γ -terpineno, presente en varios aceites esenciales como el de tomillo, actúa como antioxidante al retardar la peroxidación del ácido linoleico, porque los radicales peroxilo formados a partir de éste (HOO-) reaccionan rápidamente con los radicales peroxilo del ácido linoleico (8). Adicionalmente, se ha demostrado que algunos aceites esenciales y sus fitoconstituyentes poseen la capacidad de atrapamiento del catión-radical 2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolina-ácido sulfónico) ABTS+ y del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo DPPH igual o superior a la de antioxidantes sintéticos como la vitamina E, el trolox y el ácido ascórbico (78).

Se puede encontrar variación en la composición química de los aceites esenciales debido a factores diversos como la especie, la época de la recolección, la edad de la planta al corte, las condiciones geográficas, prácticas agronómicas y el método de extracción (64).

1.6 Aceite esencial de tomillo

El tomillo (*Thymus vulgaris* L.) es una planta que pertenece a la familia Lamiaceae. Es una planta perenne, subarbusto o arbusto, a veces con forma herbácea pero leñosa en la base, y contiene numerosas ramas (79); intensamente aromática; su tallo varía entre erecto a prostrado; posee hojas simples, enteras o algunas lanceoladas que miden entre tres y ocho mm de largo; las flores están dispuestas en racimos verticilos, son de color blanco a pálido, tubulares y tienen el cáliz de color rojizo vinoso, de una sola pieza, con la garganta obstruida por pelitos blancos, dividido en dos labios. Es originaria del Mediterráneo, ampliamente cultivada en clima montañoso, templado y subtropical de América y el Caribe. Hay más de 300 especies de este género que son nativas del sur de Europa y Asia (64).

Los principales componentes reportados de esta planta son timol (5-metil-1-2-isopropil fenol) y carvacrol (5-isopropil-1-2-isopropil fenol), a los que se atribuyen sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas, para el tratamiento de enfermedades respiratorias, curación de heridas, beneficios carminativos del estómago y características vermífugas

(74,80,81). Los extractos hidrofílicos de las partes aéreas secas de tomillo contienen ingredientes biológicamente activos, especialmente polifenoles: ácido cafeico y sus oligómeros, flavonas, flavanonas, flavanonol (taxifolina), glucósidos de monoterpeneo, y glucósidos de fenol simples, arbutina, acetofenona glucósidos, compuestos de bifenilo y polisacárido ácido (82,83).

La variedad verde del tomillo es reconocida como la medicina herbal y especia más popular utilizada en todo el mundo (84). El uso medicinal de *Thymus vulgaris* está indicado en casos de tos seca, tos ferina, bronquitis, laringitis, amigdalitis (como gárgaras), asma, infección urinaria, gastritis crónica, dispepsia y otras alteraciones gastrointestinales. Se aplica externamente para infecciones fúngicas, reumatismo, artritis, amigdalitis e infecciones de las encías (85).

Los aceites esenciales volátiles del tomillo están presentes en sus innumerables pelos glandulares en diferentes formas, se evaporan cuando los pelos glandulares se dañan y producen esencias concentradas que rodean a la planta (86).

Se ha comprobado la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Thymus vulgaris* frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (87), *Bacillus cereus*, *Proteus vulgaris*, *Vibrio spp* (88), *Listeria monocytogenes*, *Propionibacterium acnes* (89), *Candida albicans* (90), *Aspergillus spp.*, *Alternaria spp.*, *Fusarium spp.* y *Penicillium spp* (10)(11); además, actividad citotóxica en tres líneas celulares de cáncer humano: células de carcinoma de próstata humano (PC-3), carcinoma pulmonar humano (A549) y cáncer de mama humano (MCF-7), y significativa actividad antioxidante (91).

Se ha reportado que el tomillo tiene beneficios en la producción de aves de corral (57,92,93), lo cual es de esperarse dado la actividad antimicrobiana del tomillo. Estos efectos se han reportado tanto solos como en combinación con otros agentes. A continuación, en la Tabla 1-1 se mencionan algunos estudios que soportan el uso del tomillo, sus partes y su aceite esencial como promotores de crecimiento en aves de corral (84).

Tabla 1-1: Investigaciones reportadas sobre el uso del tomillo, sus partes y su aceite esencial como promotores de crecimiento en aves de corral.

Investigadores	Año de publicación	Material estudiado	Conclusiones
Langhout (94)	2000	Aceite de tomillo	Mejora la digestión de nutrientes en las aves de corral y la función hepática.
Zeweil (95)	2003	Flores de tomillo (1 g/kg)	El peso corporal y la tasa de conversión alimenticia de codornices japonesas mejoraron.
Zhang et al. (96)	2005	Aceite de tomillo	Alternativa prometedora para los promotores de crecimiento antibióticos.
Bolukbasi et al. (97)	2006	Aceite de tomillo (200 ppm)	Mayor peso del cadáver caliente y de las alas.
Cross et al. (98)	2013	10 g/kg de hierba (tomillo) o 1 g/kg de aceite esencial	La inclusión de aceite de tomillo y tomillo en hierba en la dieta tuvo efectos positivos sobre el rendimiento de los pollos. Principales compuestos del aceite esencial de tomillo son el timol y el carvacrol, constituyendo el 20-55%.
Ocak et al. (99)	2008	Hojas de tomillo (0.2%)	Mejor ganancia de peso.
Al-Kassie (100)	2009	Aceite de tomillo (100 - 200 ppm)	Aumento del consumo de alimento, el peso corporal, así como la tasa de conversión alimenticia (FCR), el porcentaje de aliño, hígado, corazón, molleja y disminución de la grasa abdominal. Concluyó que el incremento del consumo de alimento y del peso en pollos de engorde se deben al timol y carvacrol, componentes principales del aceite esencial del tomillo.

Investigadores	Año de publicación	Material estudiado	Conclusiones
El-Ghousein y Al-Beitawi (81)	2009	Tomillo triturado al 1,5 o 2%	Aumento del peso corporal, el peso vivo, el porcentaje de aliño, las piernas, los pechos, las alas y los porcentajes totales de partes comestibles, mientras que disminuía el consumo de alimento y la mortalidad.
Toghyani et al. (101)	2010	Polvo de tomillo (5 g/kg)	Aumento de la ganancia de peso corporal en pollos de engorde.
Mansoub (102)	2011	Polvo de tomillo (1g/kg)	Aumento de la ganancia de peso y la eficiencia de la alimentación.
Al-Mashadani et al. (103)	2011	Aceite de tomillo (300 mg) solo o con anís (300 mg)	El peso corporal vivo aumentó significativamente en pollos de engorde entre los 28 y los 38 días de edad.
Fallah y Mirzaei (104)	2016	Tomillo en polvo (5 g/kg) y mezcla de tomillo y cúrcuma en polvo (2,5 g/kg cada uno)	Aumento del peso corporal, la ingesta de alimento y mejora la FCR de los pollos de engorde a los 42 días de edad. Disminución de triglicéridos séricos, HDL y LDL, y mejora de producción de anticuerpos en pollos de engorde a los 18 y 28 días de edad.

En contraste, Sarica y colaboradores (2005) reportaron que no encontraron efecto significativo sobre el rendimiento del crecimiento, la concentración de colesterol plasmático total, el contenido de materia de las excretas, el peso relativo de algunos órganos internos (excepto los rasgos del intestino delgado), los rendimientos de canales fríos y calientes, y las concentraciones de bacterias aeróbicas totales y *E. coli* en el intestino delgado con la adición de un APC (flavomicina) y de dos aditivos naturales de hierbas (tomillo y ajo) con y sin un complejo enzimático basado en xilanasa en los pollos de engorde. Sugirieron que bajo condiciones limpias y desinfectadas de desafío bacteriano mínimo y en jaulas de alambre individuales es posible una reducción de la eficacia de cualquier aditivo alimentario y que estos efectos beneficiosos de los

promotores de crecimiento pueden observarse en condiciones de vivienda menos higiénicas y cuando se incluyen niveles más altos de trigo en las dietas (105).

Asimismo, Haselmeyer (2015) estudió el efecto del timol en cuatro concentraciones de 0.1, 0.2, 0.3 y 1.0% como aditivo para alimento en pollos de engorde. No se observó una diferencia significativa en el rendimiento durante todo el período de crecimiento (35 días). Con altos niveles dietéticos de hierba de tomillo, las concentraciones de timol aumentaron en el contenido intestinal y el plasma, pero fueron muy bajas en tejidos comestibles como el hígado y la pulpa (106).

Por otra parte, es importante resaltar que los factores geo-climáticos y el tipo de suelo pueden dar origen a diferentes quimiotipos de la planta, de los cuales se obtendrán aceites esenciales con variaciones en cuanto a su composición química, propiedades sensoriales y actividad biológica (107). En el caso del tomillo se distinguen, por lo menos, cuatro quimiotipos, de acuerdo con sus compuestos mayoritarios en el aceite esencial:

- (I) Timol y p-cimeno;
- (II) Carvacrol, timol y borneol;
- (III) Linalool, terpinen-4-ol y acetato de linalilo y
- (IV) Geraniol y acetato de geraniol.

Los quimiotipos I y II presentan una actividad antibacteriana fuerte y son irritantes, mientras que los quimiotipos III y IV no son irritantes y su actividad antibacteriana es moderada. El aceite del quimiotipo III de tomillo posee un efecto sedativo debido a la presencia del linalool, alcohol monoterpénico, y su acetato (107).

1.6.1 Inestabilidad del aceite esencial de tomillo

Se ha reportado que los aceites esenciales son susceptibles a reacciones de conversión y degradación ya que están conformados por una mezcla compleja de componentes lipófilos y altamente volátiles derivados de una gran variedad de diferentes clases químicas. Se reportan procesos de oxidación y polimerización, los cuales causan

inestabilidad que afecta tanto en la eficacia como en las propiedades organolépticas del aceite esencial. También se ha indicado que factores como la temperatura, la luz y la disponibilidad de oxígeno pueden afectar la integridad del aceite esencial. Al salir de la matriz de la planta, los componentes del aceite esencial son especialmente propensos a la oxidación, las transformaciones químicas o las reacciones de polimerización (108).

Los componentes del aceite esencial tienen relaciones estructurales si poseen el mismo grupo químico y, por ello, se convierten fácilmente entre sí mediante reacciones de oxidación, isomerización, ciclación o deshidrogenación, desencadenadas enzimática o químicamente. Por ejemplo, el monoterpeno aromático *p*-cimeno, presente en el aceite esencial de tomillo, se ha asociado a la deshidrogenación oxidativa de terpenos monocíclicos insaturados simples o dobles (109).

En la autooxidación de los terpenoides, inducida por el aire, las moléculas insaturadas reaccionan en un mecanismo de cadena de radicales libres con oxígeno presente en el aire, en una gama de productos de oxidación primarios y secundarios. El curso de la reacción dependerá de la estructura molecular, la concentración de oxígeno, la entrada de energía y el impacto de otros factores. El calor, las cantidades catalíticas de metales reactivos redox y la exposición a la luz, promueven la generación inicial de radicales alquílicos que reaccionan fácilmente con el oxígeno para formar radicales peroxilo (108).

Adicionalmente, los productos primarios de auto oxidación, como los hidroperóxidos, eventualmente se descomponen durante las etapas avanzadas de oxidación, dependiendo de su estabilidad individual. De este modo, dan lugar a una gama de productos secundarios oxidados estables, como alcoholes monovalentes a polivalentes, aldehídos, cetonas, epóxidos, peróxidos o ácidos, así como polímeros muy viscosos, que a menudo contienen oxígeno, los cuales se descomponen en presencia de luz, calor o al aumentar la acidez (108).

Se considera que la luz ultravioleta y la luz visible aceleran los procesos de auto oxidación activando la abstracción de hidrógeno que da como resultado la formación de radicales alquilo (110). Adicionalmente, la iluminación influye en la segunda vía oxidativa, la fotooxidación, en la que el oxígeno triplete presente en el aire se convierte en su estado singlete excitado en presencia de un sensibilizador orgánico. Esta molécula

electrófila no radical puede reaccionar directamente con un doble enlace, con lo que se abstrae un átomo de hidrógeno alílico que conduce a la formación de hidroperóxidos (111), los cuales se descomponen de la misma manera que los formados por la auto oxidación.

En lo relacionado con la temperatura, las reacciones químicas se aceleran al aumentar el calor debido a la dependencia de la temperatura de la velocidad de reacción expresada por la ecuación de Arrhenius. Por lo tanto, tanto la auto oxidación como la descomposición de hidroperóxidos avanzan al aumentar la temperatura, aunado a que el calor contribuye a la formación inicial de radicales libres (110). Por el contrario, las temperaturas más bajas favorecen la solubilidad del oxígeno en los líquidos, lo que a su vez puede afectar negativamente a la estabilidad del aceite esencial (112).

El acceso al oxígeno desempeña un papel decisivo en la estabilidad del aceite esencial. Se ha evaluado el consumo de oxígeno durante el almacenamiento de diferentes monoterpenos, observándose cambios más pronunciados en la composición y las propiedades fisicoquímicas de los aceites esenciales en envases medio llenos que cuando sólo había poco o nada de espacio libre (113). La oxidación del aceite se acelera con la concentración de oxígeno disuelto, que a su vez depende en gran medida de la presión parcial de oxígeno en el espacio de cabeza y de la temperatura ambiente (108).

Por otro lado, Michiels y colaboradores evidenciaron que los compuestos principales del aceite esencial de tomillo, timol y carvacrol, son pobremente degradados *in vitro* en los segmentos proximales del TGI de lechones, no obstante, se espera una degradación mayor en segmentos más distales (31).

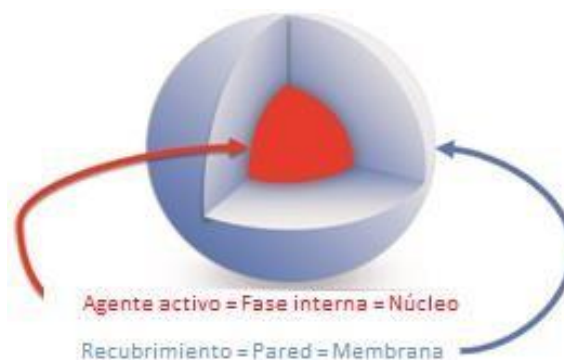
Dadas estas inestabilidades ante factores externos y buscando preservar la eficacia del efecto biológico del aceite esencial, es necesario ofrecerle protección bajo un sistema que permita mantener su estabilidad y prolongar su vida útil, esto puede ser logrado mediante diferentes estrategias como la encapsulación (114,115). Los procedimientos de microencapsulación proporcionan a este tipo de materiales la vehiculización conveniente para ayudarles a mantener sus propiedades por un tiempo más prolongado.

1.7 Microencapsulación

La microencapsulación es una técnica mediante la cual los ingredientes activos sólidos, líquidos o gaseosos se incluyen dentro de un segundo material con el fin de proteger el ingrediente activo del ambiente circundante. De este modo, el ingrediente activo se designa como el material del núcleo, mientras que el material circundante forma el envoltorio (116). Otra definición plantea la microencapsulación como una tecnología de empaquetamiento de materiales sólidos, líquidos o gaseosos, en una membrana contenedora, que además puede liberar sus contenidos a velocidades controladas bajo condiciones específicas, y pueden proteger el producto encapsulado de la luz y el oxígeno (117).

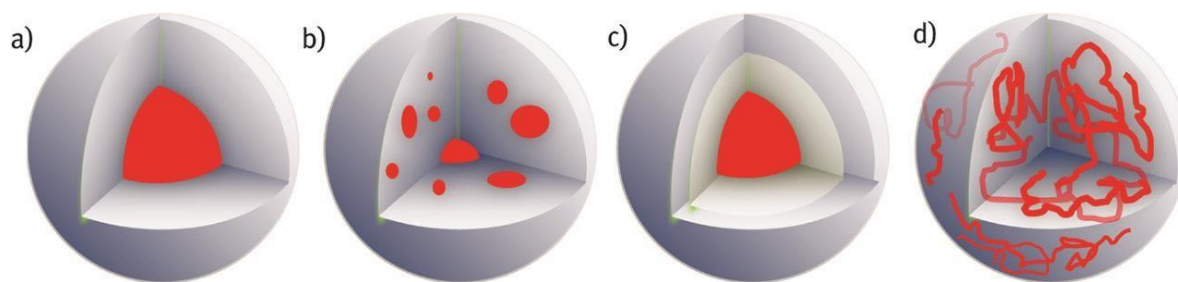
Las microcápsulas son partículas de forma circular de sección transversal con cierto volumen libre en el interior, donde se puede asignar un material de núcleo. En su forma más simple, una microcápsula es una pequeña esfera con una pared uniforme alrededor de ella, la cual puede ser individual o multicapa. Está conformada por un núcleo que corresponde al material dentro de la microcápsula o también fase interna o de relleno, mientras que la pared es conocida como revestimiento y/o material de pared o de membrana. El núcleo puede ser un material cristalino, una partícula absorbente, una emulsión, o una suspensión de microcápsulas más pequeñas (118). En la Figura 1-1 se puede observar una microcápsula en su forma simple. El tamaño de diámetro de las microcápsulas está entre 1-1,000 μm (119).

Figura 1-1: Representación de una microcápsula (120).



Las microcápsulas pueden presentar diferentes morfologías dependiendo de los materiales utilizados y de la técnica de preparación, como se presenta en la Figura 1-2. Dependiendo de su estructura, pueden caracterizarse como núcleo/recubrimiento continuo, cápsulas poli-núcleos, cápsulas de núcleo continuo con más de una capa de material de recubrimiento y la cápsula tipo matriz, donde el agente encapsulado se incorpora dentro del material de recubrimiento (116).

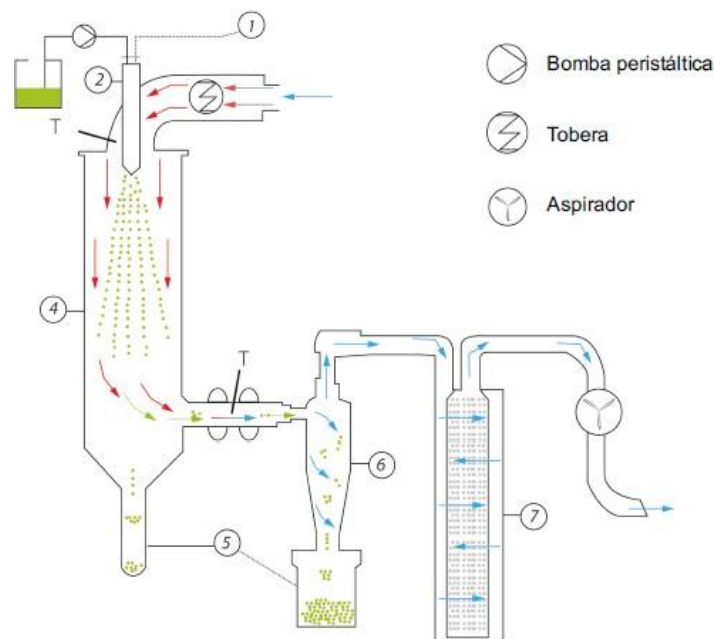
Figura 1-2: Morfología de las microcápsulas (120).



(a) Núcleo/recubrimiento continuo, (b) cápsula poli-núcleos, (c) cápsula de núcleo continuo con más de una capa de material de recubrimiento, y (d) cápsula matricial.

1.7.1 Secado por aspersion/atomización (Spray drying)

El secado por aspersion es un proceso en el que la fase líquida (emulsión, suspensión o solución) se ve forzada a formar gotas mediante un atomizador o una boquilla de pulverización (120). El equipo funciona utilizando una corriente de gas a presión y determinada temperatura, que arrastra por vacío la fase líquida a través de la boquilla de apertura fina (generalmente 1.5 mm), la cual integra también el gas comprimido expulsando el líquido en forma de gotitas, que son secadas instantáneamente en una cámara (cilindro) que se encuentra sobre los 100 °C. Seguidamente las microcápsulas formadas son llevadas por el flujo del sistema hacia un ciclón en el cual se separan del aire y caen hacia un recipiente recolector. En la Figura 1-3 se muestra el esquema de funcionamiento del equipo de secado por aspersion.

Figura 1-3: Principales procesos involucrados en el secado por aspersion (121).

1. Entrada de nitrógeno reutilizado; 2. Aguja (Tobera); 3. Entrada de nitrógeno de secado; 4. Cilindro de secado; 5. Vasos de recolección de producto seco; 6. Ciclón; 7. Filtro; T. Temperatura.

Este método ha sido ampliamente utilizado desde el siglo XIX en la industria debido a su simplicidad, flexibilidad y distribución uniforme del tamaño de partícula, además que el sistema puede ser completamente automatizado. No obstante, se debe optimizar para superar limitaciones como bajas eficiencias térmicas, obstrucción de toberas y altos costos de mantenimiento. También se presenta pérdida de producto debido a la aglomeración de cápsulas y material que se adhiere a las paredes internas del sistema. Se ha reportado que el tamaño de las cápsulas que se pueden obtener supera las 100 μm . Los parámetros más importantes a controlar en este proceso son las temperaturas de entrada y salida del aire de secado, el flujo de alimentación del producto a secar, el tiempo de residencia y el acondicionamiento de la materia prima (122). Maury y colaboradores estudiaron los efectos de los parámetros de secado por pulverización en el rendimiento de un material a escala de laboratorio, determinando que la condición operativa más importante para optimizar el rendimiento del producto es la temperatura de entrada / temperatura de salida (123).

El secado por aspersion elimina rápidamente el agua por vaporización de emulsiones de aceite en agua (O/W) que permite una alta retención de compuestos volátiles (124) y protege los compuestos microencapsulados contra la reacción con el ambiente (118). En comparación con otros métodos, el secado por aspersion proporciona una eficiencia de encapsulación relativamente alta. La mayor eficiencia de encapsulación que se alcanza con el secado por aspersion, se encuentra entre 96 y 100%, valores superiores en comparación con otros métodos (125). Se debe tener en cuenta que la viscosidad de la solución del polímero no sea tan elevada ya que entre más alta sea la viscosidad habrá mayor tendencia a la agregación y deposición en la cámara de secado lo que hace que baje el rendimiento. Se sugieren flujos de aire de atomización entre 400 y 500 L/h para garantizar tamaños de partículas menores.

Existen numerosos diseños de dispositivos secadores por aspersion (121). Los equipos son generalmente de ciclo abierto, donde el gas de secado se descarga después de su uso, generalmente se utiliza aire comprimido. Sin embargo, existen configuraciones de ciclo cerrado, como el que se empleó en esta investigación, necesario en casos donde la dispersión de alimentación contenga solventes orgánicos o donde se pretende limitar la exposición del principio activo o componentes al oxígeno. En este sistema, el aire de secado corresponde a un gas inerte, generalmente nitrógeno, el cual recircula continuamente reduciendo el riesgo de explosión y se da la recuperación del gas (126). Cabe resaltar que el empleo de nitrógeno en vez de aire para el proceso de secado favorece la estabilidad del producto microencapsulado a obtener (127).

1.8 Biopolímeros

Pueden emplearse polímeros de origen natural como material de recubrimiento (128). Algunos materiales de pared de origen natural usados para microencapsulación son gomas, maltodextrina, carboximetilcelulosa, almidón, gelatina, quitosano, entre otros (125,129).

Los materiales seleccionados para producir las microcápsulas debían ser grado alimenticio, pues los pollos de engorde están destinados al consumo humano. Por lo tanto, se seleccionó como material de pared de las micropartículas el almidón de ñame modificado con anhídrido octenil succínico (OSA), aprobado en el Codex Alimentarius, el cual se propuso en combinación con maltodextrina y goma arábica.

▪ **Almidón:** almidones basados en ingredientes (almidones modificados, maltodextrinas, b-ciclodextrinas) son muy utilizados en la industria alimenticia (130,131); dentro de los almidones más importantes se destacan el de papa (*Solanum tuberosum*), maíz (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*), arroz (*Oryza sativa*), tapioca (*Manihot esculenta*) (132–134). En Colombia se ha incursionado en el estudio de las propiedades del almidón de ñame (*Dioscorea rotundata*) tanto nativo (135,136) como modificado (137).

Los almidones están constituidos esencialmente por una mezcla de polisacáridos conformados por amilosa y amilopectina. Las aplicaciones industriales de los almidones naturales o nativos son limitadas debido a desventajas relacionadas con su inestabilidad y falta de resistencia mecánica. Existen diferentes tipos de modificación del almidón que mejoran sus propiedades iniciales, en el presente estudio se empleó la modificación de tipo químico, la cual está directamente relacionada con las reacciones de los grupos hidroxilo del polímero de almidón; algunas modificaciones químicas aplicables al almidón se dan mediante reacciones vía éter, formación de ésteres, oxidación y la hidrólisis de los grupos hidroxilos (138). Posterior a la hidrólisis, se practica una modificación de lipofilización mediante reacción de esterificación, utilizando reactivos como el OSA, el cual incorpora una cadena carbonada de ocho unidades y aumenta la hidrofobicidad, permitiendo la formación de paredes para microcápsulas suaves y continuas (139,140).

▪ **Maltodextrina:** se obtiene por métodos de hidrólisis ácida o enzimática de los almidones. Entre sus características presenta baja viscosidad en alta proporción de sólidos y altas concentraciones, son inodoras e incoloras, además permiten la formación de polvos de libre flujo sin enmascarar el sabor original (122). Presenta ventajas por costo y efectividad; está disponible en diferentes pesos moleculares y son extensivamente utilizados en la industria de alimentos (131).

- **Gomas:** existen diferentes tipos de gomas según su origen, goma de algarrobo, goma guar, goma de tamarindo, goma gelana, goma xantana, goma arábica, entre otras. Generalmente son insípidas, pero pueden tener un efecto pronunciado en el gusto y sabor de alimentos, son hidrosolubles, de baja viscosidad, poseen características de emulsificación (130,131).

En este estudio se empleó la goma arábica, polímero natural biodegradable, polisacárido con excelentes propiedades de emulsificación en emulsiones aceite en agua, ampliamente utilizado en aplicaciones alimenticias, cosméticas y farmacéuticas (141). La goma arábica es un emulsionante extremadamente eficaz a un pH bajo y a una fuerza iónica alta, sus propiedades emulsionantes están asociadas con una fracción de alto peso molecular que representa menos del 30% del hidrocoloide total (142). Se reportó su utilización como matriz para encapsular la enzima endogluconasa, producida por la bacteria *Thermomonospora*, observándose un cambio en la temperatura óptima (50-55 °C) de la enzima y un incremento considerable en el pH y estabilidad comparado con la enzima libre, además también protegió la actividad de la enzima en presencia de detergentes realizando la vida útil. Se ha reportado la mezcla de goma arábica y maltodextrinas en su uso como transportadores de sólidos, proporcionando viscosidad por ejemplo en la microencapsulación de aceite de cardamomo por secado por aspersion (131,143).

1.9 Estado del arte

Ha sido demostrado por diversas investigaciones la utilidad del aceite esencial de tomillo para la producción de pollos de engorde, tal como se ha referenciado en el marco teórico. En Colombia, también se han realizado estudios del aceite sin microencapsular para demostrar su aplicación en este campo, tal como se muestra en la Tabla 1-2.

Tabla 1-2: Estudios de aplicabilidad del tomillo en producción avícola realizados en Colombia hasta el año 2021.

Estudio	Tipo de trabajo	Institución	Año
Efecto de una mezcla de extractos de plantas sobre indicadores de integridad intestinal y parámetros productivos en pollos de engorde (144).	Tesis Magíster en Producción Animal.	Universidad Nacional de Colombia.	2020
Evaluación del extracto de ajo (<i>Allium sativum</i>) y tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>) en el agua de bebida y su efecto en los parámetros productivos y salud intestinal de conejos, pollos de engorde y cerdos (145).	Trabajo de investigación.	Sistema de investigación, desarrollo tecnológico e innovación (SENNOVA) del Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA).	2019
Evaluación del uso de los aceites esenciales como alternativa al uso de los antibióticos promotores de crecimiento en pollos de engorde (8).	Tesis Magíster en Producción Animal.	Universidad Nacional de Colombia.	2010
Efecto de dos concentraciones de extracto etanólico de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>) y orégano (<i>Origanum vulgare</i>) suministrado en el agua de bebida de pollos de engorde (146).	Trabajo de grado Zootecnia.	Universidad de Cundinamarca.	2007
Evaluación <i>in vitro</i> de la acción antibacteriana de los aceites esenciales de: orégano (<i>Origanum vulgare</i>), tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>) y limonaria (<i>Cymbopogon citratus</i>) Frente a: <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella gallinarum</i> y <i>Streptococcus faecalis</i> , bacterias de impacto en la producción avícola (147).	Trabajo de grado Zootecnia.	Universidad de Cundinamarca.	2004

En la Tabla 1-3 se presentan estudios previos referentes con la microencapsulación de aceite esencial de tomillo de diversas subespecies.

Tabla 1-3: Investigaciones relacionadas con la microencapsulación de aceite esencial o extractos de tomillo.

Especie bajo estudio	Componentes de la matriz	Método de preparación	Métodos de caracterización	Aplicación
Aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>) (148).	Maltodextrina y goma de mezquite.	Secado por aspersion.	Eficiencia de encapsulamiento. Aceite superficial. Contenido de humedad. Tamaño de partícula.	General para productos farmacéuticos, cosméticos y alimentos.
Aceite esencial de tomillo (149).	Maltodextrina.	Secado por aspersion.	Identificación y cuantificación de compuestos. Actividad biológica.	Potencial antibacteriano en camarones.
Aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>) (150).	Almidón de ñame (<i>Dioscorea rotundata</i>) modificado por procesos de hidrólisis y lipofilización empleando anhídrido dodecenilsuccínico (DDSA).	Microencapsulación lipídica sólida, seguida de emulsificación.	Eficiencia de encapsulación. Identificación y cuantificación de compuestos. Actividad biológica. Tamaño. Morfología. Contenido total y superficial de aceite.	Actividad antibacteriana sobre las cepas involucradas en el desarrollo del acné.
Aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>) (151).	Alginato de sodio reticulado con cloruro de calcio.	Extrusión de emulsión.	Eficiencia de la encapsulación. Capacidad de carga. Microestructura. Actividad antifúngica.	Plaguicida.

Especie bajo estudio	Componentes de la matriz	Método de preparación	Métodos de caracterización	Aplicación
Aceite esencial de tomillo (152).	Alginato de calcio.	Gelificación iónica	Tamaño y forma. Eficiencia de encapsulación. Capacidad de carga. Actividad antimicrobiana.	Alimentos.
Aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>) (153).	Polímero ensamblado de quitosano y nanogel de ácido benzoico.	Nanogel a través de la formación de enlace amida.	Tamaño. Morfología. Actividad biológica. Interacciones químicas. Eficiencia de encapsulación.	Propiedades antifúngicas para uso en agricultura.
Aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>) (13).	β -ciclodextrina	Encapsulación en ciclodextrina.	Identificación y cuantificación de compuestos. Comportamiento de liberación. Eficacia de encapsulación. Interacciones moleculares. Isotermas de absorción-desorción de humedad. Actividad biológica.	Actividad antimicrobiana para uso en agricultura.
Aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>) (154).	Ácido poliláctico (PLA) en dimetilformamida	Coacervación.	Tamaño. Morfología. Identificación y cuantificación de compuestos. Eficiencia de encapsulación.	Cosméticos.

Especie bajo estudio	Componentes de la matriz	Método de preparación	Métodos de caracterización	Aplicación
Aceite esencial de tomillo blanco (<i>Thymus vulgaris</i>) (155).	Almidón de maíz - Amisol 3408, contenido de amilosa 28% p/p. - Amisol 4000, contenido de amilosa 1.8% p/p.	Extrusión termoplástica.	Identificación y cuantificación de compuestos. Contenido de humedad. Diámetro medio y distribución de tamaño. Densidad aparente. Porosidad. Índice de expansión radial. Eficiencia de encapsulación. Flotabilidad, hinchamiento y lixiviación. Liberación del aceite esencial.	Larvicida.
Aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>) (156).	Gelatina tipo B y goma arábica.	Coacervación.	Identificación y cuantificación de compuestos. Estabilidad oxidativa. Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> e <i>in situ</i> .	Conservante en productos de panadería.
Aceite de clavo de olor y aceite de tomillo rojo (157).	Gelatina.	Coacervación.	Carga relativa de aceite. Identificación y cuantificación de compuestos. Actividad biológica.	Reducción de la población de ácaros del polvo doméstico.

Especie bajo estudio	Componentes de la matriz	Método de preparación	Métodos de caracterización	Aplicación
Extracto acuoso de tomillo (<i>Thymus serpyllum L</i>) (85).	Alginato de sodio con adición de sacarosa o inulina.	Extrusión electrostática. Extrusión electrostática seguida de secado al calor y liofilizado. Absorción de extracto en hidrogel formado.	Tamaño. Morfología. Eficacia de la encapsulación. Degradación. Comportamiento térmico. Cuantificación de compuestos. Actividad biológica.	Formulaciones de dosificación que contienen compuestos polifenólicos para su uso como antioxidantes en productos alimenticios.
Extractos de tomillo (<i>Thymus boissieri, longicaulis, leucospermus, y ocheus</i>) (79).	Fosfatidil colina (PC) y colesterol (C) o PC, C y fosfatidil glicerol (PG)	Formación de liposomas.	Actividad biológica. Descomposición térmica-oxidativa. Temperatura de transición de lípidos. Morfología.	Actividad antioxidante y antimicrobiana para su uso en alimentos.

Por otra parte, numerosas publicaciones internacionales dan cuenta de la utilidad del empleo de almidones modificados químicamente (lipofilizados) (118,130). De trabajos previos realizados al interior del Grupo de Investigación con aceites esenciales, el almidón de ñame modificado por succinación mostró resultados promisorios (137). A continuación, en la Tabla 1-4 se mencionan algunos estudios en los que se han utilizado almidones modificados solos o en combinación con goma o maltodextrina para microencapsulación.

Tabla 1-4: Estudios que reportan el uso de almidones modificados en microencapsulación.

Especie bajo estudio	Componentes de la matriz	Modificación del almidón	Método de microencapsulación
Aceite esencial de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)	Almidón de ñame (<i>Dioscorea rotundata</i>) modificado	Hidrólisis previa. Lipofilización empleando anhídrido dodecenil succínico (DDSA)	Microparticulación lipídica sólida (150)
Agentes aromatizantes	Almidones de maíz céreo	Hidrólisis previa. Acetilados, n-octenilsuccinilados (n-OSA) y fosforilados	Secado por aspersión (130)
Aceite esencial de romero	Maltodextrina y almidón modificado (Capsul [®])	Lipofilización empleando anhídrido octenil succínico (OSA)	Secado por aspersión (158)
Aceite de linaza	Maltodextrina con goma arábica, concentrado de proteína de suero de leche o dos tipos de almidón modificado (Hi-Cap 100 TM y Capsul TA [®])	Lipofilización empleando anhídrido octenil succínico (OSA)	Secado por aspersión (159)
Aceite de café verde	Almidones modificados (OSA Capsul TM , Hi-Cap TM 100 y N-Lok TM) o goma arábica con maltodextrina 10 DE, maltodextrina con 10 DE y goma arábica	Lipofilización empleando anhídrido octenil succínico (OSA)	Secado por aspersión (160)
D-limoneno	Goma arábica, maltodextrina y almidón modificado Hi-Cap TM 100	Lipofilización empleando anhídrido octenil succínico (OSA)	Secado por aspersión (161)

2. Metodología

2.1 Materiales y Equipos

2.1.1 Materiales

Aceite esencial de tomillo, obtenido mediante método de arrastre con vapor de especímenes recolectados entre enero a junio en la finca El Pumay, Vereda Manila, Facatativá, Cundinamarca, comprado a la empresa Green Andina, lote: ATMGAC 1804-37. Goma arábica en polvo (grado farmacéutico, Ciacomeq S.A.S., Lote: PT16-2017, Colombia). Maltodextrina (grado farmacéutico, Ciacomeq S.A.S., Lote: M1628201, Colombia). Almidón de ñame modificado (lipofilizado con OSA). Reactivo OSA (grado alimenticio, SIGMA-ALDRICH®, EE. UU., Lote: MKBJ5610V). Agua destilada.

Reactivos de análisis: Acetato de etilo (grado HPLC, PanReact AppliChem, Lote: 0000833239, Alemania). Alcohol etílico al 96% (grado farmacéutico, Ciacomeq S.A.S., Colombia). Hidróxido de sodio (Grado reactivo, Panreac química SA). Ácido clorhídrico (grado reactivo, Merck). Fenolftaleína (grado reactivo, Merck).

2.1.2 Equipos

El secado del almidón nativo y modificado se hizo en una estufa universal, UN 55, Memmert GmbH + Co. KG (Alemania). Para la comprobación de la modificación del almidón de ñame se empleó el equipo de espectroscopia infrarrojo, Shimadzu® IR Prestige-21 (Japón). El índice de refracción del aceite esencial de tomillo se determinó usando un refractómetro Mettler Toledo portable 30PX. Se realizó la homogenización de las emulsiones utilizando el equipo de dispersión Ultra Turrax® IKA T18, vástago grueso

S18N-19G (Alemania). La viscosidad de las emulsiones se midió en un viscosímetro Brookfield® Engineering, Modelo RVD-VE (EE. UU.). La microencapsulación por secado por aspersión se llevó a cabo en un equipo Mini Spray Dryer BUCHI® B-290 con Inert Loop B-295 integrado (Suiza). Para la identificación y cuantificación del aceite esencial de tomillo como materia prima y en los ensayos de eficiencia de encapsulación y de estabilidad, se empleó un cromatógrafo de gases Thermo Scientific® Trace 1300 Mainframe MS, (EE. UU.). El equipo ultrasonido Cole-Parmer®, modelo 8891, 90 Watts, 47 kHz \pm 6%, (EE. UU.), se empleó para romper las micropartículas en la determinación de la eficiencia de encapsulación; mientras que la ultracentrífuga Thermo Scientific®, Heraeus® Megafuge® 16 (EE. UU.), fue utilizada para la separación del aceite liberado de la matriz. El equipo de dispersión de luz Masterizer® 3000, Malvern Panalytical (United Kingdom), se utilizó para la determinación del tamaño de partícula. Otros equipos utilizados fueron el potenciómetro marca Hanna® referencia HI 2221 (E.U.); la balanza analítica (sensibilidad de 0.001 g y 0.0001 g) marca Ohaus® serie Pioneer PA214 (E.U.), micropipetas (10-100 μ L y 100-1000 μ L) marca Select BioProducts® (E.U.), plancha de agitación multipunto IKA® modelo RO 10 PS1 Werke (Alemania); equipo de filtración al vacío. El estudio de estabilidad se llevó a cabo en una cámara de clima constante Memmert® HPP750 (Alemania). Con el fin de caracterizar la forma y tamaño de las micropartículas se empleó un equipo de microscopia electrónica de barrido (SEM) FEI Quanta 200 (EE. UU.).

2.2 Métodos

2.2.1 Obtención y modificación del almidón de ñame

El almidón de ñame (*Dioscorea rotundata*, variante espino) se extrajo en su estado nativo de tubérculos adquiridos en la plaza de mercado del municipio de Sabanalarga, departamento del Atlántico, Colombia, (10° 37 latitud norte y 74° 55 longitud oeste), a 41 km de la ciudad de Barranquilla, vía Cordialidad. Se partió de una cantidad de 10 kilogramos de material vegetal fresco, entero, con adecuado aspecto y madurez apta para consumo humano. Para la obtención del almidón nativo se siguió el método

convencional de rallado y precipitación (162). El paso inicial fue lavar la corteza con abundante agua con el fin de retirar la suciedad externa, seguidamente se retiró la corteza y se enjuagó nuevamente con agua, se cortó en pedazos y se dejó en remojo durante 12 horas con solución de hipoclorito de sodio con el fin de facilitar la salida del almidón para su posterior licuado; el jugo obtenido se filtró empleando una tela con el propósito de retirar las fibras de celulosa. Se dejó reposar el filtrado con el fin de decantarlo posteriormente. Este proceso se repitió cuatro veces más. Finalmente, se lavó el sedimento con agua destilada varias veces hasta que dicho sedimento se observara de color blanco y el agua transparente, se filtró al vacío verificando la ausencia de cloruros con solución de nitrato de plata (AgNO_3) 0,1 N. El almidón nativo obtenido se dejó secar a 50 °C durante 24 horas, luego se empacó en bolsas plásticas herméticas para su posterior hidrólisis y lipofilización. Se calculó el rendimiento en porcentaje como cantidad de material seco extraído sobre cantidad de material vegetal de partida.

El almidón nativo fue hidrolizado siguiendo la metodología propuesta por Zambrano y Camargo, con modificaciones (163). Se preparó una dispersión de 250 g de almidón nativo de ñame en 625 mL de agua destilada, con agitación constante. Seguidamente se adicionó ácido clorhídrico (HCl) en cantidad suficiente para obtener una concentración del 3%, continuando la agitación por 24 horas. Con el fin de neutralizar el sistema, se adicionó hidróxido de sodio (NaOH) al 10% según la relación estequiométrica; se dejó en reposo para posterior decantación, se lavó nuevamente el sedimento cuatro veces más con agua destilada y la última lavada se hizo con etanol al 96%. Se filtró al vacío y se dejó secar a 50 °C por 24 horas. Finalmente, el almidón hidrolizado seco se almacenó en bolsas plásticas de sellado hermético.

La lipofilización del almidón se llevó a cabo con reactivo OSA según el método de Chi con modificaciones (164). La cantidad total de almidón hidrolizado obtenida se pesó (239 g) y se suspendió en 597,5 mL de agua destilada con agitación magnética constante. Con NaOH al 3% se ajustó el pH hasta 8.5 y se continuó agitando, con el fin de hidratar los gránulos y aumentar la exposición de los grupos hidroxilo para su reacción con el OSA. Seguidamente, se adicionaron 60 g de OSA disuelto en etanol. Debido a que el pH de la solución tiende a descender súbitamente, se hicieron adiciones de NaOH al 3% para mantenerlo entre 8,5 y 9,0 hasta que no disminuyera más, lo cual es indicativo de que el reactivo límite se agota, este proceso demoró aproximadamente dos horas.

Posteriormente, el pH de la solución se ajustó con HCl al 10% hasta el valor de siete. Se dejó sedimentar y se hicieron lavados con agua destilada, se filtró al vacío y se secó en horno a 45°C durante 24 horas. Seguidamente, el almidón modificado se sometió a lavados con 300 mL de etanol al 96% en un equipo Soxhlet, haciendo diez recirculaciones con el propósito de garantizar la remoción total del OSA libre. Finalmente, el almidón modificado se secó a 45 °C durante 48 horas.

2.2.2 Caracterización de materias primas

2.2.2.1 Aceite esencial de tomillo

▪ Identificación

La composición del aceite esencial de tomillo se analizó mediante técnica instrumental de cromatografía de gases acoplada a detector de masas (GC/MS), siguiendo la metodología de Fernandes et al (165) con algunas modificaciones, en un equipo GC/MS Thermo Scientific® Trace 1300, bajo las siguientes condiciones: se preparó una solución madre a partir de 20 µL de aceite esencial de tomillo que se disolvieron en 980 µL de acetato de etilo, luego se tomó una alícuota de 20 µL de dicha solución madre y se completó hasta 1 mL con acetato de etilo. Se empleó una columna de polidimetilsiloxano, con 5% de grupos fenilo, 30m x 0,25mm ID, con un espesor de fase estacionaria de 0,25 µm. Las condiciones de calentamiento fueron de 40°C hasta el minuto uno, con incremento de 4°C por minuto hasta 180°C, seguido de un incremento de 30°C por minuto hasta alcanzar los 250°C; el volumen de inyección fue de 2 µL en modo split 1:20 y temperatura de inyección de 220°C; la temperatura de la línea de transferencia fue de 280°C y la temperatura de la fuente de ionización de 230°C; se empleó helio como gas de arrastre. La identidad de los componentes del aceite esencial se determinó por comparación entre los espectros de masas obtenidos de las muestras y los reportados en la librería del programa del cromatógrafo de gases.

- **Densidad e índice de refracción**

La densidad específica se determinó por triplicado mediante el uso de un picnómetro a $17 \pm 1^\circ \text{C}$; para el índice de refracción se empleó un refractómetro Mettler Toledo portable 30PX a $21 \pm 1^\circ \text{C}$, ($n=3$).

2.2.2.2 Almidón de ñame modificado

- **Determinación del grado de sustitución (DS)**

Indica el número promedio de grupos hidroxilos sustituidos por unidad de glucosa. Se determinó mediante titulación ácido-base ya que el residuo OSA unido a la cadena de almidón posee un grupo carboxilo libre, de acuerdo con la metodología de Song y colaboradores, con modificaciones (166). Se dispersaron 2 g de almidón lipofilizado en 40 mL de agua destilada. Se sometió a calentamiento hasta ebullición con el fin de gelificar la dispersión. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregaron tres gotas de fenolftaleína al 1% como indicador; se tituló por triplicado con NaOH 0,01 M hasta coloración rosa leve. El PS se calculó mediante la siguiente ecuación (Ecuación (2.1)):

$$DS = \frac{0.162 \times (A \times M) / W}{1 - [0.210 \times (A \times M) / W]} \quad (2.1)$$

Dónde:

A = volumen (mL) consumido de la solución de NaOH.

M = normalidad de la solución de NaOH utilizado durante la titulación.

W = peso (g) de la muestra analizada.

162 es el peso molecular de la unidad de glucosa.

210 es el peso molecular del OSA.

- **Capacidad emulsificante**

Para evaluar la capacidad emulsificante del almidón modificado en comparación con el almidón nativo, ésta se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Torrenegra y colaboradores (137), con modificaciones. Para ello, se mezcló 1 g de cada almidón con 25 mL de agua a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, con agitación mecánica durante 15 minutos. Seguidamente,

se sometió a homogenización a 8000 rpm por tres minutos usando un equipo Ultra Turrax® IKA T10, adicionando simultáneamente 25 mL de aceite de soya. Se dejó en reposo a temperatura ambiente por 24 horas; finalizado este tiempo, se midió la cantidad de emulsión remanente (ER). La capacidad emulsificante se expresó en términos de porcentaje, como volumen de la capa emulsificada (VCE) con respecto al total del líquido (VTL), empleando la siguiente expresión (Ecuación (2.2)):

$$ER = \frac{VCE}{VTL} \times 100 \quad (2.2)$$

Dónde:

VCE = volumen de la capa emulsificada

VTL = volumen total del líquido

▪ **Análisis por espectroscopía infrarroja**

El almidón de ñame nativo y el almidón de ñame succinatado fueron caracterizados mediante espectroscopia infrarroja (Infrarrojo, Shimadzu IRPrestige-21, Japón), en un rango de longitud de onda entre 4000 y 500 cm^{-1} , las mediciones fueron realizadas con el aditamento ATR, siguiendo la metodología descrita por la USP 43 (167).

2.2.3 Preparación de las emulsiones

Para la microencapsulación, fue necesario proveer una emulsión cuya fase oleosa correspondía al aceite esencial de tomillo que se pretendía encapsular y la fase acuosa estaba formada por una dispersión de la mezcla de polímeros que constituiría el material de recubrimiento. Por tal razón, se realizaron pruebas iniciales con el fin de encontrar las condiciones adecuadas de emulsificación que, en primer lugar, permitieran formar una emulsión con una aceptable estabilidad de fases y con mayor capacidad emulsificante y, en segundo lugar, fuera apropiada para llevar a cabo el proceso de microencapsulación. Esto comprendió la selección del agente o mezcla de agentes que conformaron la matriz biopolimérica: goma arábiga (G), maltodextrina (M) y/o almidón de ñame succinatado (AÑS), la relación de las fases oleosa y acuosa, la velocidad y el tiempo de homogenización. Se definieron dos tipos de matrices: G/M y G/M/AÑS. Se probaron

distintas relaciones de fases oleosa/acuosa tales como 1:4, 1:5 y 1:6. La velocidad de homogenización se evaluó a 13000 y 15000 rpm, y, el tiempo de homogenización osciló entre 15 y 30 minutos. En la Tabla 2-1 se resumen los ensayos mencionados.

Tabla 2-1: Ensayos previos para determinar las condiciones de emulsificación.

Relación AET: matriz	Matriz	Velocidad de homogenización (rpm)	Tiempo de homogenización (min)
1:4	G:M (50:50)	15000	30
1:5	G:M (50:50)	15000	20
1:6	G:M (50:50)	13000	20
1:6	G:M:AÑS (1/3:1/3:1/3)	13000	15
G = Goma arábica, M = Maltodextrina, AÑS =Almidón succinatado, AET: Aceite esencial de tomillo			

Con el fin de asegurar su dispersión o hinchamiento, los biopolímeros se dispersaron previamente en agua durante 12 h, y la dispersión de AÑS se calentó a 50 °C durante ese tiempo. El contenido de sólidos totales para las dispersiones de goma arábica y maltodextrina fueron del 20% y para la dispersión del AÑS se pesaron 12 g por cada 30 g de agua. Adicionalmente, para la matriz G/M se definió una proporción 50:50 de cada material y para la matriz G/M/AÑS se definieron proporciones equivalentes (1/3: 1/3: 1/3). Cabe anotar que previamente se probaron relaciones 40:60 para la matriz G/M, pero en el caso de M/G (60:40) no emulsificó la fase oleosa, mientras que para G/M (60:40) aumentó considerablemente la viscosidad, lo cual impactaba negativamente en su adecuación para la alimentación del equipo de secado por aspersión.

Se prepararon las emulsiones de aceite esencial de tomillo con el material de recubrimiento seleccionado mediante un proceso convencional en caliente para "pickering emulsions". Se siguió la técnica propuesta por varios autores, que consiste en iniciar con la suspensión del sólido que cumplirá el papel de estabilizante de la emulsión en la fase acuosa (168,169). Una vez dispersos, se realizó la mezcla de los tres biopolímeros y se adicionó el aceite esencial de tomillo durante la homogenización

utilizando el equipo de dispersión Ultra Turrax®, vástago S18N-19G, bajo las condiciones previamente mencionadas.

2.2.3.1 Caracterización de las emulsiones

Para el éxito de la microencapsulación, fue necesario asegurar una idónea estabilidad de las emulsiones, para lo cual se evaluó la viscosidad y la apariencia. La viscosidad de la emulsión debía estar en un rango entre 100 – 300 cps para ser bombeable por el equipo de secado por aspersión. Este parámetro se midió por triplicado a 100 g de la emulsión, utilizando un viscosímetro Brookfield modelo RVDV-E, aguja 2, a 50 rpm, a temperatura ambiente ($18 \pm 1^\circ\text{C}$). Asimismo, se observó el aspecto visual de la emulsión a temperatura ambiente ($18 \pm 1^\circ\text{C}$) y de refrigeración ($5 \pm 1^\circ\text{C}$) en un lapso de 7 días, considerando la presencia o ausencia de separación de fases.

2.2.4 Elaboración de las microcápsulas

La obtención de las microcápsulas se llevó a cabo mediante el proceso de secado por atomización en un equipo de secado por aspersión o Spray Dryer, modelo BUCHI B-290 con Inert Loop B-295 integrado, equipado con un generador de nitrógeno (Proton on Site Nitrogen N341M) que provee una atmósfera inerte durante el secado, en busca de reducir la oxidación del aceite esencial, siguiendo la metodología de Kusonwiriawong (170). La emulsión fue bombeada peristálticamente en el equipo y pasó a través de una boquilla de 1,5 mm de diámetro interno, donde se atomizó en forma de finas gotitas.

Las condiciones de obtención y composición de los microencapsulados se definieron mediante un diseño estadístico experimental (DEE) fraccionado 2^5 , cuyas variables de ensayo fueron: tipo de matriz polimérica, temperatura de inyección, flujo de nitrógeno, flujo de alimentación y flujo de aspiración; mientras que las variables respuesta fueron: rendimiento, eficiencia de encapsulación, tamaño de partícula e índice de dispersión. Se

realizaron ensayos previos con el propósito de encontrar las condiciones de partida para el DEE, evidenciando, por ejemplo, que la temperatura de inyección no podía estar por debajo de 138°C ya que no permitía el total secado del solvente, o, por el contrario, si esta temperatura estaba por encima de 142°C se observaba un color quemado y el polvo adquiría una textura de película que se adhería a la pared del cilindro. Finalmente, se establecieron las condiciones del DEE como se describe en las Tablas 2-2 y 2-3.

Tabla 2-2: Factores y niveles del diseño estadístico experimental.

Factor a evaluar	Nivel bajo (-)	Nivel alto (+)
Matriz polimérica	G/M	G/M/AÑS
Flujo de Nitrógeno	414 L/h	601 L/h
Flujo de aspiración	32 m ³ /h	38 m ³ /h
Flujo de alimentación	3 mL/min	6 mL/min
Temperatura de inyección	138 °C	142 °C
G = Goma arábica, M = Maltodextrina, AÑS =Almidón succinatado		

Tabla 2-3: Experimentos del diseño estadístico experimental fraccionado 2⁵.

Experimento	Factores				
	Matriz polimérica	Flujo Nitrógeno	Flujo aspiración	Flujo alimentación	Temperatura inyección
1	-	-	-	+	+
2	-	-	+	-	+
3	-	+	-	+	-
4	-	+	+	-	-
5	+	-	-	-	+
6	+	-	+	+	+
7	+	+	-	-	-
8	+	+	+	+	-

(-) Nivel bajo; (+) Nivel alto

2.2.4.1 Caracterización de las microcápsulas

Para el DEE, se caracterizaron los microencapsulados según el rendimiento del proceso, la eficiencia de encapsulación, el tamaño de partícula y el span. A partir de los resultados de las variables respuesta evaluadas, se realizó un análisis de efectos principales y su significancia estadística ($p > 0,05$) según la prueba *t* de student, con el fin de encontrar la influencia de las variables de ensayo. De esta manera se definieron las condiciones de operación para la obtención del microencapsulado.

Asimismo, se elaboraron tres lotes de la formulación obtenida bajo las condiciones seleccionadas, según los resultados del DEE, a la cual se le evaluaron adicionalmente propiedades como fluidez, características organolépticas, morfología y estabilidad.

- **Rendimiento del proceso**

Se calculó el rendimiento del proceso de secado por aspersion de acuerdo con la siguiente ecuación (Ecuación (2.3)):

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Peso microcápsulas obtenidas}}{\text{Peso componentes emulsificados}} \times 100 \quad (2.3)$$

Donde el peso de los componentes emulsificados corresponde a la masa de los biopolímeros y el aceite esencial adicionado en la emulsión sin tener en cuenta la masa de agua utilizada para preparar la dispersión de sólidos (165). Este parámetro se determinó por réplica para los experimentos del DEE, para la formulación seleccionada se evaluaron tres réplicas.

- **Eficiencia de encapsulación**

Para determinar la eficiencia de la encapsulación se realizó una extracción por ultrasonido a muestras de 1 g de microencapsulado, en 5,0 mL de acetato de etilo, durante una hora. Luego, se centrifugaron por 10 minutos a 8000 rpm, se filtraron y completaron a volumen en balones aforados de 5,0 mL. Para su análisis, se preparó una dilución tomando 40 μ L de la muestra anterior y se llevó a 1,0 mL en acetato de etilo; se

analizó mediante GC/MS por triplicado, según la metodología reportada previamente en la identificación del aceite esencial de tomillo.

Se realizó una semi-cuantificación siguiendo el método de estándar externo de único punto y normalización de áreas (171), preparando una dilución del aceite esencial puro como estándar de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente. La eficiencia de la encapsulación (EE por sus siglas en inglés, Encapsulation Efficiency) se calculó de acuerdo con la Ecuación (2.4) (172).

$$\%EE = \frac{\text{Aceite total experimental en el microencapsulado}}{\text{Aceite total teórico en el microencapsulado}} \times 100 \quad (2.4)$$

- **Tamaño y distribución de tamaño de partícula**

Para la determinación del tamaño de partícula de las microcápsulas obtenidas se empleó un equipo de dispersión de rayo láser Masterizer® 3000, Malvern Panalytical (United Kingdom), equipado con una unidad de dispersión de muestra húmeda, con un índice de refracción del dispersante de 1.0 y precisión de $\pm 1\%$, empleando agua como medio de transporte a 20 ± 1 °C.

Las micropartículas se suspendieron en agua y se sometieron a dispersión de luz empleando un láser de Helio-Neón aprox. a 633 nm. Se realizaron tres mediciones por muestra, en el menor y mismo lapso de tiempo, con el fin de evitar la influencia del hinchamiento de los polímeros en la medición.

Se determinó el índice de dispersión (span), el cual indica el ancho de la distribución del tamaño de las micropartículas (173,174). Este se calculó con la siguiente ecuación:

$$Span = \frac{Dv90 - Dv10}{Dv50} \quad (2.5)$$

Donde Dv90, Dv10 y Dv50 corresponden a los diámetros del 90, 10 y 50% de volumen acumulado, respectivamente.

Evaluaciones realizadas a la formulación elaborada bajo las condiciones seleccionadas

▪ Características organolépticas

Para definir las características organolépticas de las microcápsulas, se determinaron los parámetros: *color* y *aspecto* mediante determinación visual, observación directa de las muestras y verificación de óptima apariencia, y *olor* característico.

▪ Fluidez

Se determinó mediante el método de ángulo de reposo, siguiendo la técnica establecida por Martin y colaboradores (175), estandarizado por Bernal (121). Este método consiste en dejar caer una cantidad del producto desde un embudo ubicado en una altura específica sobre una superficie lisa y milimétrica. Al caer, el polvo forma una especie de cono invertido con determinada altura y radio, los cuales se midieron para calcular el ángulo de reposo empleando la siguiente fórmula:

$$\theta = \text{ArcTan} \frac{h}{r} \quad (2.6)$$

Dónde h corresponde a la altura y r corresponde al radio del cono formado al caer el polvo.

El ángulo de reposo es el máximo ángulo formado entre el eje horizontal y la pendiente del cono invertido. Cuanto menor sea este ángulo, el comportamiento del material será el de fluir con mayor facilidad. Se efectuaron cinco repeticiones por triplicado para un total de quince datos.

▪ Contenido de aceite superficial y eficiencia de carga

Para la determinación del aceite superficial se tomaron muestras exactamente pesadas de 500 mg de microcápsulas, las cuales se lavaron cinco veces con 1 mL de acetato de etilo, se filtraron y llevaron a volumen de 5,0 mL (165). Para su análisis, se preparó una dilución tomando 40 μL de la muestra anterior y se llevó a 1,0 mL en acetato de etilo; se realizó análisis de cromatografía de gases acoplada a detector de masas por triplicado,

de igual forma que lo reportado previamente en la identificación del aceite esencial de tomillo.

La eficiencia de carga (LC por sus siglas en inglés, Loading Capacity) se calculó con la Ecuación (2.7) por semi-cuantificación empleando el método de estándar externo de único punto y normalización de áreas (171).

$$\%LC = \frac{[\textit{Aceite total en el microencapsulado} - \textit{aceite superficial}]}{\textit{Aceite total en el microencapsulado}} \times 100 \quad (2.7)$$

- **Morfología**

Se identificó la morfología mediante microscopía electrónica de barrido en un equipo FEI QUANTA 200. Las superficies de las microcápsulas fueron recubiertas con oro a un grosor de aproximadamente 20 nm utilizando un sistema combinado de recubrimiento por *sputter* y por evaporación de carbón, Quorum Technologies Q150R ES.

- **Estudio de estabilidad**

Se evaluaron tres lotes de la formulación seleccionada en el DEE, las cuales fueron sometidas a prueba de estabilidad con el fin de evaluar si el sistema brindaba alguna protección. Para ello, se introdujeron tres muestras por lote, en una cabina de estabilidad (Cámara climatizada Memmert® HPP750), colocadas en envase de vidrio de borosilicato, inerte, recubiertas con papel aluminio y con cierre hermético, a temperatura de 30° C y 75% de humedad relativa; se realizaron muestreos a los siguientes tiempos: 0, 24, 72, 168 y 480 horas.

A las muestras de cada tiempo de muestreo, se les observó el aspecto y se les determinó la EE a través de GC/MS (Thermo®, TRACE 1300 Mainframe MS), según la metodología reportada previamente en la identificación del aceite esencial de tomillo, mediante semi-cuantificación por el método de estándar externo de único punto y normalización de áreas (171). Para ello, se preparó una dilución del aceite esencial puro como estándar de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente. A las tres muestras evaluadas se les determinó el promedio y su desviación estándar.

3. Resultados

3.1 Caracterización de las materias primas.

3.1.1 Aceite esencial de tomillo.

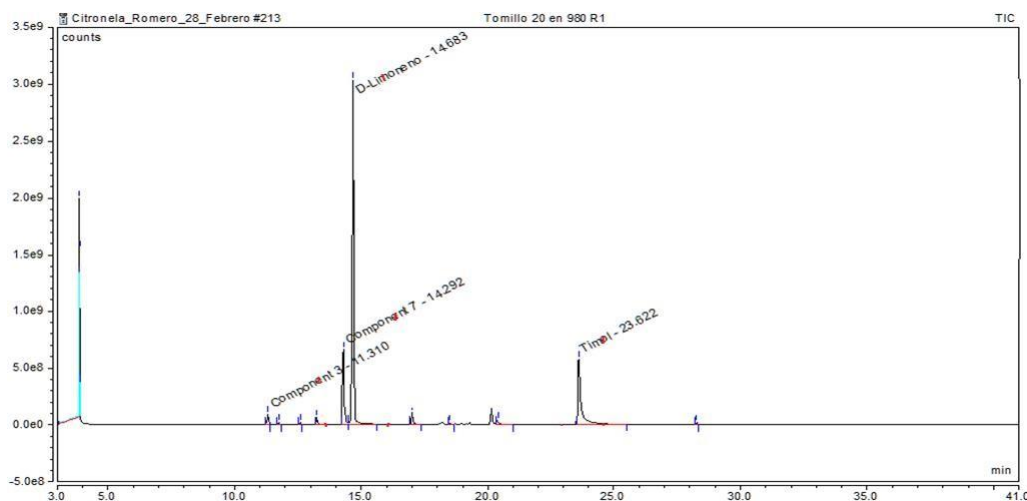
Para efectos de control de calidad y para la posterior cuantificación del aceite retenido en las microcápsulas, se realizó el análisis de cromatografía de GC/MS al lote de partida del aceite esencial de tomillo que permitió identificar 24 componentes, que se ilustran en la Tabla 3-1 y cuyo perfil cromatográfico se presenta en la Figura 3-1.

Tabla 3-1: Perfil de composición del aceite esencial de tomillo obtenido mediante GC/MS.

# Pico	Nombre Compuesto	Área	Proporción (%)
1	Triciclono	2595187,37	0,10
2	α -pineno	47920962,05	1,99
3	Canfeno	11738750,52	0,48
4	Sabineno	12540253,88	0,52
5	Pineno	4618000,99	0,19
6	β -pineno	41079026,99	1,71
7	3-careno	1809279,04	0,07
8	p-cimeno	366627131,58	15,30
9	D-limoneno	1093935066,35	45,65
10	p-mentha-1,4(8)-diene	3640225,07	0,15
11	β -linalool	60298337,54	2,51
12	exo-Fenchol	1851865,86	0,07
13	Trans-p-mentha-2,8-dienol	1901098,99	0,07
14	Canfor	13749643,71	0,57
15	iso- β -terpineol	67276057,53	2,80

# Pico	Nombre Compuesto	Área	Proporción (%)
16	Isoborneol	37415944,45	1,56
17	Endo-borneol	72193356,86	3,01
18	2-isopropenyl-5-methylhex-4-enal	629305,79	0,02
19	Terpinen-4-ol	3692964,90	0,15
20	α-terpineol	76655032,08	3,20
21	γ-terpineol	23023995,52	0,96
22	Timol	437608387,74	18,27
23	Cariofileno	9368880,78	0,39
24	Eremofileno	1768160,69	0,07

Figura 3-1: Cromatograma del aceite esencial de tomillo (20 µL/980µL), obtenido mediante GC/MS con impacto electrónico.



Los principales componentes del aceite esencial de tomillo objeto de esta investigación, observados en el análisis de cromatografía de gases acoplado a masas, fueron el monoterpeno cíclico **D-limoneno** (45,65%), el monoterpeno fenólico **timol** (18,26%) y el monoterpeno hidrocarburo **p-cimeno** (15,30%); el D-limoneno, fue seleccionado como marcador analítico por ser el componente mayoritario. De acuerdo con estos resultados, la composición química identificada corresponde a un quimiotipo de *Thymus Vulgaris* que hasta la fecha no ha sido reportado, al cual nombraremos quimiotipo D-limoneno, ya que

es el monoterpeno dominante en este aceite esencial. Los quimiotipos que se han identificado previamente corresponden a geraniol, α -terpineol, tujanol-4, linalol, carvacrol, timol, 1,8-cineol (176–178) borneol, hidrato de sabineno y ciclocitral/verbenol (179). Por otro lado, Satyal y colaboradores describieron 20 quimiotipos de *T. vulgaris* a partir de un análisis jerárquico de conglomerados basado en 85 composiciones de aceites esenciales, observando que el quimiotipo más común fue el timol (46% de las muestras) y el segundo fue el tipo p-cimeno/timol (21%). No obstante, en ninguno de estos 20 quimiotipos se reportó el D-limoneno como componente mayoritario.

Como se anotó previamente, los diferentes quimiotipos de aceite esencial de tomillo se presentan dependiendo del suelo, del clima, de la época y del tiempo de recolección, entre otros aspectos que inciden en la existencia de estos polimorfismos químicos. Por ejemplo, Gouyon y colaboradores concluyeron que la humedad del suelo tiene influencia en la estructura del quimiotipo ya que en entornos xéricos estables se expresan los quimiotipos fenólicos timol y carvacrol, mientras que en ambientes más húmedos se favorecen los quimiotipos no fenólicos (180).

Al comparar con los resultados de investigaciones de aceite esencial de tomillo en el territorio nacional (Tabla 3-2), se evidenció que los quimiotipos más reportados corresponden a timol, mientras sólo hay un quimiotipo referente a β -pineno/1,8-cineol/o-cimeno; adicionalmente, la proporción del componente D-limoneno encontrada es muy baja, no superando el 0,3%.

Tabla 3-2: Componentes mayoritarios del aceite esencial de tomillo reportados por otros investigadores en Colombia.

Componentes mayoritarios	Zona de cultivo	Investigadores
Timol (30.6%) γ-terpineno (27.3%) p-cimeno (10.9%)	Invernaderos de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá	Roldán (8)
Timol (31.67%) p-cimeno (14.93%) γ-terpineno (12.07%)	Rionegro, Antioquia	Morales (64)
Timol (21,2%) p-cimeno (20,2%) γ-terpineno (10,5%)	Bucaramanga	Parra (181)
Timol (63,46%) p-cimeno (15,55%) Carvacrol (12,48%)	Cundinamarca	Matiz y colaboradores (150)
β-pineno (29,0%) 1,8-cineol (21,5%) o-cimeno (17,9%)	Fusagasugá, Cundinamarca	Coy y Acosta (182)

De acuerdo con la composición química identificada, considerando los componentes mayoritarios encontrados, se confirma la actividad biológica esperada (antimicrobiana y antifúngica) del aceite esencial, según la literatura, como se muestra a continuación:

Para el D-limoneno, componente principal que pertenece a los hidrocarburos monoterpénicos cíclicos (183), se ha reportado actividad antimicrobiana débil (184–186), antifúngica (187), antioxidante (188), quimiopreventiva (189), anticancerígena (190) y antidiabética (191). Se planteó que el mecanismo antimicrobiano del limoneno se da por acumulación en la membrana plasmática microbiana causando pérdida de la integridad de la misma (192). En cuanto a la actividad biológica del timol, monoterpeno fenólico y segundo componente mayoritario, se han demostrado sus amplias propiedades antimicrobianas (183,193–195), antioxidantes (196), antiinflamatorias (197) y anticancerígenas (198), entre otras (199). Como mecanismo de acción antibacteriano se ha planteado la afectación de la permeabilidad de la membrana al causar disrupción, así como la interacción con proteínas de membrana y dianas intracelulares de las bacterias (200). De igual forma, para el p-cimeno se ha reportado actividad antimicrobiana contra

E. coli (201), así como actividad antifúngica (187). Otros compuestos minoritarios que también poseen acción antimicrobiana y antifúngica, que pueden actuar sinérgicamente, son α -terpineol (3,20%), β -linalool (2,51%), α -pineno (1,99%) y β -pineno (1,71%) (202– 206).

▪ Densidad e índice de refracción

El promedio de densidad específica obtenido fue 0,8784 g/mL a 17 ± 1 °C y de índice de refracción fue 1,4343 a 21 ± 1 °C.

Estos resultados son similares a los reportados por Coy y Acosta, quienes encontraron valores de 0,78-0,80 g/mL y 1,4900-1,5002 correspondientes a densidad e índice de refracción para aceite esencial de tomillo, respectivamente (182), mientras Soto-Mendivil y colaboradores informaron valores de 0,939 g/mL y 1,4914 para estas mismas propiedades (207). Las diferencias encontradas posiblemente se relacionan con la variación en la composición del aceite, de acuerdo con lo explicado previamente.

3.1.2 Almidón de ñame modificado

El rendimiento del proceso de extracción del almidón de ñame nativo seco fue de aproximadamente 20% a partir del material vegetal, lo que correspondió a 2 kilogramos. Este resultado es similar al reportado previamente para este mismo tubérculo *Dioscorea rotundata* por Moorthy y Nair (208); mientras que fue superior a lo reportado por otros investigadores (136,137,209).

El material obtenido fue de color blanco grisáceo, libre de material extraño, olor y textura parecida a la del almidón de maíz, y mantuvo estas características organolépticas luego de su modificación, tal como se muestra en la Figura 3-2.

Figura 3-2: Aspecto del almidón de ñame succinatado.



▪ **Determinación del grado de sustitución (DS)**

Para verificar la reacción de sustitución por parte del reactivo OSA (cadenas de ocho carbonos) en las cadenas poliméricas del almidón de ñame, se realizó esta prueba. Los resultados se presentan en la Tabla 3-3.

Tabla 3-3: Grado de sustitución de los lotes de almidón hidrolizado y lipofilizado con reactivo OSA.

Lote almidón de ñame modificado	Grado de sustitución
1	0,0106
2	0,0127
3	0,0105

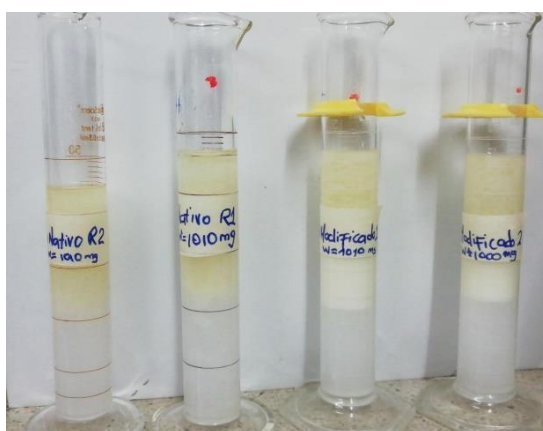
Los valores obtenidos están conformes con lo reportado en investigaciones previas en las que realizaron modificación por succinación con reactivo OSA en almidones (166,210).

▪ **Capacidad emulsificante**

Los resultados de este ensayo tanto para el almidón modificado como para el almidón nativo se presentan en la Tabla 3-4. En la Figura 3-3 se ilustra la diferencia en el comportamiento de cada almidón para esta prueba.

Tabla 3-4: Capacidad emulsificante de los almidones de ñame modificado y nativo.

Tipo de almidón	VTL (mL)	VCE (mL)	ER (%)
Nativo	45,5	0	0
Modificado	46,5	13	27,9
n=2; VTL: volumen total del líquido; VCE: volumen capa emulsificada; ER: emulsión remanente			

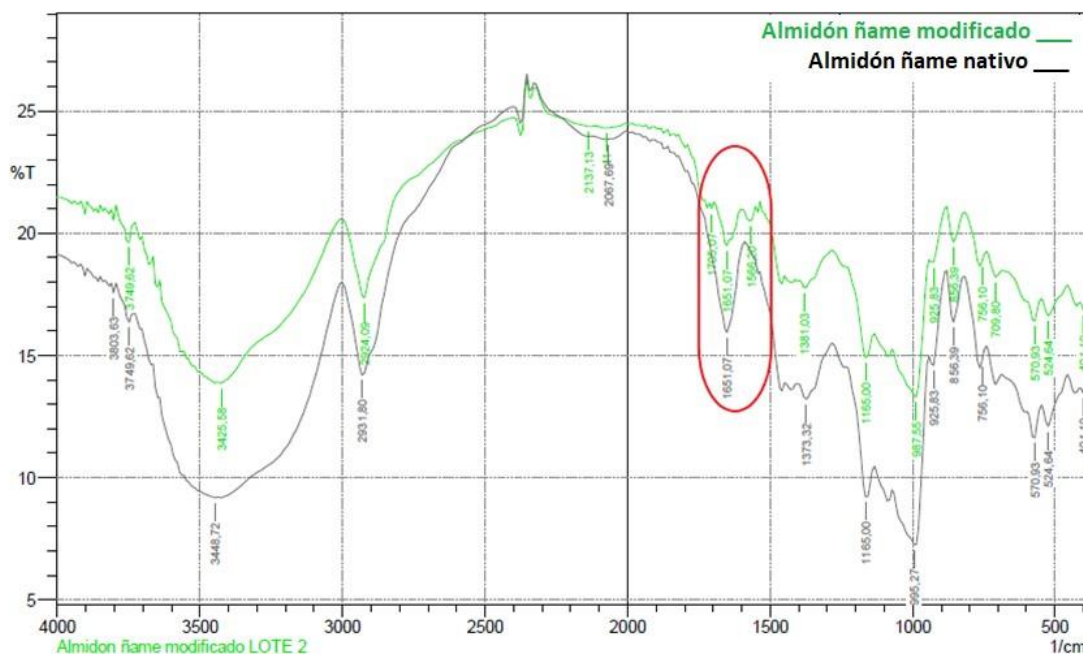
Figura 3-3: Aspecto de las emulsiones formadas después de 24 h en reposo.

Los valores obtenidos en este ensayo son inferiores a los reportados por Matiz y colaboradores (150), 61-68%, y Torrenegra y colaboradores (137), 61-69%, para el almidón de ñame modificado con anhídrido dodecenil succínico (DDSA), en condiciones similares a las empleadas en este estudio. Esta diferencia puede estar relacionada con el mayor número de unidades en la cadena carbonada que posee el DDSA en comparación con el OSA, lo que lo hace más hidrofóbico.

▪ **Análisis por espectroscopia infrarroja (IR)**

La modificación del almidón de ñame se confirmó mediante IR, comparando las diferencias entre los espectros del almidón nativo con el modificado, corroborando las interacciones entre el grupo OH de la glucosa y el grupo carboxilo del anhídrido, tal como se presenta en la Figura 3-4.

Figura 3-4: Espectro infrarrojo del almidón de ñame nativo y del almidón modificado por succinatación.



En el espectro infrarrojo, se observa tanto la señal característica del almidón modificado que corresponde a la vibración del grupo carbonilo (C=O) perteneciente al carboxilo de la cabeza que queda libre del anhídrido succínico en la región de $1705,07 \text{ cm}^{-1}$, el cual está ausente en el almidón de ñame nativo, como la vibración de estiramiento inverso del carbonilo (O-C=O) en la región de $1566,2 \text{ cm}^{-1}$. Estos resultados concuerdan con los reportados en la literatura previamente para modificación por succinatación de almidones (166,211–213).

3.1.3 Condiciones de emulsificación y caracterización

Las condiciones de emulsificación determinadas se describen en la Tabla 3-5. Los dos tipos de matriz definidos, G/M y G/M/AÑS, permitieron la emulsificación del aceite. La relación de fases oleosa/acuosa que emulsificó fue 1:6. La velocidad de homogenización adecuada fue de 13000 rpm y el tiempo entre 15 y 20 minutos. La viscosidad de ambas emulsiones se encontraba muy por debajo del límite máximo permitido (300 cps) para la

alimentación en el equipo de secado por aspersión.

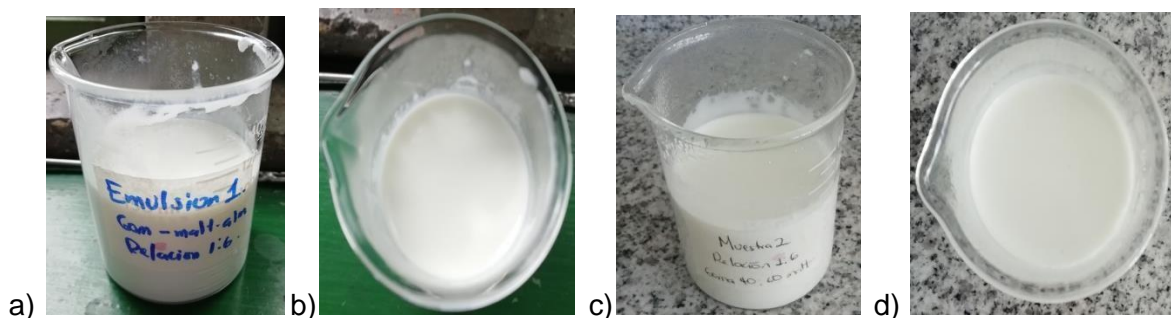
Tabla 3-5: Condiciones de emulsificación del aceite esencial de tomillo con las matrices seleccionadas.

Ensayo	Relación AET:matriz	Matriz	Velocidad de homogenización (rpm)	Tiempo de homogenización (min)	Resultado	Viscosidad (cps)
1	1:4	G:M (50:50)	15000	30	No emulsificó	No medido
2	1:5	G:M (50:50)	15000	20	No emulsificó	No medido
3	1:6	G:M (50:50)	13000	20	Emulsificó	200
4	1:6	G:M:AÑS (1/3:1/3:1/3)	13000	15	Emulsificó	112,5

G: Goma arábica, M: Maltodextrina, AÑS: Almidón de ñame succinatado. AET: Aceite esencial de tomillo

El aspecto visual observado de las emulsiones fue adecuado, sin evidenciar separación de fases durante 24 horas ni gotículas de aceite sin emulsificar, como se muestra en la Figura 3-5. No obstante, sí se evidenció separación de fases durante el almacenamiento a temperatura ambiente y de refrigeración en el lapso de 7 días, siendo mayor a medida que transcurría el tiempo. Cabe anotar que con la agitación mecánica se lograban dispersar nuevamente las fases separadas.

Figura 3-5: Aspecto de las emulsiones seleccionadas para el DEE.



Las imágenes a y b corresponden a la matriz goma/maltodextrina/almidón de ñame succinatado; y las imágenes c y d corresponden a la matriz goma/maltodextrina.

3.1.4 Microencapsulación y caracterización de las microcápsulas

Las condiciones definidas para cada experimento según el DEE se muestran en la Tabla 3-6. Por su parte, los resultados de la caracterización de estos experimentos se presentan en la Tabla 3-7.

Tabla 3-6: Condiciones para la obtención de los experimentos del diseño estadístico experimental.

Experimento	Factores				
	Matriz polimérica	Flujo Nitrógeno (L/h)	Flujo aspiración (m ³ /h)	Flujo alimentación (mL/min)	Temperatura de inyección (° C)
1	G/M	414	32	6	142
2	G/M	414	38	3	142
3	G/M	601	32	6	138
4	G/M	601	38	3	138
5	G/M/AÑS	414	32	3	142
6	G/M/AÑS	414	38	6	142
7	G/M/AÑS	601	32	3	138
8	G/M/AÑS	601	38	6	138

G: Goma arábica, M: Maltodextrina, ANS: Almidón succinatado

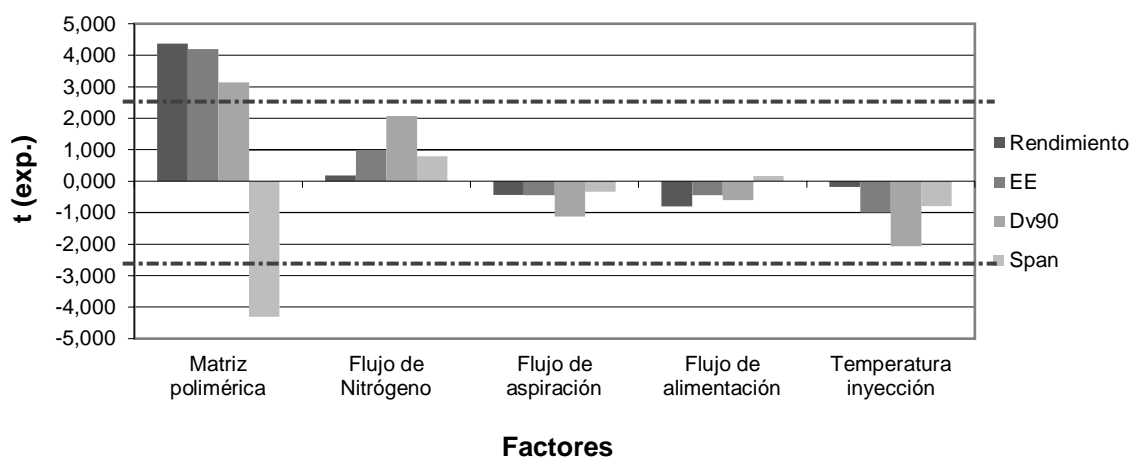
Tabla 3-7: Resultados de las variables caracterizadas para los experimentos del diseño estadístico experimental.

Experimento	Variables respuesta			
	Rendimiento (%)	EE* (%)	DV90* (µm)	Span
1	3,69	34,65 ± 0,53	40,60 ± 0,98	10,51 ± 0,02
2	5,40	34,17 ± 0,16	36,67 ± 0,60	9,13 ± 0,07
3	4,14	45,70 ± 0,41	47,67 ± 2,00	13,11 ± 0,78
4	6,56	46,16 ± 0,67	46,30 ± 2,09	12,34 ± 0,37
5	34,55	87,12 ± 2,46	52,00 ± 0,36	1,63 ± 0,02
6	23,51	69,72 ± 1,51	52,93 ± 0,25	1,40 ± 0,02
7	31,79	87,47 ± 0,98	74,50 ± 1,30	2,36 ± 0,02
8	28,73	86,70 ± 2,59	56,03 ± 0,25	1,81 ± 0,01

*EE: eficiencia de encapsulación; DV90: tamaño de partícula.
Los valores se expresan como el promedio ± la desviación estándar para tres determinaciones.

Para evaluar los resultados anteriores y seleccionar las condiciones más adecuadas para la microencapsulación, se realizó un análisis estadístico de cada variable respuesta respecto a los factores del DEE. En la Figura 3-6 se presenta una gráfica de comparación entre los efectos de los factores frente al t para ver su significancia sobre cada variable.

Figura 3-6: Influencia de los factores frente a t y su significancia en las variables respuesta.



Como se puede apreciar en la figura anterior, sólo el factor matriz polimérica en el nivel alto tuvo un efecto estadísticamente significativo, con un $p < 0,05$, sobre las variables respuestas *rendimiento*, *eficiencia de encapsulación* y *tamaño de partícula*. En otras palabras, la presencia del almidón modificado en la matriz polimérica favoreció para obtener mayores rendimientos del proceso, eficiencias de encapsulación más altas y tamaños de partícula más grandes, lo cual coincidió con las características deseadas. En contraste, el factor matriz polimérica en el nivel bajo tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la variable respuesta *span*, es decir, que la matriz polimérica conformada solo por goma arábica y maltodextrina aumentó esta variable respuesta, mientras que la matriz polimérica que contenía almidón modificado la disminuyó, esto último era lo pretendido para evitar una mayor variabilidad en los tamaños de partícula.

Por otro lado, los demás factores no tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre las demás variables respuesta por lo que el nivel elegido dependió del efecto

deseado. El objetivo era maximizar las variables respuesta rendimiento, EE, Dv90 y disminuir el span. En la Tabla 3-8 se presenta el análisis cualitativo realizado a partir de los resultados del análisis estadístico del DEE y los niveles seleccionados para cada factor de acuerdo con el efecto deseado.

Tabla 3-8: Resultados del análisis estadístico del diseño estadístico experimental.

Variable respuesta	Efecto deseado	Matriz polimérica	Flujo de Nitrógeno	Flujo de aspiración	Flujo de alimentación	Temperatura
Rendimiento	↑	+	No	No	No	No
Eficiencia de encapsulación	↑	+	No	No	No	No
Tamaño de partícula DV ₉₀	↑	+	No	No	No	No
Span	↓	No	No	No	No	No

↑: Maximizar; ↓ Minimizar
 No: La variable de ensayo no tiene efecto estadísticamente significativo sobre la variable respuesta en ninguno de los niveles evaluados.
 +: La variable de ensayo tiene efecto estadísticamente significativo sobre la variable respuesta en su nivel superior.

Teniendo en cuenta los resultados descritos, se seleccionaron las condiciones que se presentan en la Tabla 3-9 para definir la formulación y las condiciones del proceso de microencapsulación, las cuales coincidieron con las del experimento 7 del DEE.

Tabla 3-9: Condiciones seleccionadas para la formulación de microcápsulas.

Matriz polimérica	Flujo Nitrógeno	Flujo aspiración	Flujo alimentación	T inyección
G/M/AÑS	601 L/h	32 m ³ /h	3 mL/min	138° C

La eficiencia de encapsulación promedio de esta formulación fue de 87,47%. Este resultado refleja una muy buena interacción de los biopolímeros, especialmente del AÑS, que por su carácter lipofílico, debido a su larga cadena hidrocarbonada resulta más afín con el aceite, aumentando la capacidad de encapsulación (214).

El resultado de la EE es superior al obtenido por Tomazelli y colaboradores (57,37%), empleando el mismo aceite y la misma técnica de microencapsulación pero diferente biopolímero, en este caso solo maltodextrina (149), lo que confirma la influencia del AÑS en el aumento en el valor de este parámetro. Resultados similares o incluso superiores al obtenido en esta investigación se encontraron microencapsulando el aceite de tomillo empleando otras técnicas y biopolímeros (13,150,153,157).

Respecto al tamaño de partícula (74,50 μm), los resultados estuvieron por debajo de lo deseado, ya que el tamaño de la boquilla del equipo es de 1,5 mm. Se buscaba un tamaño mayor teniendo en cuenta que los pollos recién nacidos prefieren alimentos con diámetros superiores a 0,7 mm, mientras que los pollos adultos tienen preferencia por partículas más groseras con tamaño superior a 1,20 mm (22,23). Este resultado relativamente bajo puede deberse al alto valor del flujo del gas de secado. No obstante, se debería evaluar la aplicación del producto obtenido en la alimentación de los pollos de engorde, con el fin de observar si es consumido directamente con el alimento o si se requiere una operación unitaria posterior a la microencapsulación tal como granulación o peletizado. Por otro lado, el span obtenido fue satisfactorio (2,36) y es indicativo de la homogeneidad entre las partículas.

En comparación con lo encontrado en la literatura, el tamaño de partícula obtenido en esta investigación fue considerablemente superior al reportado por Tomazelli y colaboradores (10,37 μm y span de 1,67) empleando el mismo método de encapsulación, y maltodextrina como material de recubrimiento (149). Estos resultados permiten deducir que el tamaño aumenta al incluir otros componentes en la matriz, así como posiblemente también hay influencia de las condiciones del proceso.

- **Características organolépticas**

El *color* y *aspecto* observado corresponde a un polvo blanco, inicialmente con textura de polvo suelto, y *olor* aromático característico a tomillo. En la Figura 3-7 se muestra el aspecto de las micropartículas.

Figura 3-7: Aspecto de las micropartículas de la formulación definida.



▪ **Fluidez**

El ángulo de reposo promedio obtenido fue de $45,35^\circ \pm 1,25$, el valor mínimo obtenido fue $43,87^\circ$ y el valor máximo fue $46,38^\circ$. Estos resultados demuestran que el material obtenido posee baja fluidez, de acuerdo con la clasificación dada (167). Este comportamiento puede derivarse de su tamaño de partícula muy fino y de la cohesividad entre las partículas debido al aceite superficial que no se encapsula (175).

▪ **Eficiencia de carga**

Se obtuvo una eficiencia de carga promedio de $78,83\% \pm 0,98$. Este valor fue inferior al reportado por Tomazelli y colaboradores ($87,16\%$) (149); en contraste con lo sucedido en la eficiencia de encapsulación que determina el aceite total encapsulado respecto al teórico y cuyo resultado de este estudio fue superior, en esta medición se observa que un porcentaje de este aceite quedó a nivel superficial.

▪ **Morfología**

La Figura 3-8 presenta el aspecto de las micropartículas de aceite esencial de tomillo observado por SEM mientras la Figura 3-9 muestra el aspecto de las micropartículas vacías, es decir, sólo con los componentes de la matriz polimérica sin el aceite esencial de tomillo.

Figura 3-8: Aspecto microcápsulas de aceite esencial de tomillo visualizadas por microscopía electrónica de barrido.

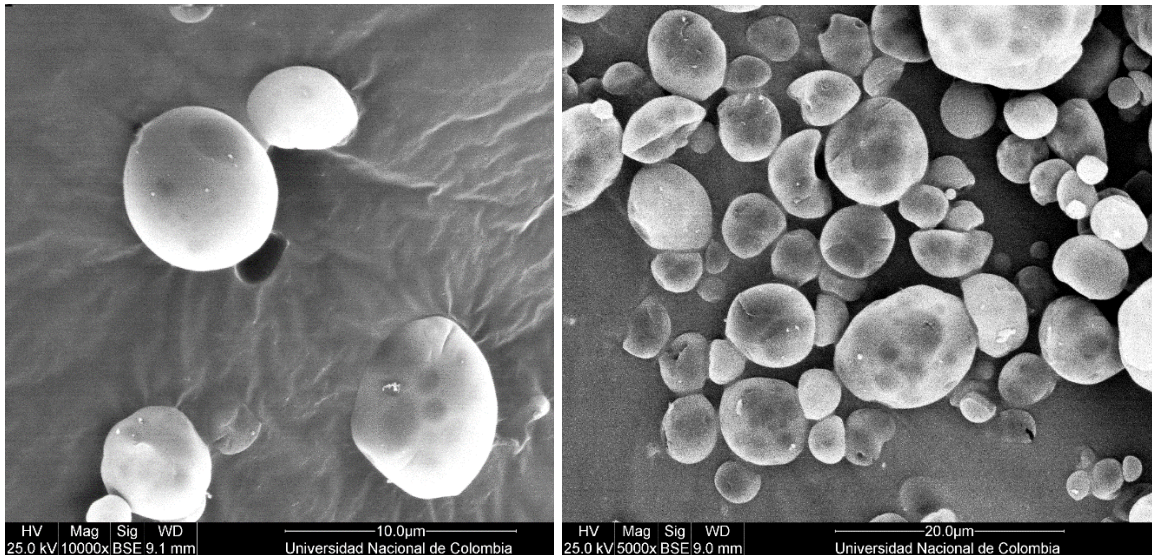
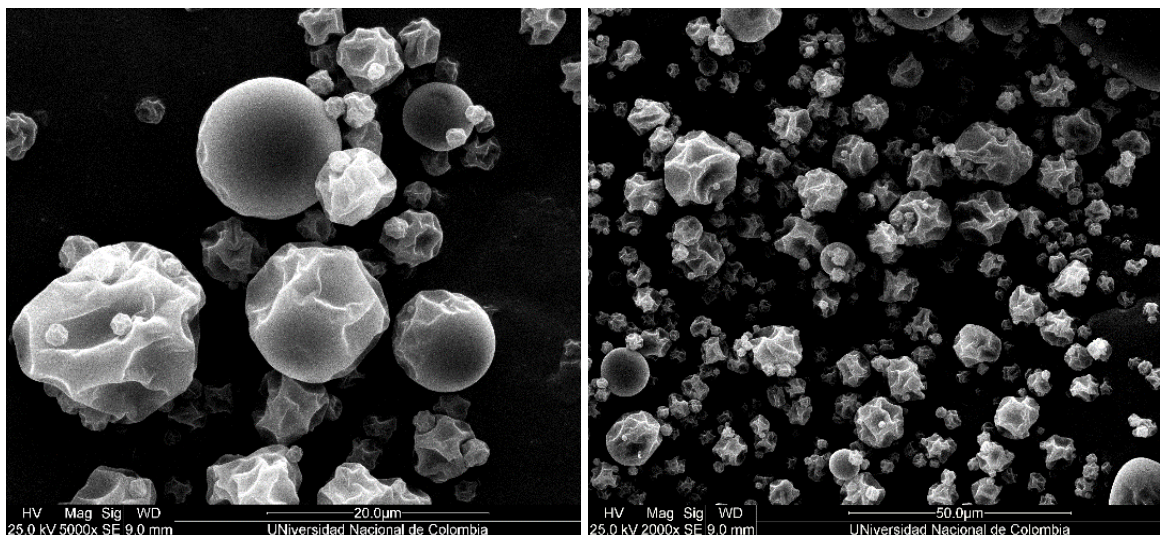


Figura 3-9: Aspecto microcápsulas vacías visualizadas por microscopía electrónica de barrido.



La morfología de las micropartículas, observada mediante microscopía electrónica de barrido, fue ovalada o esférica, similar a lo encontrado en otro estudio (149). Se aprecian algunas formas irregulares, las cuales puede relacionarse con las micropartículas que inicialmente quedan adheridas al material de vidrio del equipo de secado por aspersión.

Por el contrario, las micropartículas vacías se observan muy irregulares y comprimidas. La forma esférica u ovalada de las micropartículas que contienen el aceite de tomillo las hacen adecuadas, considerando la preferencia de los pollos hacia partículas con formas de semillas.

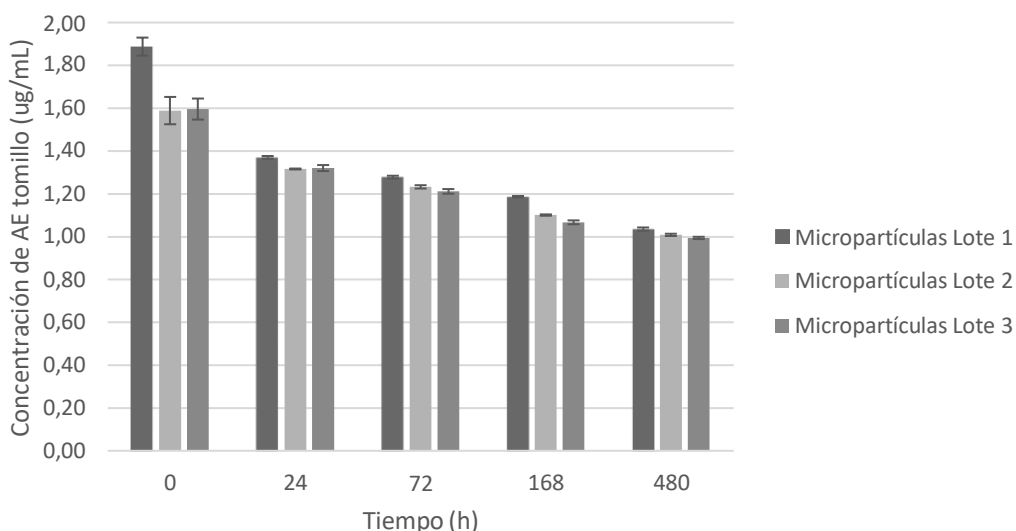
▪ **Estudio de estabilidad**

Los resultados de este ensayo para los tres lotes de micropartículas de la formulación seleccionada se muestran en la Tabla 3-10 y gráficamente en la Figura 3-10. A partir de las áreas del marcador D-Limoneno, observadas en las muestras analizadas en cada tiempo de muestreo, se estableció que el máximo porcentaje en el que se disminuyó la concentración de este marcador fue de 37,8%, que corresponde a lo ocurrido en el día 20 con el lote 3. Para los lotes 1 y 2, estos valores fueron de 32,3% y 36,5%, respectivamente. Los resultados mostraron que en los cromatogramas se mantienen las señales de los componentes mayoritarios del aceite esencial de tomillo. La disminución en la concentración podría atribuirse a la degradación de los compuestos presentes en el aceite, aunque se presume que esto ocurrió en baja proporción ya que no hubo cambios importantes en los cromatogramas a los diferentes tiempos evaluados. Se sugiere que una parte del aceite esencial de tomillo posiblemente se volatilizó.

Tabla 3-10: Resultados de la variación de la concentración de D-limoneno, para tres lotes del aceite esencial de tomillo microencapsulado, en función del tiempo a 30°C y 75% de humedad relativa.

Réplica	Concentración D-limoneno (ug/mL)				
	Tiempo 0h	Tiempo 24h	Tiempo 72h	Tiempo 7d	Tiempo 20d
Lote 1	1,89	1,37	1,28	1,19	1,03
Lote 2	1,59	1,32	1,23	1,10	1,01
Lote 3	1,60	1,32	1,21	1,07	0,99

Figura 3-10: Comportamiento de la concentración del D-limoneno en función del tiempo a 30°C, 75% de humedad relativa (n=5).



Aunque en este estudio no se evaluó la porosidad de la matriz que conforma las micropartículas, en la literatura científica se evidencian comportamientos con compuestos volátiles microencapsulados que, al incluirlos dentro de un sistema reservorio que contiene goma arábica y maltodextrina individualmente, no presentan una suficiente protección frente a la oxidación (215–222). Este comportamiento es una consecuencia de la porosidad que caracteriza a estos dos materiales, ya que estos poros o grietas permiten la penetración de la humedad y del oxígeno atmosférico, llevando a la posible degradación, especialmente por oxidación de algunos de sus componentes, además de las pérdidas por volatilización (215–222). En el presente estudio, no se hizo un seguimiento a los productos de degradación, por lo que no se podría afirmar de manera contundente que esto hubiera ocurrido, se parte del hecho de que aparentemente, además de los cambios en la concentración del D-limoneno, no se evidenció la aparición de señales nuevas en los cromatogramas.

No obstante, a pesar de los inconvenientes que reporta la literatura científica, relacionados con la goma arábica y la maltodextrina de manera individual, en otro trabajo de investigación se demostró que este aspecto mejora en presencia de almidones modificados. Este es el caso del almidón modificado HI-CAP 100 que suministró una alta estabilidad al D-limoneno encapsulado, sugiriendo que la mejora podría deberse a la

morfología de las microcápsulas, las cuales se caracterizaron por su superficie lisa no porosa (161). En la presente tesis, de acuerdo con las imágenes tomadas por SEM, que ilustran una superficie lisa para las microcápsulas que incluyen al aceite de tomillo (Figura 3-8), podría suponerse que la presencia del AÑS en la composición del material de pared, junto con la goma arábiga y la maltodextrina, podría estar compensando los problemas de porosidad demostrados en los estudios mencionados.

Aunque en el presente estudio hubo pérdidas en términos del D-limoneno de alrededor del 35%, se considera que, bajo las condiciones evaluadas, la matriz polimérica ejerció una protección al aceite, en comparación con lo reportado en investigaciones similares, (159,223).

Con esta investigación, cuyo propósito fue aportar al desarrollo de un microencapsulado de aceite esencial de tomillo y su caracterización, se obtuvo un sistema microparticulado con unas propiedades farmacotécnicas y de estabilidad, susceptibles de ser optimizadas, sistema al que puede evaluarse su posible aplicación como promotor de crecimiento en la producción de pollos de engorde.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1. Conclusiones

El aceite esencial de tomillo fue identificado y cuantificado por cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas, evidenciando que sus componentes mayoritarios fueron D-limoneno (45,65%), timol (18,26%) y p-cimeno (15,30%) en un total de 24 componentes; el D-limoneno fue seleccionado como marcador analítico. Cabe destacar que la composición química identificada en la presente investigación no corresponde a los quimiotipos de *Thymus Vulgaris* reportados en bibliografía hasta la fecha, por lo cual se nombró como quimiotipo D-limoneno, al ser el monoterpeno dominante en el aceite esencial de este estudio. Por otra parte, la densidad e índice de refracción determinados fueron 0.8784 g/mL y 1.43, respectivamente.

Los biopolímeros seleccionados para constituir la matriz de recubrimiento y que conformaron la emulsión que se atomizó por secado por aspersion fueron goma arábica, maltodextrina y almidón de ñame modificado con anhídrido octenil succínico, dado que no sólo poseen buena capacidad emulsificante, sino que también son grado alimenticio, aptos para el consumo por parte de los pollos y posterior consumo humano.

El almidón de ñame modificado químicamente por succinatación con hidrólisis previa, se caracterizó en cuanto al grado de sustitución que fue de 0.37, la capacidad emulsificante de 27,9% y se verificó la modificación química mediante espectroscopía infrarroja observando la señal característica que corresponde a la vibración del grupo carbonilo (C=O) en la región de 1705,07 cm^{-1} perteneciente al carboxilo de la cabeza que queda libre del anhídrido succínico, así como la vibración de estiramiento inverso del carbonilo (O-C=O) en la región de 1566,20.

Se evaluaron y seleccionaron las condiciones de emulsificación, de manera que la emulsión tuviera una estabilidad física aceptable previo a su atomización, definiendo una relación de fases oleosa/acuosa de 1:6, velocidad y tiempo de homogenización de 13000 rpm y 20 minutos, respectivamente. Para la matriz G/M se definió una proporción 50:50 de cada dispersión de biopolímero y para la matriz G/M/AÑS se definieron proporciones equivalentes (1/3: 1/3: 1/3). Las viscosidades de las emulsiones fueron 200 cps para G/M y 112,5 cps para G/M/AÑS, siendo adecuadas para la alimentación en el equipo de secado por aspersión.

Se planteó un diseño estadístico experimental (DEE) fraccionado 2^5 que contempló ocho experimentos, cuyas variables de ensayo fueron: tipo de matriz polimérica, temperatura de inyección, flujo de nitrógeno, flujo de alimentación y flujo de aspiración; mientras que las variables respuesta fueron: rendimiento, eficiencia de encapsulación, tamaño de partícula e índice de dispersión. El análisis estadístico de los resultados del DEE demostró que el tipo de matriz polimérica tuvo una influencia estadística significativa en las variables respuesta con un $p < 0,05$, mientras que las demás variables de ensayo no tuvieron una influencia estadísticamente significativa, por lo que el nivel elegido para éstas dependió del efecto deseado. Se establecieron como condiciones de la formulación y del proceso las siguientes: matriz polimérica G/M/AÑS, flujo de nitrógeno 601 L/h, flujo de aspiración 32 m³/h, flujo de alimentación 3 ml/min y temperatura de inyección 138°C, las cuales coincidieron con las condiciones del experimento siete, del DEE.

Se evaluaron y caracterizaron las propiedades farmacotécnicas de los sistemas obtenidos. Los microencapsulados elaborados bajo las condiciones seleccionadas fueron de color blanco, textura de polvo suelto y olor característico a aceite de tomillo. El rendimiento obtenido fue de 48.5%. La eficiencia de encapsulación promedio de esta formulación fue de 87,47% mientras que la eficiencia de carga fue de 78,83%. El tamaño de partícula determinado como Dv90 fue de 74,50 μm y el índice de dispersión o Span fue de 2,36. La morfología observada por SEM corresponde a partículas esféricas u ovaladas.

Se evidenció la protección física que proporcionó la cubierta polimérica al aceite esencial de tomillo para disminuir su volatilización dado que el máximo porcentaje en que se

disminuyó la concentración hasta los 20 días de transcurrido el ensayo de estabilidad fue de 37,8% para el lote 3, 36,5% para el lote 2 y 32,3% para el lote 1. Esta disminución en la concentración podría atribuirse a la degradación de los compuestos presentes en el aceite, aunque se presume que esto ocurrió en baja proporción, mientras se deduce que una gran parte del aceite esencial de tomillo se volatilizó.

Se evidenció que las micropartículas de aceite esencial de tomillo obtenidas bajo las condiciones definidas mediante el método de secado por aspersión usando biopolímeros como materiales de matriz, cuentan con las características básicas iniciales para ser empleadas con una posible aplicación en la alimentación de pollos de engorde.

4.2. Recomendaciones

Evaluar la estabilidad química, realizando la comparación con el sistema microparticulado seleccionado. Para ello, a la formulación elegida se le incluiría en el aceite, antioxidantes liposolubles tipo fenólicos para complementar la protección brindada por la microencapsulación y de esta manera determinar si se da una mejora en la estabilidad frente a la oxidación, habiendo previamente establecido la metodología analítica para tal fin.

Profundizar en la influencia de la porosidad de la matriz polimérica sobre la estabilidad del aceite esencial de tomillo microencapsulado.

Optimizar la formulación seleccionada, considerando aquellos factores que tuvieron mayor influencia sobre las variables respuesta elegidas.

Realizar los estudios del comportamiento de liberación del aceite esencial de tomillo a partir de los sistemas desarrollados.

Desafiar el (los) sistema(s) microparticulado(s) en un estudio de campo, para evaluar su empleo como posible promotor de crecimiento.

Realizar el estudio de estabilidad que permita establecer la vida útil del sistema microparticulado con miras a una posible aplicación comercial.

Bibliografía

1. Moore PR, Evenson A, Luckey TD, McCoy E, Elvehjem CA, Hart EB. Use of sulfasuxidine, streptothricin, and streptomycin in nutritional studies with the chick. *J Biol Chem.* 1946;165:437–41.
2. Rosen GD. Antibacterials in poultry and pig nutrition. *Biotech Anim Feeds Anim Feed.* 1995:143–72.
3. Cepero Briz R. Retirada de los antibióticos promotores del crecimiento en la Unión Europea: Causas y consecuencias. XII Congr Bien la Asoc Mex Espec en Nutr Avícola. 2005.
4. Franz C, Baser K, Windisch W. Essential oils and aromatic plants in animal feeding - a European perspective. A review. *Flavour Fragr J.* 2010;25:327–340.
5. Organización Mundial de la Salud (OMS). Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. 2016.
6. Instituto Colombiano Agropecuario ICA. Resolución 1966 del 5 de septiembre de 1984.
7. Congreso de la República. Proyecto de Ley 104 de 2008.
8. Roldán Forero LP. Evaluación del uso de los aceites esenciales como alternativa al uso de los antibióticos promotores de crecimiento en pollos de engorde. Universidad Nacional de Colombia; 2010.
9. Silva Vazquez R, Dunford N. Bioactive components of mexican oregano oil as affected by moisture and plant maturity. *J Essent Oil Res.* 2005;17:668–71.
10. Sokmen A, Gulluce M, Akpulat HA, Daferera D, Tepe B, Polissiou M, et al. The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control.* 2004;15:627–634.

11. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA. Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. *J Food Saf.* 2007;27:91–101.
12. Popovic S, Puvaca N, Kostadinovic L, Dzinic N, Jasna B, Vasiljevic M, et al. Effects of dietary essential oils on productive performance, blood lipid profile, enzyme activity and immunological response of broiler chickens. *Eur Poult Sci.* 2016;80:1–12.
13. Del Toro-Sánchez CL, Ayala-Zavala JF, Machi L, Santacruz H, Villegas-Ochoa MA, Alvarez-Parrilla E, et al. Controlled release of antifungal volatiles of thyme essential oil from β -cyclodextrin capsules. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* 2010;67(issue 3):431–41.
14. FUDE F. ¿Qué es la producción avícola? [Internet]. Available from: <http://www.educativo.net/articulos/que-es-la-produccion-avicola-876.html>
15. Aguilera M. Determinantes del desarrollo en la avicultura en Colombia: instituciones, organizaciones y tecnología. [Internet]. Cartagena, Colombia; 2014. (Documentos de Trabajo Sobre Economía Regional; vol. 214). Available from: <https://repositorio.banrep.gov.co/handle/20.500.12134/3177>
16. Revista Dinero. ¿Por qué la industria avícola colombiana está volando alto? [Internet]. 2017. Available from: <https://www.semana.com/edicion-impresa/negocios/articulo/como-va-la-industria-avicola-en-colombia/242959/>
17. Barroeta AC, Izquierdo D, Pérez JF. *Manual de Avicultura.*
18. Angulo E. *Fisiología Aviar.* Edicions de la Universitat de Lleida. 2009.
19. Angel R, Kim SW, Li W, Jimenez-Moreno E. Velocidad de paso y pH intestinal en aves. In: XXIX Curso de Especialización FEDNA, University of Maryland College Park. 2013.
20. Moran ET. *Comparative nutrition of fowl and swine: the gastrointestinal systems.* Guelph, Ontario, Canadá: University of Guelph; 1982.
21. Lott BD, Day EJ, Deaton JW, May JD. The effect of temperature, dietary energy level, and corn particle size on broiler performance. *Poult Sci.* 1992;71(4):618-24.
22. Nir I, Shefet G, Aaroni Y. Effect of particle size on performance. 1. Corn. *Poult Sci.* 1994;73(1:45-9).
23. Nir I, Hillel R, Shefet G, Nitsan Z. Effect of grain particle size on performance. 2. Grain texture interactions. *Poult Sci.* 1994;73(6):781-91.

24. Huang K, De Beer M. Influence of feed form on intake preference and performance of young broilers. In: Proc Aust Poult Sci Symp 21. 2010;103–6.
25. Hamilton RMG, Proudfoot FG. Ingredient particle size and feed texture: effects on the performance of broiler chickens. Anim Feed Sci Technol. 1995;51(3–4):203–210.
26. Svihus B, Kløvstad KH, Perez V, Zimonja O, Sahlström S, Schüller RB, et al. Physical and nutritional effects of pelleting of broiler chicken diets made from wheat ground to different coarsenesses by the use of roller mill and hammer mill. Anim Feed Sci Technol. 2004;117(3–4):281–293.
27. Borja E. Alimentación de broilers: aspectos prácticos (I). Jor prof Avic. 2010.
28. Mateos GG, García Valencia D, Vicente Piqueras B. Influencia del procesado de ingredientes y piensos terminados sobre la productividad en monogástricos. XXI Curso de Especialización FEDNA, Universidad Politécnica de Madrid. 2005.
29. Reyes E, Morales E, Ávila E. Evaluación de promotores de crecimiento en pollos de engorda, en un sistema de alimentación restringida y a libre acceso*. Vet Méx. 2000;31(1):1–9.
30. Sumano López H, Gutierrez Olvera L. Consideraciones farmacológicas de la antibiotioterapia en aves. V Simp Bras Sul Avic. 2004;1:86–106.
31. Michiels J, Missotten J, Dierick N, Fremaut D, Maene P, De Smet S. In vitro degradation and in vivo passage kinetics of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde along the gastrointestinal tract of piglets. J Sci Food Agric. 2008;88(13):2371–2381.
32. Ocel'ová V, Chizzola R, Battelli G, Pisarcikova J, Faix S, Gai F, et al. Thymol in the intestinal tract of broiler chickens after sustained administration of thyme essential oil in feed. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl). 2019;103(1):204–209.
33. Stokstad EL, Jukes TH, Pierce J, Page AC, Franklin AC. The multiple nature of the animal protein factor. J Biol Chem. 1949; 180(2):647–54.
34. Butaye P, Devriese LA, Haesebrouck F. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: Effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. Clin Microbiol Rev. 2003;16:175–88.
35. Bywater R. Benefits and microbiological risks of feed additive antibiotics. Cahiers Options Méditerranéennes. 1999;37:77–82.
36. Feighner SD, Dashkevicz MP. Subtherapeutic levels of antibiotics in poultry feeds

- and their effects on weight gain, feed efficiency, and bacterial cholytaurine hydrolase activity. *Appl Environ Microbiol.* 1987;53:331–336.
37. Huddleston JR. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: Potential spread of antibiotic resistance genes. Vol. 7, *Infect Drug Resist.* 2014(7):167-176.
 38. Klümper U, Riber L, Dechesne A, Sannazzarro A, Hansen LH, Sørensen SJ, et al. Broad host range plasmids can invade an unexpectedly diverse fraction of a soil bacterial community. *ISME J.* 2015;9:934-945.
 39. Lerminiaux NA, Cameron ADS. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Can J Microbiol.* 2019;65(1):34-44.
 40. Li J. Current status and prospects for in-feed antibiotics in the different stages of pork production - A review. *Asian-Australasian J Anim Sci.* 2017;30(12):1667–73.
 41. Garofalo C, Vignaroli C, Zandri G, Aquilanti L, Bordoni D, Osimani A, et al. Direct detection of antibiotic resistance genes in specimens of chicken and pork meat. *Int J Food Microbiol.* 2007;113(1):75–83.
 42. Gundogan N, Citak S, Yucel N, Devren A. A note on the incidence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and chicken samples. *Meat Sci.* 2005;69(4):807–10.
 43. Cui S, Ge B, Zheng J, Meng J. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* serovars in organic chickens from Maryland retail stores. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(7):4108–4111.
 44. Ramchandani M, Manges AR, DebRoy C, Smith SP, Johnson JR, Riley LW. Possible animal origin of human-associated, multidrug-resistant, uropathogenic *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis.* 2005;40(2):251–257.
 45. Kim S-H, Wei C-I, Tzou Y-M, An H. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from farm environments and retail products in Oklahoma. *J Food Prot.* 2005;68(10):2022–9.
 46. Parveen S, Taabodi M, Schwarz JG, Oscar TP, Harter-Dennis J, White DG. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* Recovered from Processed Poultry. *J Food Prot.* 2007;70(11):2466–72.
 47. Mena C, Rodrigues D, Silva J, Gibbs P, Teixeira P. Occurrence, identification, and characterization of *Campylobacter* species isolated from Portuguese poultry samples collected from retail establishments. *Poult Sci.* 2008;87(1):187–90.

48. Diarrassouba F, Diarra MS, Bach S, Delaquis P, Pritchard J, Topp E, et al. Antibiotic resistance and virulence genes in commensal *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from commercial broiler chicken farms. *J Food Prot.* 2007;70(6):1316–27.
49. Campagnolo ER, Johnson KR, Karpati A, Rubin CS, Kolpin DW, Meyer MT, et al. Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations. *Sci Total Environ.* 2002;299(1–3):89–95.
50. Ma F, Xu S, Tang Z, Li Z, Zhang L. Use of antimicrobials in food animals and impact of transmission of antimicrobial resistance on humans. *Biosafety and Health.* 2021;3(1):32-38.
51. Castanon JIR. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poult Sci.* 2007;86(11):2466–71.
52. The White House Administration. National Action Plan for Combating Antibiotic-Resistant Bacteria. *Open Gov Natl Action Plans.* 2015.
53. Hashemi SR, Davoodi H. Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition. *Vet Res Commun.* 2011(3):169-80.
54. Castillo-López RI, Gutiérrez-Grijalva EP, Leyva-López N, López-Martínez LX, Heredia JB. Natural alternatives to growth-promoting antibiotics (GPA) in animal production. *J Anim Plant Sci.* 2017;27(2):349.
55. Griggs JP, Jacob JP. Alternatives to antibiotics for organic poultry production. *J Appl Poult Res.* 2005;14(4):750-756.
56. Vieco-Saiz N, Belguesmia Y, Raspoet R, Auclair E, Gancel F, Kempf I, et al. Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. Vol. 10, *Front Microbiol.* 2019;10:57.
57. Pournazari M, Qotbi AA, Seidavi A, Corazzin M. Prebiotics, probiotics and thyme (*Thymus vulgaris*) for broilers: performance, carcass traits and blood variables. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 2017;30(1):3–10.
58. Ferrándiz M. Encapsulación de aceites esenciales funcionales para su aplicación en agricultura. *Universitat Politècnica de Valencia;* 2015.
59. Briskin DP. Medicinal Plants and Phytomedicines. *Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health. Plant Physiol.* 2000;124(2):507–514.
60. Surburg H, Panten J. Common Fragrance and Flavors materials: preparation,

- properties and uses. 5ta ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co; 2006.
61. Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. Natural products (Secondary Metabolites). *Biochem Mol Biol Plants*. 2000;24:1250–1319.
 62. Garcia C, Martínez A, Ortega J, Castro F. Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Rev Química Viva*. 2010;9(2):86–96.
 63. Martínez A. Aceites Esenciales. Universidad de Antioquia; 2003.
 64. Morales A. Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial del Tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre la contaminación de *Listeria monocytogenes* en queso Ricotta. Universidad Nacional de Colombia; 2015.
 65. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol*. 2004;94(3):223–53.
 66. Carson CF, Mee BJ, Riley T V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(6):1914–20.
 67. Giannenas I, Florou-Paneri P, Papazahariadou M, Christaki E, Botsoglou NA, Spais AB. Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. *Arch Anim Nutr*. 2003;57(2):99–106.
 68. Lira C. Microencapsulación de aceite de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth), determinación de su actividad y antimicrobiana y antioxidante y su aplicación en carne cruda de cerdo. Universidad Autónoma de Querétaro; 2015.
 69. Lambert RJ, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJ. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol*. 2001;91(3):453–62.
 70. Ultee A, Kets EP, Smid EJ. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65(10):4606-10.
 71. Veldhuizen EJA, Tjeerdsma-Van Bokhoven JLM, Zweijtzer C, Burt SA, Haagsman HP. Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *J Agric Food Chem*. 2006;54(5):1874-9.
 72. Di Pasqua R, Hoskins N, Betts G, Mauriello G. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene,

- cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *J Agric Food Chem.* 2006;54(7): 2745-9.
73. Burt SA, Van Der Zee R, Koets AP, De Graaff AM, Van Knapen F, Gaastra W, et al. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(14):4484-90.
 74. Lee KW, Everts H, Kappert HJ, Frehner M, Losa R, Beynen AC. Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. *Br Poult Sci.* 2003;44(3):450–7.
 75. Jang IS, Ko YH, Yang HY, Ha JS, Kim JY, Kim JY, et al. Influence of essential oil components on growth performance and the functional activity of the pancreas and small intestine in broiler chickens. *Asian-Australasian J Anim Sci.* 2004;17(3):394-400.
 76. Jang IS, Ko YH, Kang SY, Lee CY. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. *Anim Feed Sci Technol.* 2007;134(3–4):304-315.
 77. Youdim KA, Deans SG. Effect of thyme oil and thymol dietary supplementation on the antioxidant status and fatty acid composition of the ageing rat brain. *Br J Nutr.* 2000;83(1):87-93.
 78. Puertas-Mejía M, Hillebrand S, Stashenko E, Winterhalter P. In vitro radical scavenging activity of essential oils from Colombian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil. *Flavour Fragr J.* 2002;17(5):380–384.
 79. Gortzi O, Lalas S, Chinou I, Tsaknis J. Reevaluation of antimicrobial and antioxidant activity of *Thymus* spp. extracts before and after encapsulation in liposomes. *J Food Prot.* 2006;69(12):2998–3005.
 80. Hernández F, Madrid J, García V, Orengo J, Megías MD. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. *Poult Sci.* 2004;83(2):169–174.
 81. El-Ghousein S, Al-beitawi N. The Effect of Feeding of Crushed Thyme (*Thymus vulgaris* L) on Growth, Blood Constituents, Gastrointestinal Tract and Carcass Characteristics of Broiler Chickens. *J Poult Sci.* 2009;46:100–104.
 82. Dapkevicius A, Van Beek TA, Lelyveld GP, Van Veldhuizen A, De Groot A, Linszen JPH, et al. Isolation and structure elucidation of radical scavengers from *Thymus vulgaris* leaves. *J Nat Prod.* 2002;65(6):892-6.

83. Chun H, Jun WJ, Shin DH, Hong BS, Cho HY, Yang HC. Purification and characterization of anti-complementary polysaccharide from leaves of *Thymus vulgaris* L. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2001;49(6):762–4.
84. Khan RU, Naz S, Nikousefat Z, Tufarelli V, Laudadio V. *Thymus vulgaris*: Alternative to antibiotics in poultry feed. *Worlds Poult Sci J*. 2012;68(3):401–8.
85. Stojanovic R, Belscak-Cvitanovic A, Manojlovic V, Komes D, Nedovic V, Bugarski B. Encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) aqueous extract in calcium alginate beads. *J Sci Food Agric*. 2012;92(3):685–96.
86. Attia YA, Bakhawain AA, Bertu NK. Thyme oil (*Thymus vulgaris* L.) as a natural growth promoter for broiler chickens reared under hot climate. *Ital J Anim Sci*. 2017;16(2):275–282.
87. Mohsenzadeh M. Evaluation of antibacterial activity of selected Iranian essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in nutrient broth medium. *Paki J Biol Sci*. 2007;10(20):3693–7.
88. Snoussi M, Hajlaoui H, Noumi E, Usai D, Sechi LA, Zanetti S, et al. In-vitro anti-*Vibrio* spp. activity and chemical composition of some Tunisian aromatic plants. *World J Microbiol Biotechnol*. 2008;24(12):3071–3076.
89. Zu Y, Yu H, Liang L, Fu Y, Efferth T, Liu X, et al. Activities of ten essential oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells. *Molecules*. 2010;15(5):3200–10.
90. Rojas J, Ortiz J, Jáuregui J, Ruiz J, Almonacid R. Aceite esencial de *Thymus vulgaris* L (tomillo), su combinación con EDTA contra *Cándida albicans* y formulación de una crema. *An la Fac Med*. 2015;76(3):235–40.
91. Chizzola R, Michitsch H, Franz C. Antioxidative properties of *Thymus vulgaris* leaves: Comparison of different extracts and essential oil chemotypes. *J Agric Food Chem*. 2008;56(16):6897–904.
92. Allen PC, Danforth HD, Augustine PC. Dietary modulation of avian coccidiosis. *Int J Parasitol*. 1998;28(7):1131–1140.
93. Denli M, Okan F, Uluocak AN. Effect of dietary supplementation of herb essential oils on the growth performance, carcass and intestinal characteristics of quail (*Coturnix coturnix japonica*). *S Afr J Anim Sci*. 2004;34(3):174–9.
94. Langhout P. New additives for broiler chickens. *World Poult*. 2000;16(3):22–27.
95. Zeweil H. Effect of spices as feed additives on the performance and egg quality of

- Japanese quail. In: The 68th Scient Conf of Polish Animl Prod Soc, 9-12 September. 2003.
96. Zhang KY, Yan F, Keen CA, Waldroup PW. Evaluation of microencapsulated essential oils and organic acids in diets for broiler chickens. *Int J Poult Sci.* 2005;4(9):612–619.
 97. Bölükbaşı ŞC, Erhan MK, Özkan A. Effect of dietary thyme oil and vitamin E on growth, lipid oxidation, meat fatty acid composition and serum lipoproteins of broilers. *South African J Anim Sci.* 2006;36(3).
 98. Cross DE, McDevitt RM, Hillman K, Acamovic T. The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. *Br Poult Sci.* 2007;48(4):496–506.
 99. Ocak N, Erener G, Burak Ak F, Sungu M, Altop A, Ozmen A. Performance of broilers fed diets supplemented with dry peppermint (*Mentha piperita* L.) or thyme (*Thymus vulgaris* L.) leaves as growth promoter source. *Czech J Anim Sci.* 2008;53(4):169.175.
 100. Al-Kassie G. Influence of two plant extracts derived from thyme and cinnamon on broiler performance. *Pak Vet J.* 2009;29(4).
 101. Toghyani M, Tohidi M, Gheisari AA, Tabeidian SA. Performance, immunity, serum biochemical and hematological parameters in broiler chicks fed dietary thyme as alternative for an antibiotic growth promoter. *African J Biotechnol.* 2010;9(40).
 102. Mansoub NH. Comparison of effects of using thyme and probiotic on performance and serum composition of broiler chickens. *Adv Enviromental Biol.* 2011;5(7):2012–2015.
 103. Al-Mashhadani E, Farah K, Farhan Y, Al-Mashhadani H. Effect of anise, thyme essential oils and their mixture on broiler performance and some on physiological traits. *Egypt Poult Sci.* 2011;31(2):481–489.
 104. Fallah R, Mirzaei E. Effect of Dietary Inclusion of Turmeric and Thyme powders on performance, blood parameters and immune system of broiler chickens. *J Livest Sci.* 2016;7(7):180–186.
 105. Sarica S, Ciftci A, Demir E, Kilinc K, Yildirim Y. Use of an antibiotic growth promoter and two herbal natural feed additives with and without exogenous enzymes in wheat based broiler diets. *South African J Anim Sci.* 2005;35(1):61–72.
 106. Haselmeyer A, Zentek J, Chizzola R. Effects of thyme as a feed additive in broiler

- chickens on thymol in gut contents, blood plasma, liver and muscle. *J Sci Food Agric*. 2014;95(3):504–8.
107. Stashenko EE. Aceites esenciales. Universidad Industrial de Santander; 2009.
 108. Turek C, Stintzing FC. Stability of essential oils: A review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2013;12(1):40–53.
 109. Nguyen H, Campi EM, Roy Jackson W, Patti AF. Effect of oxidative deterioration on flavour and aroma components of lemon oil. *Food Chem*. 2009;112(2):388–93.
 110. Choe E, Min DB. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2006;5(4):169–186.
 111. Bäcktorp C, Wass JR, Panas I, Sköld M, Börje A, Nyman G. Theoretical investigation of linalool oxidation. *J Phys Chem A*. 2006;110(44):12204–12.
 112. Bernhard RA, Marr AG. The oxidation of terpenes. I. Mechanism and reaction products of D-Limonene autoxidation. *J Food Sci*. 1960;25(4):517–530.
 113. Turek C, Stintzing FC. Impact of different storage conditions on the quality of selected essential oils. *Food Res Int*. 2012;46(1):341–353.
 114. Herrero AM, Carmona P, Jiménez-Colmenero F, Ruiz-Capillas C. Polysaccharide gels as oil bulking agents: Technological and structural properties. *Food Hydrocoll*. 2014;36:374–381.
 115. Marques HMC. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour Fragr J*. 2010;25(5):313–326.
 116. Dubey R, Shami TC, Bhasker Rao KU. Microencapsulation technology and applications. *Def Sci J*. 2009;59(1):82–95.
 117. Parra Huertas RA. Revisión: Microencapsulación de alimentos. *Rev Fac Nac de Agron Med*. 2010; 63(2):5669–5684.
 118. Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O, Voilley A, Saurel R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Res Int*. 2007;40(9):1107–21.
 119. Peña B, Panisello C, Aresté G, Garcia-Valls R, Gumí T. Preparation and characterization of polysulfone microcapsules for perfume release. *Chem Eng J*. 2012;179:394–403.
 120. Trojanowska A, Nogalska A, Valls R, Giamberini M, Tylkowski B. Technological solutions for encapsulation. *Phys Sci Rev*. 2017;2:1515.
 121. Bernal C. Desarrollo de un sistema de liberación modificada de un extracto

- estandarizado de *Physalis peruviana* L. aplicando el método de secado por aspersión. Universidad Nacional de Colombia. 2018.
122. García-Gutiérrez C, González-Maldonado MB, Ochoa-Martínez LA, Medrano-Roldán H. Microencapsulación del jugo de cebada verde mediante secado por aspersión. *Cienc y Tecnol Aliment*. 2004;4(4):262–266.
 123. Maury M, Murphy K, Kumar S, Shi L, Lee G. Effects of process variables on the powder yield of spray-dried trehalose on a laboratory spray-dryer. *Eur J Pharm Biopharm*. 2005;59(3):565–73.
 124. Badee A, El-Kader E, Aly M. Microencapsulation Of Peppermint Oil By Spray Drying. *Aust J Basic Appl Sci*. 2012;6(12):499–504.
 125. López Hernández OD, Gómez Carril M. Preparación de microesferas mediante secado por aspersión. *Rev Cub de Farm*. 2008;42(3).
 126. Ré M-I. Formulating Drug Delivery Systems by Spray Drying. *Dry Technol*. 2006;24(4):433–446.
 127. Gouin S. Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends Food Sci Technol*. 2004;15(7–8):330–347.
 128. Fernandes RVDB, Borges SV, Botrel DA. Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. *Carbohydr Polym*. 2014;101(1):524–532.
 129. Camacho JE, Villamizar LF, Gómez MI. Selección de un sistema de atomización para la formación de micropartículas de Eudragit® S100 en lecho fluido. *NOVA*. 2010;8(13):87–100.
 130. Murúa-Págola B, Beristain-Guevara CI, Martínez-Bustos F. Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *J Food Eng*. 2009;91(3):380–386.
 131. Madene A, Jacquot M, Scher J, Desobry S. Flavour encapsulation and controlled release - A review. *Int J Food Sci Technol*. 2006;41(1):1–21.
 132. Yáñez J, Salazar J., Chaires L, Jiménez J, Márquez M, Ramos EG. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Av y Perspect*. 2002;21(1):313–9.
 133. Fuchs M, Turchiuli C, Bohin M, Cuvelier ME, Ordonnaud C, Peyrat-Maillard MN, et al. Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidised bed agglomeration. *J Food Eng*. 2006;75(1):27–35.

134. Lokuwan J. Characteristics of microencapsulated β -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. *Food Hydrocoll.* 2007;21(5–6):928–35.
135. Zuluaga MF. Evaluación de la aplicación de almidón obtenido a partir del ñame (*Dioscorea rotundata*) en el sector farmacéutico, cosmético o alimentario. Universidad Nacional de Colombia; 2005.
136. Zuluaga MF, Baena Y, Mora CE, D'León LFP. Physicochemical characterization and application of yam (*Dioscorea cayenensis-rotundata*) starch as a pharmaceutical excipient. *Starch/Stärke.* 2007;59(7):307–317.
137. Torrenegra M, Méndez G, Matíz G, Gomez J. Lipofilización del almidón de *Dioscorea rotundata* P. y su posible uso como agente emulsificante. *Rev Cuba Farm.* 2015;49(4):605–17.
138. Contreras OIP, Perilla JEP, Enciso NAA. Revisión de la modificación química del almidón con ácidos orgánicos. *Ing e Investig.* 2008;28(3):47–52.
139. Jeon Y-S, Lowell AV, Gross RA. Studies of Starch Esterification: Reactions with Alkenylsuccinates in Aqueous Slurry Systems. *Starch - Stärke.* 1999;51(2–3):90–3.
140. Almeida AP, Rodríguez-Rojo S, Serra AT, Vila-Real H, Simplicio AL, Delgadillo I, et al. Microencapsulation of oregano essential oil in starch-based materials using supercritical fluid technology. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2013;20:140–5.
141. Garti N. Hydrocolloids as emulsifying agents for oil-in-water emulsions. *J Dispers Sci Technol.* 1999;20(1–2).
142. Dickinson E. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocoll.* 2009;23(6):1473-1482.
143. Bertolini AC, Siani AG, Grosso CRF. Stability of monoterpenes encapsulated in gum arabic by spray-drying. *J Agric Food Chem.* 2001;49(2):780–5.
144. Ruiz A. Efecto de una mezcla de extractos de plantas sobre indicadores de integridad intestinal y parámetros productivos en pollos de engorde. Universidad Nacional de Colombia; 2020.
145. Jaramillo Á. Evaluación del extracto de Ajo (*Allium sativum*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*) en el agua de bebida y su efecto en los parámetros productivos y salud intestinal de conejos, pollos de engorde y cerdos. SENA. Colección Libros de Investigación CBA. 2019.
146. Suarez O, Caicedo A, Galán J. Efecto de dos concentraciones de Extracto

- etanólico de Tomillo (*Thymus Vulgaris*) y Orégano (*Oreganum Vulgare*) suministrado en el agua de bebida de Pollos de Engorde. Universidad de Cundinamarca; 2007.
147. Moreno E, Arango G, Galán J. Evaluación In Vitro de la acción antibacterial de los Aceites Esenciales de: Orégano (*Origanum Vulgare*), Tomillo (*Thymus Vulgaris*) y Limonaria (*Cymbopogon Citratus*) frente a: *Escherichia Coli*, *Salmonella Gallinarum* y *Streptococcus Faecalis*, bacterias. Universidad de Cundinamarca; 2004.
 148. Valdés E. Microencapsulación de aceite esencial de tomillo por el método de secado por aspersion. Universidad Autónoma del Estado de México; 2020.
 149. Tomazelli Junior O, Kuhn F, Padilha PJM, Vicente LRM, Costa SW, Boligon AA, et al. Microencapsulation of essential thyme oil by spray drying and its antimicrobial evaluation against *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Brazilian J Biol.* 2017;78(2):311–7.
 150. Matiz G, Fuentes K, León G. Microencapsulación de aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) en matrices poliméricas de almidón de ñame (*Dioscorea rotundata*) modificado. *Rev Colomb Ciencias Químico Farm.* 2015;44(2):189–207.
 151. Soliman EA, El-Moghazy AY, El-Din MSM, Massoud MA. Microencapsulation of Essential Oils within Alginate: Formulation and in Vitro Evaluation of Antifungal Activity. *J Encaps Adsorpt Sci.* 2013;3(1).
 152. Benavides S, Cortés P, Parada J, Franco W. Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. *Food Chem.* 2016;240:77-83.
 153. Khalili ST, Mohsenifar A, Beyki M, Zhavah S, Rahmani-Cherati T, Abdollahi A, et al. Encapsulation of Thyme essential oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *LWT - Food Sci Technol.* 2015;60(1):502–8.
 154. Martins IM, Rodrigues SN, Barreiro F, Rodrigues AE. Microencapsulation of thyme oil by coacervation. *J Microencapsul.* 2009;26(8):667-675.
 155. Maia JD, La Corte R, Martinez J, Ubbink J, Prata AS. Improved activity of thyme essential oil (*Thymus vulgaris*) against *Aedes aegypti* larvae using a biodegradable controlled release system. *Ind Crops Prod.* 2019;136:110-120.
 156. Gonçalves ND, Pena F de L, Sartoratto A, Derlamelina C, Duarte MCT, Antunes

- AEC, et al. Encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil used as a natural preservative in bakery product. *Food Res Int.* 2017;96:154-160.
157. Kim JR, Sharma S. Acaricidal activities of clove bud oil and red thyme oil using microencapsulation against HDMs. *J Microencapsul.* 2011;28(1):82–91.
158. De Barros R, Marques G, Borges S, Botrel D. Effect of solids content and oil load on the microencapsulation process of rosemary essential oil. *Ind Crops Prod.* 2014;58:173–181.
159. Carneiro HCF, Tonon RV, Grosso CRF, Hubinger MD. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *J Food Eng.* 2013;115(4):443–451.
160. Silva VM, Vieira GS, Hubinger MD. Influence of different combinations of wall materials and homogenisation pressure on the microencapsulation of green coffee oil by spray drying. *Food Res Int.* 2014;61:132–143.
161. Soottitantawat A, Bigeard F, Yoshii H, Furuta T, Ohkawara M, Linko P. Influence of emulsion and powder size on the stability of encapsulated D-limonene by spray drying. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2005;6(1):107–114.
162. Aristizábal J, Sanchez T. Guía técnica para producción y análisis de almidón de Yuca, Capítulo 7 Extracción del almidón de yuca. *Bol Serv Agríc FAO.* 2007.
163. Zambrano F, Camargo C. Otimização das condições de hidrólise ácida de amido de mandioca para obtenção de substituto de gordura. *Brazilian J Food Technol.* 2001;4:147–54.
164. Chi H, Xu K, Xue D, Song C, Zhang W, Wang P. Synthesis of dodecanyl succinic anhydride (DDSA) corn starch. *Food Res Int.* 2007;40(2):232-238.
165. Fernandes R, Borges S, Botrel D, Keven E, Costa J, Queiroz F. Microencapsulation of Rosemary Essential Oil: Characterization of Particles. *Dry Technol.* 2013;31(11):1245–1254.
166. Song X, He G, Ruan H, Chen Q. Preparation and Properties of Octenyl Succinic Anhydride Modified Early Indica Rice Starch. *Starch/Staerke.* 2006;58(2):109–17.
167. United States Pharmacopeia and National Formulary. 2021.
168. Song X, Pei Y, Qiao M, Ma F, Ren H, Zhao Q. Preparation and characterizations of Pickering emulsions stabilized by hydrophobic starch particles. *Food Hydrocoll.* 2015;45:256–263.
169. Chevalier Y, Bolzinger MA. Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering

- emulsions. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2013;439:23–34.
170. Kusonwiriawong C, Lipipun V, Vardhanabhuti N, Zhang Q, Ritthidej GC. Spray-dried chitosan microparticles for cellular delivery of an antigenic protein: Physico-chemical properties and cellular uptake by dendritic cells and macrophages. *Pharm Res.* 2013;30(6):1677–97.
171. Harvey D. *Analytical Chemistry 2.0.* 2016.
172. Kausadikar S, Gadhawe AD, Waghmare J. Microencapsulation of lemon oil by spray drying and its application in flavour tea. *Adv Appl Sci Res.* 2015;6(4):69–78.
173. Jafari SM, He Y, Bhandari B. Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques. *J Food Eng.* 2007;82(4):478-488.
174. Kowalska M, Ziomek M, Zbikowska A. Stability of cosmetic emulsion containing different amount of hemp oil. *Int J Cosmet Sci.* 2015;37(4), 408-416.
175. Sinko PJ, Singh Y. *Martin's physical pharmacy and pharmaceutical sciences: Physical chemical and biopharmaceutical principles in the pharmaceutical sciences: Sixth edition.* 2011.
176. György Z, Incze N, Pluhár Z. Differentiating *Thymus vulgaris* chemotypes with ISSR molecular markers. *Biochem Syst Ecol.* 2020;92, 104118.
177. Thompson JD, Chalchat JC, Michet A, Linhart YB, Ehlers B. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *J Chem Ecol.* 2003;29(4), 859-880.
178. Trindade H, Pedro LG, Figueiredo AC, Barroso JG. Chemotypes and terpene synthase genes in *Thymus* genus: State of the art. *Industrial Crops and Products.* 2018; 124, 530-547.
179. Satyal P, Murray BL, McFeeters RL, Setzer WN. Essential oil characterization of *thymus vulgaris* from various geographical locations. *Foods.* 2016;5(4), 70.
180. Gouyon PH, Vernet P, Guillermin JL, Valdeyron G. Polymorphisms and environment: The adaptive value of the oil polymorphisms in *thymus vulgaris* L. *Heredity (Edinb).* 1986;57(1), 59-66.
181. Parra Sepúlveda SF. Estudio de la composición química y actividad biológica de aceites esenciales de Cardamomo (*Elettaria cardamomum*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*). Univ St Tomás, Bucaramanga. 1993.
182. Coy Barrera CA, Acosta EG. Actividad antibacteriana y determinación de la composición química de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*),

- tomillo (*Thymus vulgaris*) y cúrcuma (*Curcuma longa*) de Colombia. *Rev Cuba Plant Med.* 2013;18(2):237-246.
183. Gallegos-Flores PI, Bañuelos-Valenzuela R, Delgadillo-Ruiz L, Meza-López C, Echavarría-Cháirez F. Actividad Antibacteriana De Cinco Compuestos Terpenoides: Carvacrol, Limoneno, Linalool, A-Terpineno Y Timol. *Trop Subtrop Agroecosystems.* 2019;22(2), 241-246.
 184. Lis-Balchin M, Ochocka RJ, Deans S, Asztemborska M, Hart S. Bioactivity of the enantiomers of limonene. *Med Sci Res.* 1996;24(5):309-310.
 185. Zhang Z, Vriesekoop F, Yuan Q, Liang H. Effects of nisin on the antimicrobial activity of d-limonene and its nanoemulsion. *Food Chem.* 2014;150:307-312.
 186. Zahi MR, Liang H, Yuan Q. Improving the antimicrobial activity of D-limonene using a novel organogel-based nanoemulsion. *Food Control.* 2015;50:554-559.
 187. Filipowicz N, Kamiński M, Kurlenda J, Asztemborska M, Ochocka JR. Antibacterial and antifungal activity of juniper berry oil and its selected components. *Phyther Res.* 2003;17(3):227-231.
 188. Roberto D, Micucci P, Sebastian T, Graciela F, Anesini C. Antioxidant activity of limonene on normal murine lymphocytes: Relation to H₂O₂ modulation and cell proliferation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2010;106(1):38-44.
 189. Wattenberg LW, Coccia JB. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone carcinogenesis in mice by D-limonene and citrus fruit oils. *Carcinogenesis.* 1991;12(1):115-117.
 190. Crowell PL, Gould MN. Chemoprevention and therapy of cancer by d-limonene. Vol. 5, *Critical Reviews in Oncogenesis.* 1994;5(1):1-22.
 191. Murali R, Saravanan R. Antidiabetic effect of d-limonene, a monoterpene in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomed Prev Nutr.* 2012;2(4), 269-275.
 192. Sikkema J, De Bont JA, Poolman B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J Biol Chem.* 1994;269(11), 8022-8028.
 193. Olasupo NA, Fitzgerald DJ, Gasson MJ, Narbad A. Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Lett Appl Microbiol.* 2003;37(6), 448-451.
 194. Du E, Gan L, Li Z, Wang W, Liu D, Guo Y. In vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. *J Anim Sci Biotechnol.* 2015;6(1):58.

195. Nostro A, Blanco AR, Cannatelli MA, Enea V, Flamini G, Morelli I, et al. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiol Lett.* 2004;230(2):191-195.
196. Yanishlieva NV, Marinova EM, Gordon MH, Raneva VG. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chem.* 1999;64(1):59-66.
197. Braga PC, Dal Sasso M, Culici M, Bianchi T, Bordoni L, Marabini L. Anti-inflammatory activity of thymol: Inhibitory effect on the release of human neutrophil Elastase. *Pharmac.* 2006;77(3):130-136.
198. Kang SH, Kim YS, Kim EK, Hwang JW, Jeong JH, Dong X, et al. Anticancer effect of thymol on AGS human gastric carcinoma cells. *J Microbiol Biotechnol.* 2016;26(1):28-37.
199. Marchese A, Orhan IE, Daglia M, Barbieri R, Di Lorenzo A, Nabavi SF, et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chem.* 2016;210:402-414.
200. Di Pasqua R, Mamone G, Ferranti P, Ercolini D, Mauriello G. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. *Proteomics.* 2010;10(5), 1040-1049.
201. Cristani M, D'Arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro MG, Micieli D, et al. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *J Agric Food Chem.* 2007;55(15):6300-6308.
202. Li L, Chaofeng S, Zhongqiong Y, Renyong J, Lianci P, et al. Antibacterial activity of α -terpineol may induce morphostructural alterations in *Escherichia coli*. *Brazilian J Microbiol.* 2014;45(4):1409-1413.
203. Zhou H, Tao N, Jia L. Antifungal activity of citral, octanal and α -terpineol against *Geotrichum citri-aurantii*. *Food Control.* 2014;37(1):277-283.
204. Queiroga CL, Teixeira Duarte MC, Ribeiro BB, de Magalhães PM. Linalool production from the leaves of *Bursera aloexylon* and its antimicrobial activity. *Fitot.* 2007;78(4):327-328.
205. Hsu CC, Lai WL, Chuang KC, Lee MH, Tsai YC. The inhibitory activity of linalool against the filamentous growth and biofilm formation in *Candida albicans*. *Med Mycol.* 2013;51(5):473-482.

206. Rivas-da Silva AC, Lopes PM, Barros-de Azevedo MM, Costa DC, Alviano CS, Alviano DS. Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. *Molecules*. 2012;17(6):6305-6316.
207. Soto Mendivil EA, Moreno Rodríguez JF, Estarrón Espinosa M, et al. Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* against *Alternaria citri*. *e-Gnosis*. 2006;(4).
208. Moorthy SN, Nair SG. Studies on *Dioscorea rotundata* Starch Properties. *Starch - Stärke*. 1989;41(3):81-83.
209. Daiuto E, Cereda M, Sarmiento S, Vilpoux O. Effects of extraction methods on Yam (*Dioscorea alata*) starch characteristics. *Starch-Stärke*. 2005;57(3-4):153-160.
210. Bello-Pérez LA, Contreras-Ramos SM, Romero-Manilla R, Solorza-Feria J, Jiménez-Aparicio A. Propiedades químicas y funcionales del almidón modificado de plátano *musa paradisiaca* L. (Var. Macho). *Agrocencia*. 2002; 36(2):169-180.
211. Jimenez S. Contribución al estudio fisicoquímico de un complejo interpolielectrolítico y su aplicación como excipiente en una matriz de liberación modificada con Dexibuprofeno. Universidad Nacional de Colombia. 2017.
212. Zhu Z, Zhang L, Li M, Zhou Y. Effects of starch alkenylsuccinylation on the grafting efficiency, paste viscosity, and film properties of alkenylsuccinylated starch-g-poly(acrylic acid). *Starch-Stärke*. 2012;64(9):704-712.
213. Wu X, Liu P, Ren L, Tong J, Zhou J. Optimization of corn starch succinylation using response surface methodology. *Starch-Stärke*. 2014;66(5-6):508-514.
214. Dos Santos R, Da Silva-Buzanello RA, Corso MP, Canan C. Essential oils microencapsulated obtained by spray drying: a review. *Journal of Essential Oil Research*. 2019; 31(3):1-17.
215. Shahidi Noghabi M, Molaveisi M. The effect of wall formulation on storage stability and physicochemical properties of cinnamon essential oil microencapsulated by spray drying. *Chem Pap*. 2020;74(10):3455-3465.
216. Jimenez M, García HS, Beristain CI. Spray-dried encapsulation of Conjugated Linoleic Acid (CLA) with polymeric matrices. *J Sci Food Agric*. 2006;86(14):2431-2437.
217. Rosenberg M, Kopelman IJ, Talmon Y. A Scanning Electron Microscopy Study of Microencapsulation. *J Food Sci*. 1985;50(1):139-144.
218. Wagner LA, Warthesen JJ. Stability of Spray-Dried Encapsulated Carrot

- Carotenes. *J Food Sci.* 1995;60(5):1048-1053.
219. Drusch S, Rätzke K, Shaikh MQ, Serfert Y, Steckel H, Scampicchio M, et al. Differences in free volume elements of the carrier matrix affect the stability of microencapsulated lipophilic food ingredients. *Food Biophys.* 2009;4(1):42-48.
220. Campelo PH, Sanches EA, Fernandes RVB, Botrel DA, Borges SV. Stability of lime essential oil microparticles produced with protein-carbohydrate blends. *Food Res Int.* 2018;105:936-944.
221. Carrillo-Navas H, González-Rodea DA, Cruz-Olivares J, Barrera-Pichardo JF, Román-Guerrero A, Pérez-Alonso C. Storage stability and physicochemical properties of passion fruit juice microcapsules by spray-drying. *Rev Mex Ing Quim.* 2011;10(3):421-430.
222. Andersen AB, Risbo J, Andersen ML, Skibsted LH. Oxygen permeation through an oil-encapsulating glassy food matrix studied by ESR line broadening using a nitroxyl spin probe. *Food Chem.* 2000;70(4):499-508.
223. Charve J, Reineccius GA. Encapsulation performance of proteins and traditional materials for spray dried flavors. *J Agric Food Chem.* 2009;57(6):2486-2492.