

Coacervación compleja entre la goma arábica y el quitosano: Aplicación potencial en emulsiones y microencapsulados

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

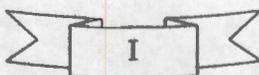
“IZTAPALAPA”

COACERVACIÓN COMPLEJA ENTRE LA GOMA
ARÁBIGA Y EL QUITOSANO: APLICACIÓN
POTENCIAL EN EMULSIONES Y
MICROENCAPSULADOS.

PRESENTA:

M. en C. HUGO ESPINOSA ANDREWS

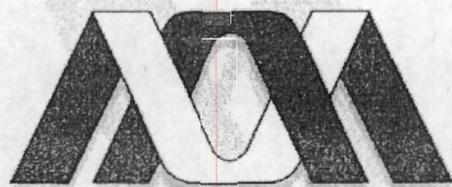
TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS (INGENIERÍA QUÍMICA).



Coacervación compleja entre la goma arábiga y el quitosano: Aplicación potencial en emulsiones y microencapsulados

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

“IZTAPALAPA”



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS E HIDRÁULICA

DOCTORADO EN CIENCIAS (INGENIERÍA QUÍMICA)

COACERVACIÓN COMPLEJA ENTRE LA GOMA ARÁBIGA Y EL QUITOSANO:
APLICACIÓN POTENCIAL EN EMULSIONES Y MICROENCAPSULADOS.

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS (INGENIERÍA QUÍMICA).

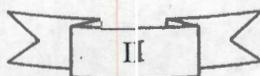
PRESENTA:

HUGO ESPINOSA ANDREWS

ASESOR:

DR. EDUARDO JAIME VERNON CARTER

ENERO 2008



AGRADECIMIENTOS

A mi esposa Nancy Stivaliz por su amor, comprensión y paciencia, a tu lado he conseguido alcanzar todas las metas propuestas en mi vida.

A Valeria por ser mi fortaleza y la razón de levantarme día a día.

A mis padres Rosa Martha y Juventino por su amor y consejos, gracias por apoyarme en todas las decisiones de mi vida.

A mis hermanos Roberto y Andrés por su amistad y compañía con la cual nunca me he sentido solo.

Agradezco especialmente a la Dra. Gretchen Terri Lapidus Lavine, Dr. Humberto Vázquez Torres, Dr. Jaime Vernon Carter, Dr. Jesús Gracia Fadrique y Dr. Gustavo F. Gutiérrez López, por ser parte del jurado evaluador quienes con sus aportaciones y comentarios contribuyeron invaluablemente a mejorar éste trabajo de investigación.

Agradezco al Dr. Jaime Vernon Carter por su apoyo incondicional y la amistad brindada, gracias por confiar en mí.

A mis amigos del laboratorio de biopolímeros Eva, Gabriel, Pablo, Diana, Rubén, Angélica, Abraham, Reina y Arturo quienes con su amistad y compañía permitieron que mi estancia durante los estudios del posgrado resultara más agradable.

A Ofelia por su amistad y su invaluable ayuda durante la realización de las pruebas de Microscopia Electrónica de Barrido.

A Eristeo por su amistad y consejos los cuales fueron de gran utilidad para la escritura de esta tesis.

A todas las personas que participaron de manera directa o indirecta en la realización de esta tesis de doctorado, así como en mi formación personal y profesional.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado para la realización de los estudios de doctorado y por la beca otorgada para la conclusión de esta tesis, a través del proyecto 45992 que lleva por nombre: "Estructuras y Propiedades Físicoquímicas de Películas Interfaciales y su Interrelación con la Protección de Nutracéuticos Emulsificados y Microencapsulados".

RESUMEN

En este trabajo se investigó la formación de complejos poliméricos entre la goma arábiga (GA) y el quitosano (Q), dos polisacáridos de carga opuesta, como una función de la relación de biopolímeros, concentración total de biopolímeros, pH y concentración de NaCl. Se determinaron las condiciones de formación de los complejos interbiopoliméricos insolubles (coacervación compleja) usando mediciones potenciométricas de los biopolímeros en solución; turbidimétricas y movilidad electroforética de la fase en equilibrio; y rendimiento de la fase coacervada. Las concentraciones relativas de los biopolímeros en la fase coacervada y la fase en equilibrio fueron cuantificadas por análisis elemental y cromatografía de líquidos de alta resolución, respectivamente. Los resultados indican que el mayor rendimiento de coacervado se obtiene al mezclar 5 gramos de goma arábiga por gramo de quitosano, independientemente de la concentración total de biopolímero usada. La formación de los complejos *goma arábiga-quitosano* dependen del pH y concentración de sal. El intervalo de pH de máxima interacción fue ubicado entre 3.5 - 5, con un punto de resistencia de NaCl de 150 mM. Los espectros de infrarrojo indicaron que el acomplejamiento se llevan a cabo por la interacción de los grupos carboxilo de la goma arábiga y los grupos amino del quitosano. Los complejos insolubles *goma arábiga-quitosano* fueron caracterizados como geles débiles con carácter predominantemente viscoso característico de las matrices coacervadas, presentando mayores propiedades viscoelásticas a un pH = 4.5. Las micrografías de los complejos *goma arábiga-quitosano* muestran un alto grado de entrecruzamiento entre los biopolímeros y presentan estructuras intrincadas de un gel complejo.

Posteriormente, se evaluaron las condiciones de formulación de emulsiones simples de aceite de canola como fase oleosa empleando goma arábiga como emulsionante. Las emulsiones de mayor estabilidad fueron producidas empleando 7600 rpm y 10 % (p/p) de goma arábiga. La emulsión simple con quitosano mostró una menor estabilidad en comparación con las emulsiones de goma arábiga. Tomando en cuenta esto, la formación de una emulsión simple por coacervación se efectuó mediante la adsorción secuencial de

los biopolímeros a la interfase. Primero se formuló la emulsión simple con goma arábica al 10% (p/p) y, posteriormente, esta emulsión fue redispersada en una solución de quitosano al 2% (p/p), produciendo la emulsión por coacervación O/W_{GAQ}. El incremento de la fase dispersa en las emulsiones O/W_{GAQ} originó un incremento en las propiedades viscoelásticas de las emulsiones. Las emulsiones O/W_{GAQ} con un contenido de fase dispersa del 10 y 20% (p/p) presentaron un comportamiento viscoso en todo el intervalo de frecuencias, estas dos emulsiones pueden ser utilizadas en aplicaciones de secado por aspersión. La emulsión O/W_{GAQ} con un contenido de fase dispersa del 40% (p/p) presentó un comportamiento elástico en todo el intervalo de frecuencias.

Las emulsiones O/W_{GA} y O/W_{GAQ}, ambas con un contenido de fase dispersa del 20% (p/p), fueron secadas por aspersión bajo las mismas condiciones para obtener los respectivos sistemas microencapsulados. Ambos sistemas presentaron la formación de microencapsulados esféricos que contenían en su interior pequeñas microcápsulas. Los microencapsulados producidos a partir de la emulsión por coacervación O/W_{GAQ} mostraron una mayor uniformidad de tamaño, con menor área superficial, y mayor densidad del material de barrera en comparación con los microencapsulados de goma arábica.

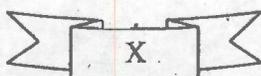
Tabla de contenido

1	Introducción.....	1
1.1	Emulsión.....	3
1.1.1	Emulsión simple.....	3
1.1.2	Emulsión múltiple.....	4
1.1.3	La fase oleosa.....	5
1.1.3.1	Aceite de canola.....	5
1.1.4	La fase acuosa.....	6
1.1.5	Emulsionante.....	6
1.1.6	Interfase aceite-agua.....	6
1.1.7	Emulsionante de bajo peso molecular.....	7
1.1.8	Poliectrolitos.....	8
1.1.9	Biopolímeros.....	9
1.1.10	Formación de emulsiones simples.....	10
1.1.11	Estabilidad.....	11
1.1.12	Mecanismos de inestabilidad de emulsiones simples.....	13
1.2	Interacción entre macromoléculas.....	15
1.2.1	Coacervación.....	18
1.2.1.1	Goma arábica.....	22
1.2.1.2	Quitosano.....	25
1.3	Microencapsulación.....	26
1.3.1	Secado por aspersión.....	28
2	Justificación.....	30
3	Hipótesis.....	31

4	Objetivo	32
5	Materiales y metodología	33
5.1	Materiales	33
5.2	Metodología.....	33
5.3	Caracterización de los complejos goma arábiga-quitosano.....	34
5.3.1	Preparación de las soluciones.....	35
5.3.2	Formación del coacervado.....	35
5.3.3	Rendimiento de la fase coacervada	35
5.3.4	Equivalencia de los biopolímeros en solución	36
5.3.5	Análisis elemental	36
5.3.6	HPLC.....	37
5.3.7	Mediciones turbidimétricas	38
5.3.8	Movilidad electroforética	39
5.3.9	Rendimiento de coacervación en función del pH.....	39
5.3.10	Rendimiento de coacervación en función del NaCl	40
5.3.11	Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR).....	40
5.3.12	Reología de la fase coacervada.....	40
5.3.13	Densidad relativa de la fase coacervada.....	41
5.3.14	Microscopía electrónica de barrido	41
5.4	Emulsión simple por coacervación O/W_{GAQ}	42
5.4.1	Formulación de emulsiones simples O/W_{GA}	43
5.4.2	Formulación de una emulsión simple O/W_Q	43
5.4.3	Difracción de luz	43
5.4.4	Determinación de las cinéticas de coalescencia	44

5.4.5	Formulación de las emulsiones simples por coacervación O/W _{GAQ}	44
5.4.6	Microscopio óptico	45
5.4.7	Reología de las emulsiones simples por coacervación O/W _{GAQ}	45
5.5	Microencapsulación	46
5.5.1	Secado por aspersión	46
5.5.2	Microscopía electrónica de barrido para los microencapsulados	46
6	Resultados y discusión	47
6.1	COACERVACIÓN COMPLEJA	48
6.1.1	Formación del coacervado	49
6.1.1.1	Relación y concentración de biopolímeros	49
6.1.1.2	Equivalencia de los biopolímeros en solución	53
6.1.1.3	Análisis elemental	55
6.1.1.4	HPLC	57
6.1.1.5	Turbidez	62
6.1.1.6	Movilidad electroforética	63
6.1.1.7	Rendimiento de coacervación en función del pH	65
6.1.1.8	Rendimiento de coacervación en función de la concentración de NaCl	67
6.1.2	Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier	69
6.1.3	Reología de la fase coacervada	70
6.1.4	Microscopía electrónica de barrido	73
6.2	SISTEMAS DISPERSOS	76
6.2.1	Formulación de emulsiones simples O/W por coacervación	78
6.2.2	Emulsiones simples con goma arábiga (O/W _{GA})	79
6.2.3	Emulsiones simples con quitosano (O/W _Q)	81

6.2.4	Emulsiones simples por coacervación compleja (O/W _{GAQ}).....	82
6.2.5	Efecto de la fase dispersa en la formulación de emulsiones O/W _{GAQ}	84
6.3	MICROENCAPSULACIÓN.....	88
6.3.1	Microencapsulación por secado por aspersión	89
7	Conclusiones.....	94
8	Trabajos a futuro.....	95
9	Bibliografía.....	97



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Emulsionante de bajo peso molecular.....	7
Figura 2. Orientación de un emulsionante en la interfase aceite-agua.....	8
Figura 3. Preparación de una emulsión simple O/W.....	11
Figura 4. Principales mecanismos de inestabilidad en emulsiones simples (McClements, 1999).....	13
Figura 5. Principales interacciones entre macromoléculas (Weinbreck, 2004).	16
Figura 6. Posible estructura de la goma arábica <i>Acacia senegal</i> (Williams y Phillips, 2000).	23
Figura 7. Ilustración de la estabilización de glóbulos de aceite por las moléculas de goma arábica (Williams y Phillips, 2000).	24
Figura 8. Estructura química del quitosano (Hudson y Jenkins, 2002).....	25
Figura 9. Diagrama de flujo para la caracterización del complejo goma arábica-quitosano.	34
Figura 10. Diagrama de flujo para producir emulsiones por coacervación compleja O/W _{GAQ}	42
Figura 11. Ubicación de la fase coacervada a partir de un diagrama de fases de tres componentes.	49
Figura 12. Rendimiento de coacervación como función de la relación de biopolímeros y concentración de biopolímeros después de 72 hrs de interacción.	50
Figura 13. a) Formación de complejos goma arábica-quitosano en función de la relación total de biopolímeros (3:1, 4:1, 5:1, 6:1 y 7:1, para una concentración de quitosano al 1% p/p); b) fase coacervada CTB _{6,0} R ₅	52
Figura 14. a) Miliequivalentes de NaOH por 2 g de quitosano; b) miliequivalentes de NaOH por 10 g de goma arábica.	53
Figura 15. Relación de miliequivalentes de goma arábica/quitosano como una función de la relación de biopolímeros goma arábica/quitosano	54

Figura 16. a) Relación de biopolímeros en la fase coacervada, y b) relación de biopolímeros en la “fase en equilibrio”, como función de la $R_{GA/Q}$ y CTB_n después de 72 hrs de interacción.....	56
Figura 17. Cromatogramas de los estándares (10 g/L) de 1) ácido D-glucurónico, 2) L-arabinosa, 3) L-ramnosa, y 4) D-galactosa.....	57
Figura 18. Curvas de calibración de los estándares de ácido D-glucurónico, L-arabinosa, L-ramnosa y D-galactosa.....	58
Figura 19 . Curva de calibración de los monosacáridos presentes en la goma arábica por HPLC.....	59
Figura 20. Cromatogramas de los complejos hidrolizados goma arábica-quitosano.....	60
Figura 21. Comparación de la masa de goma arábica presente en las fases coacervadas de los complejos goma arábica-quitosano determinadas por análisis elemental y HPLC.....	61
Figura 22. Turbidez de la “fase en equilibrio” en función de la relación y concentración de biopolímeros después de 72 horas.....	62
Figura 23. Movilidad electroforética de la fase en equilibrio en función de la relación y concentración de biopolímeros después de 72 horas.....	64
Figura 24. Coacervación compleja de goma arábica y quitosano en función del pH, $CTB_{6,0}R_5$ después de 72 hrs.....	66
Figura 25. Coacervación compleja de la goma arábica y quitosano en función de la concentración de NaCl, $CTB_{6,0}R_5$ después de 72 hrs.....	67
Figura 26. Espectro de FTIR de la goma arábica, quitosano y la fase coacervada GA/Q... ..	69
Figura 27. Módulo complejo de la fase coacervada en función de la deformación, a pH 3, 4.5 y 6.	71
Figura 28. Curvas de amplitud de las fases coacervadas a 25 °C y una $\omega \sim 10$ rad/s.	72
Figura 29. a) Micrografía de goma arábica; b) micrografía de quitosano.....	74
Figura 30. a) Micrografía de la fase coacervada goma arábica-quitosano $CTB_{6,0}R_5$	75
Figura 31. Tamaño y distribución de los glóbulos de la emulsión O/W _{GA} en función de la velocidad de agitación y concentración de goma arábica.	79

Figura 32. A) Distribución de los glóbulos de emulsión O/W _Q ; B) tendencia de medición de los glóbulos de emulsión O/W _Q	81
Figura 33. Microfotografía de la emulsión por coacervación O/W _{GAQ} , amplificación ×100.	83
Figura 34. Curvas de amplitud para las emulsiones simples formuladas por coacervación compleja.....	85
Figura 35. Curvas de frecuencia para las emulsiones simples formuladas por coacervación compleja.....	86
Figura 36. Microcápsulas obtenidas de la emulsión O/W _{GA} , amplificación: × 150.....	89
Figura 37. Microcápsulas obtenidas de la emulsión O/W _{GA} , amplificación × 2500.....	90
Figura 38. Microcápsulas obtenidas de la emulsión O/W _{GAQ} , amplificación: a) × 150 y b) × 2500	91
Figura 39. Microcápsulas con goma arábica (× 10000).....	92
Figura 40. Microcápsulas con el complejo goma arábica-quitosano (×10000).	93

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estudios sobre sistemas coacervados.	20
Tabla 2. Goma arábica experimental determinada mediante el análisis elemental de los diferentes coacervados a partir de $CTB_nR_{GA/Q}$	55
Tabla 3. Concentración másica de goma arábica en las fases coacervada y en equilibrio para las diferentes relaciones en peso.	60
Tabla 4. Tamaños promedios volumétricos ($D_{4,3}$) y promedio superficial ($D_{3,2}$), amplitud de la distribución y cinéticas de coalescencia de las emulsiones O/W _{GA} en función de la concentración de goma arábica y la velocidad de agitación.	80

NOMENCLATURA

ϵ	Constante dieléctrica del medio.
γ	Deformación.
ϕ	Fracción volumétrica de la fase dispersa.
ω	Frecuencia angular.
τ	Turbidez.
C	Tasa de coalescencia.
CTB _n	Concentración total de biopolímeros.
D(v,x%)	Diámetro promedio volumétrico de los glóbulos de la emulsión que se encuentran por debajo del x% de la distribución.
D _{3,0}	Diámetro promedio volumétrico.
DLS	Dispersión de luz dinámica.
f(Ka)	Función de Henry con un valor de 1.5.
FT-IR	Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier.
G*	Módulo complejo.
G'	Módulo elástico.
G''	Módulo viscoso.
GA	Goma arábica.
%GA _{Exp}	Porcentaje de goma arábica determinado experimentalmente.
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución.

I_0	Intensidad de referencia.
I_t	Intensidad de la luz transmitida.
ITC	Calorimetría isotérmica de titulación.
L	Longitud óptica de la celda (cm).
N_0	Número inicial de glóbulos de la fase dispersa.
N_t	Número de glóbulos de la fase dispersa a un tiempo dado.
O/W _{GA}	Emulsión simple aceite-en-agua de goma arábica.
O/W _{GAQ}	Emulsión simple aceite-en-agua de goma arábica-quitosano.
O/W _Q	Emulsión simple aceite-en-agua de quitosano.
Pr	Proteína.
Ps	Polisacárido.
Q	Quitosano.
RBFC _{GAQ}	Relación goma arábica/quitosano en la fase coacervada.
RBFE _{GAQ}	Relación goma arábica/quitosano en la fase en equilibrio.
R _{GAQ}	Relación goma arábica/quitosano.
RLVE	Región lineal viscoelástica.
UE	Movilidad electroforética.
z	Potencial zeta.
η	Viscosidad.

1 Introducción

La encapsulación es el proceso a través del cual una sustancia activa es envuelta con una película continua y compacta de un polímero o es distribuida uniformemente en una matriz del material polimérico (Shahidi y Han, 1993; Moreau y Rosenber, 1993). Cuando el diámetro de partícula del producto terminado se encuentra entre 1 y 1000 μm , se le denomina microcápsula y, al proceso, microencapsulación (Hoagland, 2001a). La microencapsulación es definida como "la tecnología de empacar sólidos, líquidos o gases en cápsulas selladas de tamaño microscópico, que liberan sus contenidos a velocidades controladas bajo la influencia de ciertos estímulos como pH, temperatura o fuerza iónica, por mencionar algunos" (Bertolini y col., 2001; McNamee y col., 1998; Garti, 1997; Sparks, 1981). Los sistemas microencapsulados son ampliamente utilizados en aplicaciones de las industrias química, farmacéutica, cosmética, biotecnológica y de los alimentos. Por ejemplo, en la industria de los alimentos, los ácidos grasos poliinsaturados y las vitaminas, que son de vital importancia para el tratamiento o la prevención de algunas enfermedades, se degradan rápidamente, por lo que su protección y aislamiento de factores prooxidantes (temperatura, pH, oxígeno, iones metálicos, UV y rayos X), mediante la tecnología de la microencapsulación es imprescindible para la conservación de su integridad química, física y funcional.

La funcionalidad del material encapsulado y las propiedades fisicoquímicas de la microcápsula dependen de las propiedades de la membrana protectora, las cuales se encuentran íntimamente ligadas a las interacciones entre los polímeros formadores de la membrana, así como las interacciones con otros ingredientes que la constituyen, de su estructura y de los mecanismos difusivos que puedan darse a través de ésta. En general, el material encapsulado puede estar constituido de una o varias sustancias, mientras que el material de barrera puede ser diseñado empleando una capa sencilla o múltiple (Desai y Park, 2005; Shahidi y Han, 1993). Existe una gran cantidad de materiales de barrera, por ejemplo, polímeros sintéticos o naturales, neutros o con carga (positiva o negativa), ramificados o lineales. La selección de los materiales de barrera usados para microencapsular una sustancia activa dependerán en gran medida de la disponibilidad y

costos de la materia prima, de la funcionalidad esperada del material encapsulado, de las propiedades fisicoquímicas esperadas de las microcápsulas y de la tecnología seleccionada para la microencapsulación. Las tecnologías usadas en la microencapsulación son divididas en métodos físicos, químicos y fisicoquímicos (Shahidi y Han, 1993). La selección de la tecnología de microencapsulación es función de los costos, las propiedades fisicoquímicas del material que se encapsulará, del tamaño deseado de las microcápsulas, de la aplicación y de los mecanismos de liberación deseados (Ré, 1998).

La microencapsulación por coacervación es una tecnología eficiente, pero costosa. En la década de los años noventa, la microencapsulación por coacervación compleja había encontrado un uso limitado en la encapsulación de sabores. La principal razón era la escasez de materiales de barrera que podían ser usados en la industria de los alimentos (Shahidi y Han, 1993). En los últimos años, la búsqueda de nuevos sistemas para la microencapsulación por coacervación ha propiciado nuevas líneas de investigación. La mayoría de los sistemas incluyen mezclas proteína-polisacárido, los cuales han sido aplicados exitosamente en aplicaciones farmacéuticas y alimenticias. Sin embargo, existen pocas investigaciones relacionadas con la formación de complejos insolubles a partir de mezclas de polisacáridos (Dumitriu y col., 1994; Daly y Knorr, 1988). El desarrollo de matrices polisacáridas coacervadas requiere del conocimiento básico acerca de las interacciones atractivas entre los biopolímeros, así como la influencia de éstas en las propiedades reológicas y estabilidad de los sistemas dispersos.

1.1 Emulsión

Una emulsión consiste en dos líquidos parcialmente inmiscibles, con uno de los dos líquidos disperso en el otro en forma de pequeños glóbulos esféricos (Dickinson, 1992). La fase presente en forma de pequeños glóbulos (de 0.1 a 100 micras) se le denomina fase interna o dispersa (Muñoz y col., 2007). La fase que forma la matriz en que se suspenden los glóbulos se le denomina fase externa o continua. Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables, debido a que los contactos entre las moléculas de agua y aceite no son favorables energéticamente; el estado termodinámicamente estable corresponde al sistema que presenta las dos fases separadas, minimizando el área de contacto entre las moléculas de agua y aceite (Sherman, 1968). En un intento por desarrollar “emulsiones estables”, distintos investigadores se han limitado a controlar la cinética de los procesos que conllevan al rompimiento de las emulsiones (Begenstahl, 1995). Los tecnólogos tienen dos maneras de conseguir este propósito (Begenstahl, 1995): usando dispositivos mecánicos que dispersen el sistema y mediante la incorporación de agentes emulgentes de alto o bajo peso molecular, los cuales estabilizan la dispersión. Las emulsiones encuentran aplicaciones en diversos campos: alimentación, cosmética, farmacéutica, química agrícola, detergencia, industria de la pintura y polímeros, pretratamiento de crudo de petróleo en refinerías, tratamiento de mareas negras, asfaltos, entre otras (Muñoz y col., 2007).

Para formular una emulsión se necesita una fase oleosa, una fase acuosa, energía y agentes emulgentes. La energía es necesaria para incrementar el área interfacial entre las dos fases. El emulsionante provee el mecanismo para prevenir o minimizar la inestabilidad del sistema. En general, las emulsiones son clasificadas por su estructura en: *i*) emulsiones simples y *ii*) emulsiones múltiples.

1.1.1 Emulsión simple

Regularmente las emulsiones simples son clasificadas en: *i*) emulsiones aceite-en-agua (conocida por sus siglas en inglés O/W), en donde los glóbulos de aceite están dispersos en

agua; algunos ejemplos típicos son: la leche, la crema, la mayoría de las salsas y aderezos; y *ii*) emulsiones agua-en-aceite (W/O), en donde los glóbulos de agua están dispersos en aceite; por ejemplo: la mantequilla y la margarina.

La regla de Bancroft indica que el tipo de emulsión depende más del agente emulsionante que de las proporciones relativas de aceite o agua, o de la metodología de preparación de la emulsión (McClements, 1999). En general, para formular emulsiones del tipo O/W se emplean agentes emulsionantes hidrosolubles. Mientras que, para formular emulsiones W/O se emplean agentes emulsionantes liposolubles o con una solubilidad mayor en aceite que en agua.

1.1.2 Emulsión múltiple

Las emulsiones múltiples ó emulsión de emulsiones son sistemas complejos que pueden exhibir estructuras terciarias, cuaternarias, o de mayor orden. La emulsión múltiple simple, también llamada “emulsión doble” presenta una estructura terciaria, en la cual los glóbulos dispersos contienen a su vez glóbulos más pequeños (Rosano y col., 1998). Existen dos tipos de emulsiones dobles: *i*) agua-en-aceite-en-agua ($W_1/O/W_2$) y *ii*) aceite-en-agua-en-aceite ($O_1/W/O_2$). En general, las fases internas y externas son químicamente semejantes y se encuentran separadas físicamente por una fase intermedia inmisible de naturaleza opuesta (Dickinson y McClements, 1996). Los múltiples compartimientos que ofrece una emulsión múltiple ofrecen una gran cantidad de posibilidades para la liberar, retener, eliminar y/o proteger sustancias químicas encapsuladas en su interior. Las emulsiones múltiples son usadas en varias aplicaciones industriales y desarrollos tecnológicos: removiendo metales tóxicos en agua contaminada y en la encapsulación de drogas, nutrientes, colorantes, saborizantes, enzimas y cosméticos, que pueden ser liberadas a tasas controladas y bajo la influencia de ciertos estímulos como el pH, la temperatura o enzimas (Sugiura y col., 2004; Rodríguez-Huezo y col., 2004; González-Ochoa y col., 2003; Yan y Pal, 2001; Nakano, 2000; Rosano y col., 1998; Garti, 1997; Dickinson y col., 1993).

1.1.3 La fase oleosa

La fase oleosa (O) de una emulsión puede estar constituida por un producto químico orgánico; por ejemplo, hidrocarburos o grasas y aceites procedentes de productos naturales (Muñoz y col., 2007). No obstante, también se utilizan fases oleosas basadas en lípidos naturales químicamente modificados; por ejemplo, las grasas hidrogenadas.

Entre los compuestos más importantes que constituyen a las fases oleosas alimentarias se puede citar: ácidos grasos, lípidos, colorantes liposolubles, vitaminas y esteroides. Las características más importantes de las fases oleosas alimenticias son: sus propiedades organolépticas, la densidad, punto de fusión, viscosidad y tensión superficial (McClements, 1999). También es importante el carácter no polar de la fase oleosa, ya que influyen en las propiedades interfaciales de los emulsionantes (Muñoz y col., 2007). Pérez-Orozco y col. (2004) observaron el incremento de la viscosidad interfacial en el sistema aceite de canola-goma de mezquite en comparación con el sistema aceite mineral-goma de mezquite, debido a la presencia de los grupos polares de los ácidos oléico, linoléico y linolénico presentes en el aceite de canola, los cuales interactuaban en la interfase con la goma de mezquite.

1.1.3.1 Aceite de canola

El aceite de canola contiene ácido α -linolénico (ácido graso esencial omega-3) y ácido linoléico (ácido graso esencial omega-3) los cuales ayudan a reducir el riesgo de enfermedades cardíacas y de accidentes cerebro-vasculares (Huang y col., 2007, Tricia y col., 2006). El ácido α -linolénico es un ácido graso esencial que los humanos no pueden sintetizar en el cuerpo y tienen que obtenerlo a través de la dieta, mientras que los ácidos eicosapentaenoico y docosahexaenoico pueden ser biosintetizados a partir del ácido α -linolénico provenientes de una fuente animal o vegetal (Bourre, 2007, Tricia y col., 2006). El ácido α -linolénico se encuentra en las grasas y aceites de la canola, la linaza, el germen de trigo y el frijol de soya; nueces como las nueces de nogal, las pacanas y los piñones; y las semillas de la grosella roja y negra. El aceite de canola contiene 11% de ácido α -

linolénico, 21% de ácido linoléico, 61% de grasas monoinsaturadas y 75 de grasas saturadas (Tricia y col., 2006).

1.1.4 La fase acuosa

La fase acuosa (W) de las emulsiones raramente consiste en agua pura, generalmente es el medio para solubilizar o disociar alguna sustancia de interés. Entre estas se puede mencionar: sales, ácidos, bases, azúcares, estabilizantes (polisacáridos, polímeros), conservantes, colorantes acuosos, emulsionantes, proteínas; la presencia de estas últimas dos puede deberse a un exceso de las sustancias respecto a las cantidades presentes en la interfase, por incompatibilidad con la interfase o simplemente material desplazado de la misma durante el proceso de formación (Muñoz y col., 2007).

1.1.5 Emulsionante

Un emulsionante es una molécula anfifílica, de bajo o alto peso molecular, que tiende a migrar y adsorberse en las interfases aceite-agua reduciendo la tensión interfacial. Esto favorece la formación de los glóbulos de la emulsión con un menor consumo de energía, estabilizando la emulsión en cierto periodo de tiempo (Muñoz y col., 2007; McClements, 1999).

1.1.6 Interfase aceite-agua

Las emulsiones son mezclas complejas. Estas usualmente contienen emulsionantes de bajo o alto peso molecular superficialmente activos. En sistemas que contiene más de un componente en la interfase, existen tres tipos de mecanismos adsorción (Begenstahl, 1995): 1) adsorción competitiva, 2) adsorción asociativa y 3) adsorción secuencial. En este último mecanismo, el primer componente se adsorbe en la interfase aceite-agua, mientras que el segundo componente se adsorbe (generalmente de carga opuesta) sobre la superficie del primer componente, generando un sistema multicapas.

1.1.7 Emulsionante de bajo peso molecular

Los emulsionantes de bajo peso molecular presentan en su estructura un segmento polar y un segmento no polar (Figura 1).

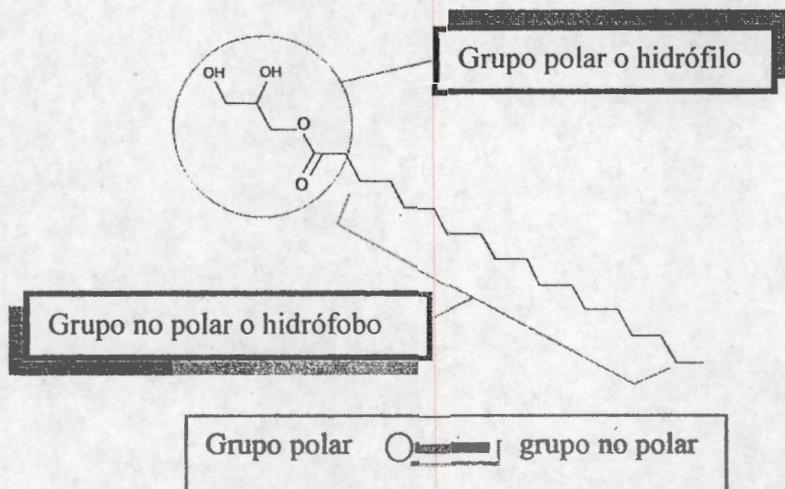


Figura 1. Emulsionante de bajo peso molecular.

La parte polar o hidrófila es conocida como “cabeza”, la cual tiene una alta afinidad por la fase acuosa; por ejemplo, grupos hidroxilos, carboxilos y iónicos (Hunter, 2001; McClements, 1999). La parte no polar o hidrófoba, es conocida como “tallo”, la cual tiene una alta afinidad por la fase orgánica, por ejemplo, residuos de hidrocarburos alifáticos o aromáticos (Hunter, 2001; McClements, 1999).

Los emulsionantes más usados en la industria de los alimentos pueden ser no iónicos (por ejemplo, ésteres de sacarosa, ésteres de sorbitan, polisorbatos), aniónicos (por ejemplo, ácidos grasos) y zwitteriónicos (por ejemplo, lecitinas). El grupo hidrófobo usualmente consiste en una o más cadenas hidrocarbonadas, entre 10 y 20 átomos de carbono por cadena. Estas cadenas pueden ser saturadas o insaturadas, lineales o ramificadas, alifáticas y/o aromáticas (McClements, 1999).

Cuando estas moléculas se adsorben en la interfase aceite-agua, se orientan de manera que los segmentos no polares apuntan hacia la fase oleosa y los segmentos polares hacia la fase acuosa (Figura 2).

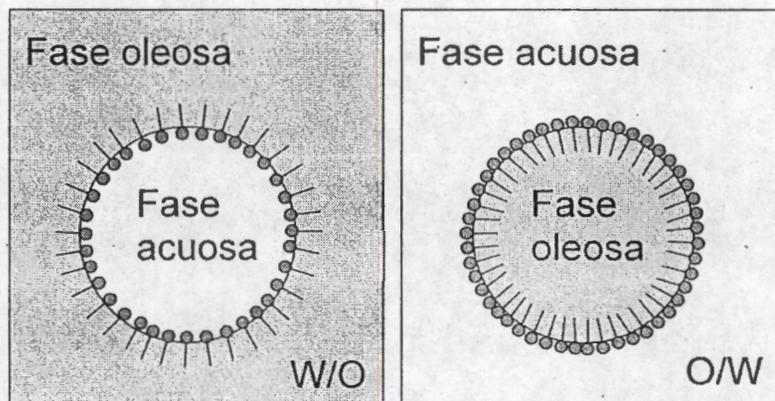


Figura 2. Orientación de un emulsionante en la interfase aceite-agua.

1.1.8 Polielectrolitos

Un polímero que contiene grupos ionizables es llamado polielectrolito o macroión. Estos pueden agruparse en tres grupos (Walstra, 2003, Hoagland, 2001b): 1) *Polímeros catiónicos*; estos generalmente contiene grupos amino ($-\text{NH}_2$ o $=\text{NH}$) los cuales pueden ser protonados a pH suficientemente bajos (normalmente 7–10); 2) *polímeros aniónicos*; estos generalmente contienen grupos carboxilo ($-\text{COOH}$), los cuales se encuentran en el ácido glucurónico o residuos semejantes presentes en la mayoría de los polisacáridos; por ejemplo, las gomas arábiga, de mezquite, xantana, así como en pectinas y alginatos; y 3) *polianfóteros*, los cuales contienen grupos catiónicos y aniónicos. Estas moléculas pueden mostrar un punto isoeléctrico, a un pH o condiciones en solución en las cuales las magnitudes de las cargas positivas y negativas son iguales (Hoagland, 2001b). Las proteínas contiene un cierto número de aminoácidos en su estructura que pueden ionizarse para formar cationes (lisina, prolina, histamina o con grupo terminal amino) o aniones (ácido glutámico y ácido aspártico o con grupo terminal carboxilo) (McClements, 1999). Si las condiciones de disociación de los grupos iónicos de los polielectrolitos dependen de las

condiciones en la solución, particularmente pH o concentración, el polielectrolito es clasificado como débil. Por otro lado si la carga del polielectrolito es relativamente insensible a las condiciones en solución, el polielectrolito es clasificado como fuerte (Hoagland, 2001b, McClements, 1999).

1.1.9 Biopolímeros

Las proteínas y los polisacáridos son dos importantes tipos de biopolímeros usados como ingredientes de las emulsiones alimenticias (McClements 1999). Las proteínas son ampliamente usadas debido a sus excelentes propiedades emulsionantes y formadoras de espumas, mientras que los polisacáridos son empleados por sus propiedades espesantes y de retención de agua (Dickinson, 2003; McClements, 1999; Dickinson, 1993; Fennema, 1982). Ambos tipos de macromoléculas contribuyen a la estructura, apariencia, textura, sabor y estabilidad de los sistemas alimenticios a través de su comportamiento de agregación y gelación (Kruif y Tuinier, 2001; Dickinson, 1993). Las propiedades coloidales no solo dependen de la funcionalidad individual de las macromoléculas presentes en el sistema, sino también de la naturaleza y fuerza de las interacciones entre las macromoléculas (Dickinson, 1993).

Cuando un biopolímero es dispersado en una fase acuosa, los residuos no polares pueden encontrarse en contacto con moléculas de agua, esta conformación no es termodinámicamente favorable debido a interacciones hidrofóbicas, por lo que las macromoléculas adoptan una conformación en donde los residuos no polares se encuentran lo más alejado del agua. Cuando una molécula orgánica es introducida en una fase acuosa que contiene un biopolímero superficialmente activo, frecuentemente disminuye la entropía del sistema (Nakai, 2001). Para minimizar estos cambios no favorables, las moléculas no polares son forzadas a coalescer en dipolos o glóbulos, reduciendo la superficie de contacto con las moléculas de agua. Como resultado de ello, las cadenas de proteínas son forzadas a desdoblarse en una estructura micelar con las fracciones orgánicas en el interior de los glóbulos y los grupos polar en el exterior. La eliminación de los residuos no polares del

contacto con el agua genera una importante contribución a la energía libre del sistema (Nakai, 2001). La adsorción de los biopolímeros en la interfase aceite-agua da origen a membranas interfaciales, las cuales reducen el área de contacto entre las moléculas de aceite y agua. No sólo las proteínas son empleadas para producir emulsiones estables, sino también algunos polisacáridos como la goma arábiga y la goma de mezquite que presentan actividad superficial, y por lo tanto, son empleados eficientemente en la formulación de emulsiones O/W. Algunos estudios indican que la presencia de una pequeña fracción de proteína (< 3%) en la estructura de los polisacáridos, parece ser la responsable de las propiedades emulsionantes y estabilizantes de los coloides (Dickinson, 2003; Williams y Phillips, 2000; Whistler 1993). De esta manera, estos dos polisacáridos son capaces de adsorberse en la interfase O/W, formando una membrana alrededor de los glóbulos de la emulsión, previniendo su agregación. Al mismo tiempo, esta membrana interfacial puede servir como material de barrera para los sistemas microencapsulados. En general, las propiedades estabilizantes y de barrera de los biopolímeros en los alimentos son determinadas por su peso molecular, conformación, flexibilidad, polaridad e interacciones (McClements, 1999).

1.1.10 Formación de emulsiones simples

La formación de una emulsión puede generarse en una sola etapa o en varias etapas consecutivas, dependiendo de la naturaleza de los materiales usados o del método para crearla (McClements, 1999). En general, las emulsiones son formadas por los métodos de condensación o dispersión. Los métodos de dispersión son los más comunes debido a que involucran energías generalmente más pequeñas. Las técnicas más usadas para producir una emulsión son: el uso de altas tasas de corte, ultrasonificación y homogenización de alta presión (Walstra, 2003; Hunter, 2001).

Para producir una emulsión simple O/W por agitación, generalmente se emplea un dispersor de alto corte, con la finalidad de romper y entremezclar las fases oleosas y acuosas, aumentando el área interfacial entre los glóbulos de la fase oleosa y la fase acuosa. El emulsionante se adsorbe en la superficie de los glóbulos durante el proceso de

homogenización, formando una membrana protectora la cual previene la agregación de los glóbulos de la emulsión (Figura 3) (Walstra, 2003; McClements, 1999).

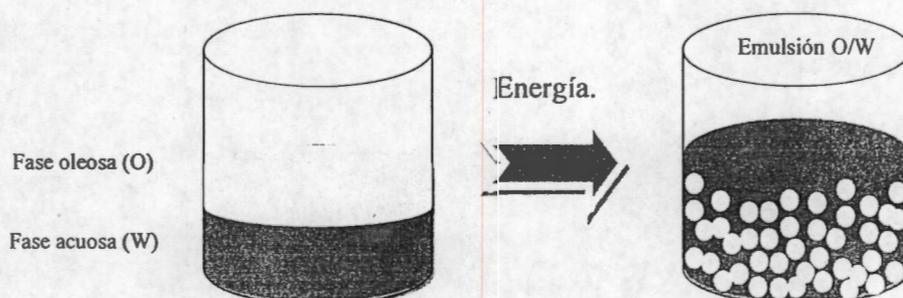


Figura 3. Preparación de una emulsión simple O/W.

La intensidad y duración del proceso depende del tiempo requerido para hidratar y distribuir uniformemente los ingredientes (McClements, 1999). Una adecuada hidratación es importante para la funcionalidad de gran número de componentes alimenticios; por ejemplo, las propiedades emulgentes de las proteínas y los polisacáridos a menudo mejoran cuando éstas son hidratadas por un determinado periodo de tiempo antes de la homogenización (McClements, 1999).

1.1.11 Estabilidad

El término de estabilidad de una emulsión se refiere a la capacidad de la emulsión a resistir cambios en sus propiedades con el tiempo: la emulsión más estable muestra pequeños cambios en sus propiedades con el tiempo (McClements, 1999). En la práctica, hay muchas barreras cinéticas que tienden a prevenir o retardar esta inestabilidad del sistema (Darling y Brikett, 1986). Hasta hace pocos años, la mayoría de los estudios relacionados con emulsiones alimenticias reportaban el uso de emulsionantes de bajo peso molecular (como los ésteres de glicerol, ésteres de sorbitol, sorbitan monolaurato, etc.) para producir la

emulsión simple. Sin embargo, estos sistemas presentan una baja estabilidad cuando la emulsión es sometida a perturbaciones hidrodinámicas, ya que, al deformar los glóbulos de la emulsión, el área interfacial aumenta, promoviendo el rompimiento de la emulsión. Actualmente, se ha conseguido obtener emulsiones de mayor estabilidad, reemplazando el emulsionante hidrosoluble de bajo peso molecular por biopolímeros con actividad superficial. Estos últimos se adsorben en la interfase aceite-agua, estabilizando los glóbulos de la emulsión mediante potenciales de repulsión estéricos y/o electrostáticos (McClements, 1999; Dickinson y McClements, 1996).

La formación de capas múltiples de biopolímeros en la fase externa de las emulsiones puede ayudar a incrementar la estabilidad de los sistemas; tales son los casos de: quitosano-goma de mezquite (Pérez-Orozco y col., 2004), proteína de suero de leche-carragenina (Weinbreck y col., 2004), goma arábica-goma de mezquite-maltodextrina (Rodríguez-Huezo y col., 2004; Pérez-Alonso y col., 2003), quitosano-alginatos y quitosano-carragenina (Tapia y col., 2004), carragenina- β -lactoglobulina (Gu y col., 2004), lecitina-quitosano-pectina (Ogawa y col., 2004), lecitina-quitosano (Ogawa y col., 2003); β -lactoglobulina-pectina (Moreau y col., 2003), proteína-goma arábica (Ibanoglu, 2002); por mencionar algunos. Además, las emulsiones finales muestran un efecto significativo en la protección de las sustancias activas, en algunos casos, a valores bajos de pH y temperaturas extremas. Lo anterior implica que, bajo ciertas condiciones de relación biopolímero-emulsionante o biopolímero-biopolímero, pH, fuerza iónica, se pueden producir emulsiones cinéticamente estables (metaestables). Asimismo, el uso de matrices polielectrolíticas puede ayudar a inhibir la oxidación de las sustancias contenidas en su interior. Cuando los glóbulos de la emulsión tienen carga positiva, son menos susceptibles a la desestabilización por cationes multivalentes, como el calcio o el hierro (Ogawa y col., 2003; Silvestre y col., 1999).

1.1.12 Mecanismos de inestabilidad de emulsiones simples

Los principales mecanismos de inestabilidad en emulsiones simples son (Figura 4):

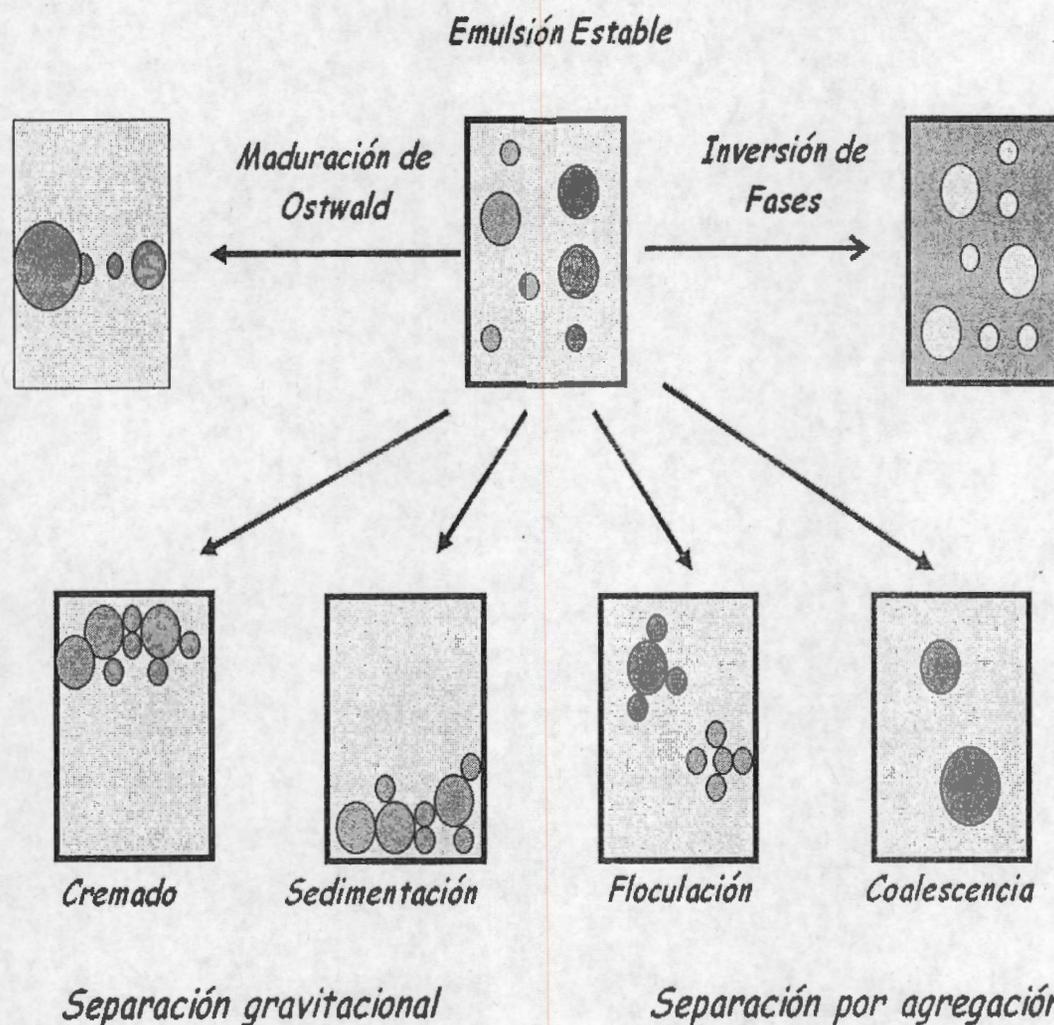


Figura 4. Principales mecanismos de inestabilidad en emulsiones simples (McClements, 1999).

- La *sedimentación* y el *cremado* son dos formas de separación gravitatorias. El *cremado* describe el movimiento de los glóbulos de la emulsión hacia la parte superior del sistema, debido a que la densidad de la fase dispersa es menor a la de la fase continua, mientras que en la *sedimentación* ocurre un proceso inverso. Ambos procesos son

reversibles y en ninguna de las dos situaciones pierden su individualidad los glóbulos de la emulsión, por lo que la distribución y el tamaño de los glóbulos no cambia con el tiempo (Damodaran, 2005; McClements, 1999; Dickinson, 1992).

- La *floculación* ocurre cuando dos o más glóbulos se agregan sin que éstos pierdan su individualidad. La agregación es originada por una fuerza de atracción neta interpartícula. La estructura de los flóculos depende de la magnitud de la fuerza atractiva entre los glóbulos y la fracción volumen de aceite (Damodaran, 2005). La floculación es un proceso de agregación reversible, el cual suele ser el mecanismo posterior al cremado y/o la sedimentación y el paso anterior a la coalescencia (McClements, 1999).
- La *coalescencia* se refiere a la combinación de dos o más glóbulos para formar un glóbulo más grande (McClements, 1999). Para que el fenómeno ocurra, los glóbulos de la emulsión deben encontrarse muy cerca uno del otro, por lo que la coalescencia generalmente ocurre en emulsiones cremadas, sedimentadas o floculadas (Damodaran, 2005); es un proceso irreversible y está descrito por el incremento lineal en el logaritmo del diámetro promedio de los glóbulos de la emulsión en función del tiempo (Sherman, 1968). La coalescencia puede ser menos probable en (Fennema, 1982): *i*) glóbulos más pequeños, *ii*) en emulsiones con películas interfaciales gruesas, y *iii*) no disminuir tanto la tensión interfacial.
- La *inversión de fases* es el proceso mediante el cual una emulsión W/O se convierte en una emulsión O/W, o viceversa. En sistemas alimenticios el proceso de inversión de fases generalmente no ocurre espontáneamente (Dickinson, 1992), pero puede ser promovida por factores como la temperatura, los cambios en la formulación del sistema o los efectos de tipo mecánico (McClements, 1999).
- La *maduración de Ostwald* es el crecimiento de los glóbulos más grandes a expensas de los más pequeños (los cuales eventualmente desaparecen), ocasionado por la difusión de

la fase dispersa de los glóbulos pequeños (que se solubiliza en el medio) a los más grandes (Dickinson, 1992; Walstra 1986). Generalmente, este tipo de inestabilidad no suele en emulsiones O/W por que las grasas constituidas por triglicéridos, que son habitualmente usadas, son insolubles en agua (Fennema 1982).

1.2 Interacción entre macromoléculas

El estudio de las interacciones entre biopolímeros tiene una gran relevancia para muchos sistemas biológicos, farmacéuticos y alimenticios (Weinbreck y col., 2003). Las interacciones entre macromoléculas son variadas, estas pueden ser: débiles o fuertes, específicas o no específicas, atractivas o repulsivas (Dickinson, 1993). Dichas interacciones son determinadas por las características fisicoquímicas de cada biopolímero (densidad de carga y masa molar), su concentración, relación y condiciones de disolución (pH, fuerza iónica y tipo de iones) (Mekhloufi y col., 2005; Schmitt y col., 2005; Xing y col., 2004; Weinbreck y col., 2003).

La formación de complejos intermoleculares se lleva a cabo espontáneamente cuando el cambio total de energía libre de Gibbs (ΔG) disminuye. El valor de ΔG es determinado por un delicado equilibrio entre las contribuciones entrópicas favorables ($-T\Delta S$) y las contribuciones entálpicas no favorables, y por tanto, existe la posibilidad o no de los biopolímeros para formar un complejo (Turgeon y col., 2007). Las contribuciones entrópicas favorables incluyen principalmente la liberación de contraiones (de Kruif y col., 2004, Laugel y col., 2006) y de moléculas de agua (Jelesarov y Bosshard, 1999). Las contribuciones entálpicas no favorables provienen de la disminución de la movilidad de los biopolímeros y a interacciones no covalentes en la interfase de los complejos (Jelesarov y Bosshard, 1999). Debido a la complejidad de las estructuras y la delicadeza de los procesos involucrados es difícil estimar ambas contribuciones (Laugel y col., 2006).

La mezcla de dos biopolímeros en solución puede exhibir tres condiciones de equilibrio conocidas como miscibilidad, incompatibilidad termodinámica y formación de complejos (Figura 5).

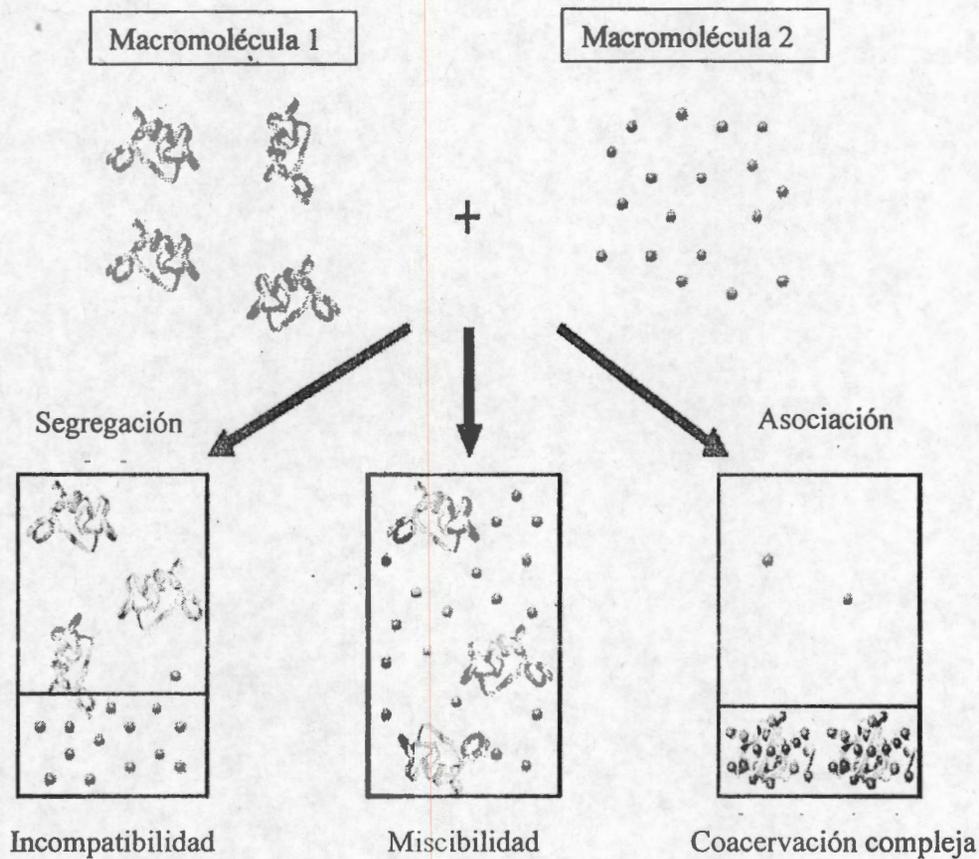


Figura 5. Principales interacciones entre macromoléculas (Weinbreck, 2004).

En soluciones diluidas, cuando las atracciones interbiopolímero son inhibidas, el sistema es estable porque la entropía de mezclado domina y las mezclas de biopolímeros son *miscibles* (Weinbreck, 2004; Tolstoguzov, 2004; Tolstoguzov, 2003; Kruif y Tuinier, 2001). Conforme se incrementan las concentraciones de los biopolímeros y exceden una concentración crítica, estos pueden volverse parcialmente miscibles. La baja entropía de mezclado de las macromoléculas en comparación con la de los monómeros es responsable de su incompatibilidad en un solvente común (Weinbreck, 2004; Tolstoguzov, 2004; Tolstoguzov, 2003; Kruif y Tuinier, 2001). Las fuerzas de repulsión netas entre las dos especies en solución a nivel molecular causan la separación espontánea del sistema en dos

fases distintas, este fenómeno es conocido como *incompatibilidad termodinámica* y comúnmente se exhibe en concentraciones semidiluidas o concentradas de biopolímeros (Dickinson y McClements, 1996). La incompatibilidad termodinámica puede presentarse en mezclas proteína-polisacárido (no iónicos o aniónicos) a un pH por debajo del punto isoelectrico de la proteína (Dickinson, 1993) o en mezclas polisacárido-polisacárido.

Las interacciones atractivas entre biopolímeros pueden ser fuertes o débiles e incluso específicas y no específicas. Un enlace covalente entre una proteína y un polisacárido representa una interacción atractiva específica, fuerte y permanente (Dickinson, 1993). Una interacción atractiva no específica entre biopolímeros presenta un resultado promedio sobre una gran variedad de interacciones químicas específicas individuales entre los grupos de los biopolímeros: iónico, dipolar, van der Waals, puentes de hidrogeno, hidrófobas, electrostáticas, entre otras (Dickinson, 1993). Las interacciones atractivas entre dos biopolímeros pueden manifestarse físicamente de varias formas (Walstra, 2003): *i*) formación de pequeños complejos solubles, manifestándose en soluciones turbias, *ii*) formación de un gel débil homogéneo, si las interacciones son débiles, y *iii*) precipitación de ambos biopolímeros, si las interacciones son fuertes. Los complejos solubles se forman cuando uno de los biopolímeros se encuentra en exceso y existen bajas concentraciones relativas en la solución (concentraciones menores al 1% p/p) (Tolstoguzov, 2003, 2002). En la formación de complejos insolubles (precipitación), existe una mutua neutralización entre los grupos ionizables de ambas macromoléculas, lo que provoca una disminución de la carga neta del sistema, reduciendo las zonas hidrófilas de las macromoléculas, mientras que sus partes hidrófobas se compactan. Estos arreglos intermoleculares provocan una separación de la solución en dos fases conocido como *coacervación compleja* (Weinbreck, 2004; Tolstoguzov, 2004, 2003; Kruif y Tuinier, 2001). De Kruif y col., (2004) proponen que si uno de los polímeros es un polielectrolito fuerte se forma un precipitado (complejos elásticos) en lugar de un coacervado (complejos viscosos).

1.2.1 Coacervación

La interacción entre biopolímeros opuestamente cargados fue observada por Tiebackx en 1911; mezclando una solución de gelatina y goma arábiga en ácido acético, él observó la opalescencia o precipitación del sistema (Weinbreck, 2004). Este fenómeno de separación de fases del sistema gelatina/goma arábiga fue extensamente estudiado por Bungenberg de Jong y Kruyt entre los años 1920 y 1940. La palabra coacervación, introducida por Bungenberg de Jong y Kruyt, proviene del latín “*coacervatus*”, del pasado participio de “*coacervare*” (amontonarse), lo que significa que precede la unión de partículas coloidales (Sanchez y col., 2002; Menger y Sykes, 1998). IUPAC define a la coacervación como la separación en dos fases líquidas en sistemas coloidales, la fase más concentrada en coloides es conocida como “fase coacervada” y la otra fase se le conoce como “fase en equilibrio”. En general, el fenómeno es dividido en coacervación simple y coacervación compleja.

La *coacervación simple* involucra el uso de una sola macromolécula, empleando un mal solvente de la macromolécula o una sal. La *coacervación compleja* involucra el uso de dos biopolímeros de carga opuesta. La coacervación compleja de dos polielectrolitos ocurre especialmente a fuerzas iónicas relativamente bajas ($< 0.2 \text{ M}$) (Walstra, 2003). La densidad de los complejos electrostáticos suele ser diferente a la del medio que los rodea, por lo que forman una fase separada en la superficie o en el fondo del sistema (Bryant y McClements, 2000). Asimismo, la viscosidad de los sistemas coacervados suelen ser entre 40 y 100 veces mayor, por lo que las estructuras generadas exhiben mayores propiedades viscoelásticas, las cuales pueden ayudar a retardar los procesos de inestabilidad de las emulsiones.

La coacervación tiene aplicaciones en los campos de la química, biotecnología y los alimentos, tales como: papel copiator sin carbón (Green y Schleicher, 1956), sustitución de grasas (Bakker y col., 1994), separación de proteínas (Zhao y col., 2005; Jensen y col., 2000; Wang y col., 1996), microencapsulación (Yu y Toh, 2006; Thimma y Tammishetti, 2003; Lamprecht y col., 2001; Thomasin y col., 1998), cosméticos (Beerse y Smith, 2001a, 2001b), alimentos funcionales (Strauss y Gibson, 2003; Gouin y col., 2003) e inmovilización de enzimas (Onishi y col., 2002), por mencionar algunas.

Weinbreck y col. (2004), Weinbreck y col. (2003) y Kaibara y col. (2000) observaron que las formaciones de complejos electrostáticos insolubles fueron inducidas a valores de pH específicos (pH_{crit} y pH_{ϕ}). La formación de complejos solubles fue iniciada a un pH_{crit} caracterizado por un ligero incremento de las propiedades ópticas del sistema (turbidez y dispersión de luz). La formación de complejos insolubles fue caracterizada por un abrupto incremento de las propiedades ópticas, así como la disminución de la carga neta del sistema conforme el pH se incrementaba. La aparición de complejos aglomerados fue observada a un pH_{ϕ} específico del sistema. La adición de NaCl a los sistemas originó un decremento en el rendimiento de los complejos, el cual fue asociado al apantallamiento de los grupos ionizables de las macromoléculas, repercutiendo en el desplazamiento del pH_{ϕ} . La independencia de la temperatura del pH_{crit} y pH_{ϕ} sugiere que las contribuciones hidrofóbicas son despreciables en el proceso de coacervación. Sanchez y col. (2002) observaron que la velocidad de sedimentación de los coacervados se encuentra íntimamente ligada a la concentración relativa de los biopolímeros en solución. Relaciones de biopolímeros no estequiométricas originan la formación de complejos electrostáticos solubles; bajo estas condiciones, los complejos sedimentan muy lentamente. Relaciones de biopolímeros estequiométricamente balanceadas originan sistemas altamente inestables, incrementando la velocidad de sedimentación de los complejos. Laneuville y col., (2000) observaron la influencia de la relación proteína-polisacárido (Pr:Ps) en el tamaño de los complejos suero de leche-goma xantana, bajas relaciones Pr:Ps (5:1 y 10:1) produjeron principalmente complejos de tamaño pequeño (40% fueron $< 20 \mu\text{m}^2$), mientras que a altas relaciones (15:1 y 20:1) 40-44% de las partículas fueron $> 300 \mu\text{m}^2$.

Varios estudios han demostrado la formación de complejos electrostáticos de mezclas proteína-polisacárido a pH por encima de su punto isoeléctrico de las proteínas. Dichas interacciones, pueden ser modificadas por cambios en el pH, la fuerza iónica y la temperatura, así como la relación de biopolímeros, la concentración total de biopolímeros, la densidad de carga y la rigidez de los polielectrolitos (Wang y col., 2007; Mathieu y col., 2006; Bohidar y col., 2005; Desai y Park, 2005; Mekhloufi y col., 2005; Schmitt y col.,

2005; Weinbreck y col., 2004; Weinbreck y col., 2004; Thimma y Tammishetti, 2003; Walstra, 2003; Weinbreck y col., 2003; Girard y col., 2003; Girard y col., 2002; Sanchez y col., 2002; Schmitt y col., 2001; Kaibara y col., 2000; Burgess, 1990). En la tabla 1 se muestra una revisión de los sistemas comúnmente estudiados, así como las diferentes técnicas de caracterización de los complejos electrostáticos.

Tabla 1. Estudios sobre sistemas coacervados.

Referencia	Sistema	Técnicas experimentales	Parámetros
(Burgess, 1990)	Gelatina-goma arábiga y albúmina de suero de bovino- goma arábiga.	Movilidad electroforética. Rendimiento de coacervado.	pH, fuerza iónica, CTB y tiempo
(Kaibara y col., 2000)	Albúmina de suero de bovino- poli(cloruro de dialildimetil amonio).	Microscopía de contraste de fases, DLS y turbidimetría.	pH, temperatura y fuerza iónica
(Laneuville y col., 2000)	Proteína lactosuero - goma xantana	Composición, microscopía óptica y viscosimetría.	Relación Pr:Ps
(Schmitt y col., 2001)	β -lactoglobulina- goma arábiga.	Microscopía confocal de barrido laser y espectroscopía de difusión de onda.	Relación Pr:Ps, CTB y pH.
(Girard y col., 2002)	β -lactoglobulina- pectin (bajo y alto metoxilo).	Titulaciones, potenciométricas, Rendimiento de coacervado por centrifugación.	Relación Pr:Ps, pH, fuerza iónica y temperatura
(Sanchez y col., 2002)	β -lactoglobulina-goma acacia.	Microscopía confocal laser y dispersión de luz estática de bajo ángulo.	pH = 4.2, relación Pr:Ps = 1 y 2. Efecto del tiempo.
(Shumilina y Shchipunov, 2002)	Quitosano-carragenina.	Reología.	Tipo de carragenina y temperatura.
(Girard y col., 2003)	β -lactoglobulina- pectina.	ITC.	Relación Pr:Ps y tiempo.

Continuación tabla 1. Estudios sobre sistemas coacervados.

Thimma y Tammishetti, (2003)	Carboximetil goma guar – gelatina.	Rendimiento de coacervado y turbidimetría.	pH, composición y CTB.
Weinbreck y col., (2003)	Proteína lactosuero – goma arábica.	Turbidimetría, DLS y conductividad.	pH y fuerza iónica.
Nordby y col., (2003)	Pectina-quitosano.	Reología.	Temperatura y relación Pr:Ps.
Weinbreck y col., (2004)	Proteína de lactosuero-carragenina.	Turbidimetría de titulación y conductividad.	pH, fuerza iónica, temperatura y CTB.
Weinbreck y col., (2004)	Proteína de lactosuero-goma arábica.	Difracción de rayos X de bajo ángulo y HPLC.	pH, fuerza iónica y relación Pr:Ps.
Bohidar y col., (2005)	Albúmina de suero de bovino – poli(cloruro de dialildimetil amonio).	DLS y Reología.	pH, fuerza iónica, relación Pr:Ps y tiempo de envejecimiento.
Mekhloufi y col., (2005)	β -lactoglobulina- goma acacia	Dispersión de luz dinámica, movilidad electroforética, turbidimetría y microscopía de contraste de fases.	pH
Schmitt y col., (2005)	β -lactoglobulina- goma acacia	ITC, DLS y tensión superficial, viscosidad superficial.	pH=4.2. Relación Pr:Ps (2:1)
Mathieu y col., (2006)	Gelatina-ácido poli-acrílico	Rendimiento de coacervación, turbidimetría.	pH, fuerza iónica, temperatura y CTB
Sanchez y col., (2006)	β -lactoglobulina y goma acacia:	Dispersión de luz estática de ángulo pequeño y turbidimetría.	Nucleación como función del pH para concentración total del 0.1 % (p/p), relación 2:1 Pr:Ps.
Yu y col., (2006)	Quitosano-ovalbúmina	Potencial Z, DLS, microscopía de transmisión y fluorescencia.	pH, tiempo y relación Pr:Ps.
Santinath y col., (2007)	Agar-gelatina	Dispersión de neutrones de bajo ángulo, DSC y Reología.	Fuerza iónica.
Wang y col., (2007)	β -lactoglobulina-pectina	Reología.	Fuerza iónica y relación Pr:Ps.

Dispersión de luz dinámica (DLS), cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), calorimetría isotérmica de titulación (ITC).

Son pocos los trabajos que exhiben interacciones atractivas entre mezclas de polisacáridos, y aún menor el número de estudios de formación de complejos insolubles polisacárido-polisacárido. Khouryieh y col. (2007) observaron sinergia en las interacciones de soluciones diluidas de mezclas de goma guar-xantana y mezclas desacetiladas xantana-guar. Este último sistema exhibía una sinergia más fuerte debido a la desestabilizada estructura helicoidal y al incremento de la flexibilidad de las cadenas de la goma xantana desacetilada. Ruíz-Ramos y col. (2006) y Pérez-Orozco y col. (2004) realizaron estudios de mezclas goma de mezquite-quitosano. Ellos observaron un incremento de las propiedades reológicas del sistema, debido a la formación de complejos solubles. Nordby y col. (2003) estudiaron las interacciones asociativas entre la pectina y el quitosano. Las mezclas de ambos biopolímeros mostraron la formación de geles termorreversibles en un amplio intervalo de concentraciones. La ausencia de coacervación en el sistema pectina-quitosano sugiere débiles interacciones asociativas entre los biopolímeros, probablemente resultado de la baja concentración de biopolímeros usada (1% p/p). Hugerth y col., (1997) observaron la formación de complejos entre el quitosano y la carragenina. La formación de los complejos fue gobernada por la densidad de carga de los biopolímeros, pero el tipo de complejos (estequiométrico o no estequiométrico) depende más de la conformación de las moléculas en solución. Shumilina y Shchipunov (2002) desarrollaron geles a partir de complejos electrostáticos solubles quitosano-carragenina. Los geles obtenidos resultaron ser sensibles a la temperatura debido a las transiciones moleculares asociadas a la molécula de carragenina. Las propiedades reológicas del sistema se incrementaron con el tipo de carragenina usada ($\lambda > \iota > \kappa$).

1.2.1.1 Goma arábiga

La goma de acacia es un exudado en forma de lágrima que producen los árboles del género *Acacia spp.* Distintas especies de acacia producen distintas gommas arábicas, su composición química varía ligeramente dependiendo del origen, clima, temporada, edad del árbol, etc. (Williams y Phillips, 2000). La goma arábiga comercial por excelencia es aquella exudada por la *Acacia senegal*. Es un polielectrolito de carga negativa ampliamente usado en las

industrias farmacéutica, cosmética y de los alimentos, debido a sus propiedades fisicoquímicas y funcionales. En la naturaleza, es una sal neutra o ligeramente ácida de un polisacárido complejo que contiene iones de calcio, magnesio, sodio y potasio (Krochta y col., 1994; Williams y Phillips, 2000). Es una arabinogalactana compuesta por tres distintas fracciones con diferentes contenidos de proteína y diferentes pesos moleculares (Osman y col., 1993; Weinbreck, y col., 2004). La Figura 6 muestra la posible estructura de la goma arábica *Acacia senegal*.

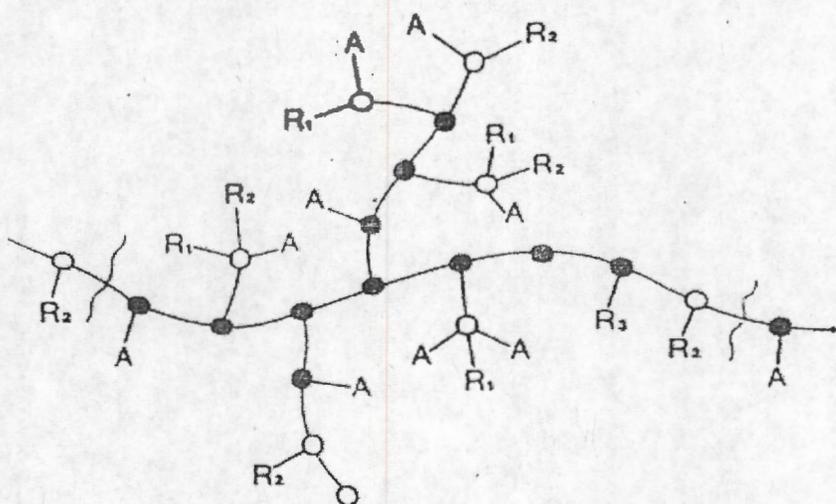


Figura 6. Posible estructura de la goma arábica *Acacia senegal* (Williams y Phillips, 2000).

Donde A = arabinosa; círculos negros (●) = 3-galactosa; círculos abiertos (○) = 6-galactosa (galactosa o ácido glucurónico unidos o en grupo terminal); R₁ = ramnosa-ácido glucurónico; R₂ = galactosa-3arabinosa; R₃ = arabinosa-3arabinosa-3arabinosa.

Su peso molecular se encuentra alrededor de los 400–600 KDa. Su composición química revela la presencia de una cadena principal de galactana con ramificaciones de galactosa/arabinosa. La parte carbonada está compuesta por D-galactosa (~40–44%), L-arabinosa (~24–27%), L-ramnosa (~13%) y dos ácidos urónicos, responsables del carácter polianiónico de la goma, los ácidos D-glucurónico (~14.5–20%) y 4-O-metil-D-

glucurónico (~2%), además de un componente proteico (~2%) que es parte integral de la estructura de la goma (Williams y Phillips, 2000; Weinbreck y col., 2003). La hidroxiprolina, serina y prolina (de carácter aniónico) son los más abundantes amino ácidos presentes en la goma arábiga (Garti y Leser, 2001; Williams y Phillips, 2000).

Es altamente soluble en agua en un amplio intervalo de pHs. Pueden prepararse soluciones acuosas por arriba del 50 % p/p. Las soluciones de goma arábiga poseen baja viscosidad a altas concentraciones, además ofrece buenas propiedades emulsionantes y encapsulantes (Krochta y col., 1994; McNamee y col., 1998; McNamee y col., 2001). Es insoluble en alcohol y la mayoría de los solventes orgánicos. Se ha sugerido que en la interfase aceite-agua el polisacárido adopta una estructura tipo “retoño de flor” (wattle blossom), con un número de unidades polisacáridas unidas a una cadena polipeptídica común (Figura 7) (Weinbreck y col., 2003; Islam y col., 1997).

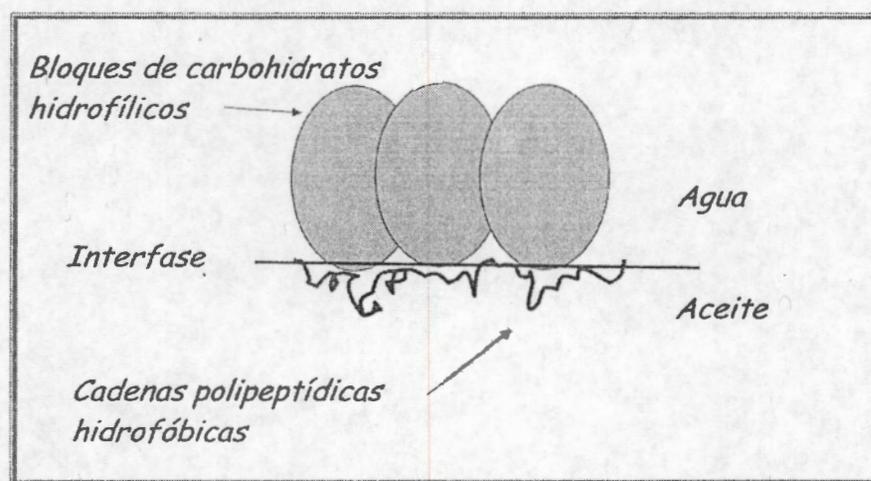


Figura 7. Ilustración de la estabilización de glóbulos de aceite por las moléculas de goma arábiga (Williams y Phillips, 2000).

Esta característica es la responsable de sus buenas propiedades superficiales y su habilidad de formar películas viscoelásticas (Garti y Reichman, 1993). La molécula de goma arábiga es algo globular, pero su estructura se puede expandir, siendo posible la existencia de

formas de espiral (hasta cierto grado), dependiendo de la cantidad de iones disociados de los ácidos urónicos o de sus sales. En su forma normal de sal cerca del pH neutro, sus grupos carboxilos pueden exhibir una gran disociación, resultando en repulsiones Coulombicas de los grupos carboxilos negativamente cargados, los cuales pueden ocasionar que la molécula adopte una estructura expandida, abierta y altamente cargada (Whistler, 1993).

1.2.1.2 Quitosano

El quitosano (Q) es obtenido por la n-desacetilación de la quitina (segundo polisacárido más abundante del planeta). La desacetilación se lleva a cabo en soluciones concentradas de hidróxido de sodio o potasio (30 a 60 %w/v) con temperaturas de reacción de 80 a 140 °C hasta por 10 h. Estos tres parámetros influyen en el grado de desacetilación, peso molecular, distribución de peso molecular, así como la distribución de unidades desacetiladas a lo largo de la cadena de polisacárido (Synowiecki y Al-Khateeb, 2003). La estructura del quitosano consiste en residuos de 2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranososa y 2-amino-2-desoxi-β-D-glucopiranososa; este último es el responsable de su carácter catiónico a valores de pH ácidos (Figura 8).

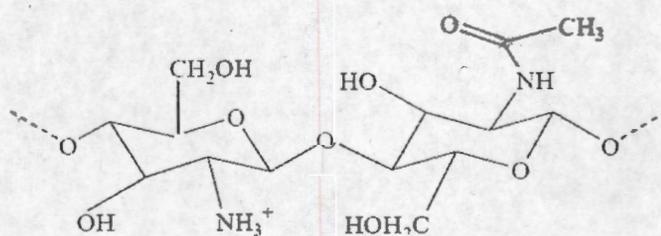


Figura 8. Estructura química del quitosano (Hudson y Jenkins, 2002).

Esta característica permite la formación de complejos electrostáticos con polímeros aniónicos dando lugar a nuevos tipos de estructuras y características fisicoquímicas.

(Tharanathan y Kittur, 2003). Las propiedades del quitosano en solución dependen de su peso molecular, grado de acetilación, pH y fuerza iónica (Wei y Hudson, 1993; Claesson y Ninhami, 1992). Moléculas de quitosano con un alto grado de desacetilación los segmentos de glucosamina tiene un valor de pK_a de 6.5, por lo que requiere de pH menores a 6 para su completa disolución. Sin embargo, con el incremento de grupos acetilo, el pK_a de la macromolécula se incrementa a valores cercanos a 7.5 (Klinkesorn y col., 2005; Hudson y Jenkins, 2002). El quitosano no es soluble en soluciones de ácidos dipróticos como el ácido sulfúrico; los aniones sulfatos divalentes facilitan las atracciones iónicas intercadena, entrecruzando las macromoléculas previniendo su disolución (Hudson y Jenkins, 2002).

Las muestras comerciales de quitosano tiene un peso molecular de aproximadamente 400KDa (Hudson y Jenkins, 2002). A bajo pH y fuerza iónica, la viscosidad intrínseca se incrementa rápidamente, debido a fuertes repulsiones segmento-segundo, adoptando una conformación extendida (Claesson y Ninhami, 1992). El uso del quitosano en las industrias farmacéutica, de cosméticos y de los alimentos es prometedora debido a su biocompatibilidad y su no toxicidad (Kim y col., 2006; Synowiecki y Al-Khateeb, 2003; Tharanathan y Kittur, 2003).

1.3 Microencapsulación

La microencapsulación puede ser usada para proteger materiales reactivos del medio ambiente, proveer una liberación controlada y/o sostenida de los materiales, según la aplicación, como medio para convertir sustancias líquidas en sólidos manipulables, enmascarar sabores y aromas indeseados o para modificar las propiedades físicas de algunas sustancias (Yeo y col., 2005; Shahidi y Han, 1993; Li y col., 1988).

La microencapsulación por coacervación compleja involucra la separación de una dispersión coloidal en una fracción rica en coloide y otra fracción pobre en coloide, a partir del control cuidadoso de la temperatura, pH, adición de electrolitos o agentes que pueden modificar la afinidad al solvente (Xing y col., 2004). La solidificación de la matriz es realizada usualmente por métodos de entrecruzado o remoción de la fase continua. Las

microcápsulas generadas son recolectadas, por filtración o centrifugación, lavadas con el solvente apropiado y subsecuentemente secadas por aspersión o lecho fluidizado con la finalidad de obtener un sistema manipulable (Shahidi y Han, 1993). Asimismo, los sistemas coacervados pueden proporcionar una matriz densa y robusta, la cual permite retardar los procesos de difusión de la sustancia encapsulada a través de los poros de la matriz. La densidad de la matriz puede ser afectada por varios factores, como: peso molecular, concentración de los biopolímeros, carga de los biopolímeros, pH del medio en el que se van a disolver las microcápsulas y el grado de interacción entre los biopolímeros (Ko y col., 2003). Las microcápsulas obtenidas mediante esta tecnología suelen exhibir diámetros promedio entre 4 μm hasta 70 μm , alta eficiencia de encapsulación ($\sim 90\%$), buena dispersión y morfología (Xing y col., 2004), además de reducir las pérdidas por volatilización y proteger a las sustancias encapsuladas contra la oxidación (Pedroza-Islas y col., 2000).

Debido a la naturaleza hidrosoluble de los biopolímeros, si el principio activo que se desea encapsular es de naturaleza lipídica, es imprescindible formular una emulsión simple aceite-en-agua. Sin embargo, en ocasiones la optimización de la concentración de material de barrera en el proceso de formación de la emulsión y el proceso de coacervación suele ser un obstáculo importante, ya que la concentración necesaria para obtener una emulsión estable puede ser diferente a la necesaria para aumentar el rendimiento de microencapsulación (Madene y col., 2006).

La coacervación compleja de gelatina con goma arábica es uno de los sistemas de mayor aplicación (Hoagland, 2001a). El proceso consiste en la dispersión de un material insoluble en una solución de gelatina. Posteriormente, se agrega una dispersión de goma arábica a esta emulsión, el pH de la fase acuosa es ajustado entre 4.0-4.5. Esto ocasiona la coacervación compleja entre la gelatina y la goma arábica. El sistema es enfriado a 10°C para producir un gel. Después el gel coacervado comúnmente es entrecruzado químicamente con glutaraldehído. Las cápsulas coacervadas entrecruzadas contienen una

gran cantidad de agua, pero pueden ser secadas por aspersion o en un secador de lecho fluidizado. El tamaño de las cápsulas se encuentra en un intervalo entre 20 a 1000 micras, pero pueden prepararse cápsulas fuera de este intervalo. Las eficiencias del proceso se encuentran alrededor del 80 al 95% (Hoagland, 2001a).

Yeo y col., (2005) encapsularon aceites esenciales a partir de la coacervación compleja gelatina-goma arábica. Las microcápsulas producidas exhibieron buena eficiencia de retención (almacenas a 4 o -20 °C durante 4 semanas) y liberación del aceite en soluciones de 100 mM de NaCl. Bayomi y col., (1998) prepararon microcápsulas para liberación controlada empleando la técnica de coacervación coloidal. La interacción entre una solución de quitosano diluida en ácido acético y una solución de caseína en 0.5M de hidróxido de sodio fue la base para formar las microesferas. El uso de formaldehído permitió endurecer la superficie de las microesferas. Yoshioka y col., (1990) encapsularon células a partir de la formación de complejos iónicos interpoliméricos de caboximetilcelulosa-quitosano. Daly y Knorr (1988) y Wang y col., (2001) desarrollaron microcápsulas a partir de mezclas quitosano-alginato y observaron un incremento en la dureza de la cápsula mediante la incorporación de CaCl_2 . Sin embargo, la microencapsulación por coacervación suele ser un proceso complejo y costoso, estos hechos aunados con el uso de agentes entrecruzantes no legislados en algunos países como el glutaraldehído son algunos de los inconvenientes asociados al proceso (Madene y col., 2006; Desai y Park, 2005; Sanchez y Renard, 2002a).

1.3.1 Secado por aspersion

El secado por aspersion es el método de encapsulación más antiguo. En los años 30's se utilizó por primera vez para encapsular sabores empleando goma arábica como material de pared (Shahidi y Han, 1993). Es utilizado frecuentemente en la industria alimentaria, debido a que emplea una tecnología simple, relativamente económica y versátil (Hoagland, 2001a; Shahidi y Han, 1993).

El proceso consiste en asperjar una mezcla de la sustancia activa y el material de barrera en una cámara con aire caliente en movimiento en donde ocurre una rápida evaporación del disolvente produciendo las microcápsulas (Hoagland, 2001a). El primer paso en la microencapsulación por secado por aspersión consiste en la adecuada selección del material de barrera. Estos materiales deben poseer buenas propiedades emulsionantes, tener la capacidad de formar una buena película, exhibir baja viscosidad a altas concentraciones (< 500 cP a >45% de sólidos), mostrar baja higroscopicidad, liberar las sustancias en el momento y lugar adecuados, tener un bajo costo, proporcionar estabilidad y brindar buena protección a las sustancias encapsuladas contra agentes externos (Madene y col., 2006; Hogan y col., 2001; Shahidi y Han, 1993). Los materiales de barrera más utilizados son la goma arábiga, maltodextrinas, algodones modificados o mezclas de ellos (Desai y Park, 2005; Ré, 1998). Otros polisacáridos (alginato, carboximetilcelulosa, goma de guar) y proteínas (proteínas del suero, proteínas de soja, caseinato de sodio) puede utilizarse como material de la pared en el secado por aspersión, pero su uso se vuelve muy tedioso y costoso debido a su baja solubilidad en agua (Desai y Park, 2005; Ré, 1998). El tipo de material de barrera influirá en la estabilidad de la emulsión, en el tamaño de partícula, en las propiedades de flujo, en las mecánicas y en la vida útil del material deshidratado (Risch, 1995; Ré, 1998).

El segundo paso es dispersar la sustancia activa en el material de barrera (Hoagland, 2001a). La sustancia activa suele ser hidrófoba, por lo que se parte de una emulsión estable que contribuya a la retención eficiente del principio activo (Madene y col., 2006; Hoagland 2001a). La cantidad de biopolímero necesaria para obtener microencapsulados estables suele ser mayor a la requerida para obtener una emulsión estable (Pedroza-Islas y col., 2000). Generalmente se busca que la emulsión tenga un tamaño de glóbulo entre 1-3 μm , con la finalidad de minimizar el aceite libre en la superficie de las microcápsulas secas (Hoagland, 2001a). Las microcápsulas producidas suelen tener un tamaño entre 10 -40 μm , las cuales pueden encontrarse solas o en agregados mostrando geometrías desde irregulares hasta muy cercanas a la esfericidad (Hoagland, 2001a).

2 Justificación

El diseño de sistemas dispersos alimenticios (emulsiones y microcápsulas) no sólo exige que éstos sean estables, sino que provean un efecto benéfico o funcional. Con base en lo anterior, se busca que el material emulsionado/microencapsulado sea encapsulado eficientemente, protegido contra factores ambientales degenerativos y, cuando sea requerido, liberado bajo condiciones controladas. El cumplimiento de todas estas condiciones es prácticamente imposible utilizando un solo biopolímero como material de barrera. El uso de mezclas binarias de biopolímeros, o incluso de mayor orden, permiten potencializar el efecto funcional de productos comerciales.

La estabilidad de largo plazo de emulsiones está íntimamente ligada a la estructura y conformación de los biopolímeros en la interfase aceite-agua. Las emulsiones que exhiben estabilidad a largo plazo son aquellas que presentan membranas interfaciales fuertes, cuya estabilidad contra la coalescencia de los glóbulos esté gobernada por las propiedades viscoelásticas de las membranas que resisten el efecto de fuerzas disruptivas como lo son esfuerzos cortantes ocasionados por su manipulación. Si bien la goma arábica y el quitosano son polisacáridos capaces de adsorberse en la interfase agua-aceite y proporcionar estabilidad estérica y/o electrostática al sistema, los complejos electrostáticos goma arábica-quitosano también deberían de proporcionar estabilidad al sistema debido al incremento del peso molecular del complejo y al aumento de las propiedades viscoelásticas del sistema.

En este trabajo se busca proporcionar información acerca de las interacciones originadas de mezclas binarias goma arábica-quitosano, para así contribuir a la formulación de productos estables y funcionales.

3 Hipótesis.

Las interacciones atractivas de mezclas de polisacáridos polielectrolitos (goma arábica y quitosano) de carga opuesta, permiten la formación de membranas interfaciales mejor estructuradas que aquellas que se pueden obtener a partir de los biopolímeros individuales, formando sistemas dispersos alimenticios, como emulsiones y microencapsulados con mejores propiedades funcionales y estabilidad.

4 Objetivo

Estudiar los factores que determinan la formación y propiedades de complejos electrostáticos insolubles (coacervados) goma arábiga-quitosano y su aplicación en sistemas dispersos.

Objetivos particulares

- Estudiar las interacciones que puedan surgir entre la goma arábiga y el quitosano como una función del pH, concentración de NaCl, concentración y proporciones relativas de los biopolímeros.
- Determinar las concentraciones relativas en el equilibrio de los complejos goma arábiga-quitosano obtenidos a partir de diferentes concentraciones y proporciones relativas de los biopolímeros empleando las técnicas de cromatografía de líquidos de alta resolución y análisis elemental.
- Caracterizar el complejo goma arábiga-quitosano mediante el estudio de sus propiedades reológicas y microestructurales, esta última aplicando microscopía electrónica de barrido.
- Establecer el efecto de la velocidad de agitación y concentración de goma arábiga en la estabilidad de emulsiones simples O/W_{GA} .
- Formular una emulsión simple O/W_{GAQ} por coacervación a partir de la adsorción secuencial de los biopolímeros en la interfase aceite-agua.
- Caracterizar las propiedades reológicas de la emulsión simple O/W_{GAQ} estabilizada por los complejos goma arábiga-quitosano.
- Obtener sistemas microencapsulados a partir de las emulsiones simples O/W_{GAQ} y O/W_{GA} mediante la técnica de secado por aspersión.
- Estudiar la microestructura de los microencapsulados obtenidos.

5 Materiales y metodología

5.1 Materiales

Quitosano (peso molecular medio, grado de acetilación 21%) proporcionando por Sigma-Aldrich (San Luis, MO, EUA). Goma arábiga (*Acacia senegal*) en lágrima, proporcionada por Industrias Ragar, S.A. de C.V. (D.F., México). Aceite vegetal de canola (grado alimenticio), Alimentos Capullo S., de R.L. de C.V. (México, D.F.). Hidróxido de sodio (NaOH), ácido clorhídrico (HCl), cloruro de sodio (NaCl), glutaraldehído (C₅H₈O₂), etanol grado HPLC (C₂H₆O), acetona (C₃H₆O) y agua grado HPLC (H₂O) fueron obtenidas de J.T. Baker, S.A de C.V. (Xalostoc, Edo. México, México).

5.2 Metodología

A continuación se describe la metodología experimental, la cual se divide en tres partes: 1) ubicación y caracterización de la fase coacervada; 2) formulación de emulsiones simples por coacervación compleja; y 3) formulación de microencapsulados a partir de las emulsiones simples.

Coacervación compleja entre la goma arábica y el quitosano: Aplicación potencial en emulsiones y microencapsulados

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

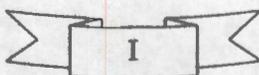
“IZTAPALAPA”

COACERVACIÓN COMPLEJA ENTRE LA GOMA
ARÁBIGA Y EL QUITOSANO: APLICACIÓN
POTENCIAL EN EMULSIONES Y
MICROENCAPSULADOS.

PRESENTA:

M. en C. HUGO ESPINOSA ANDREWS

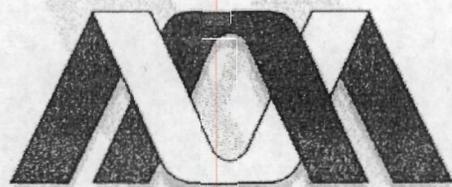
TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS (INGENIERÍA QUÍMICA).



Coacervación compleja entre la goma arábiga y el quitosano: Aplicación potencial en emulsiones y microencapsulados

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

“IZTAPALAPA”



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS E HIDRÁULICA

DOCTORADO EN CIENCIAS (INGENIERÍA QUÍMICA)

COACERVACIÓN COMPLEJA ENTRE LA GOMA ARÁBIGA Y EL QUITOSANO:
APLICACIÓN POTENCIAL EN EMULSIONES Y MICROENCAPSULADOS.

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS (INGENIERÍA QUÍMICA).

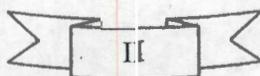
PRESENTA:

HUGO ESPINOSA ANDREWS

ASESOR:

DR. EDUARDO JAIME VERNON CARTER

ENERO 2008



AGRADECIMIENTOS

A mi esposa Nancy Stivaliz por su amor, comprensión y paciencia, a tu lado he conseguido alcanzar todas las metas propuestas en mi vida.

A Valeria por ser mi fortaleza y la razón de levantarme día a día.

A mis padres Rosa Martha y Juventino por su amor y consejos, gracias por apoyarme en todas las decisiones de mi vida.

A mis hermanos Roberto y Andrés por su amistad y compañía con la cual nunca me he sentido solo.

Agradezco especialmente a la Dra. Gretchen Terri Lapidus Lavine, Dr. Humberto Vázquez Torres, Dr. Jaime Vernon Carter, Dr. Jesús Gracia Fadrique y Dr. Gustavo F. Gutiérrez López, por ser parte del jurado evaluador quienes con sus aportaciones y comentarios contribuyeron invaluablemente a mejorar éste trabajo de investigación.

Agradezco al Dr. Jaime Vernon Carter por su apoyo incondicional y la amistad brindada, gracias por confiar en mí.

A mis amigos del laboratorio de biopolímeros Eva, Gabriel, Pablo, Diana, Rubén, Angélica, Abraham, Reina y Arturo quienes con su amistad y compañía permitieron que mi estancia durante los estudios del posgrado resultara más agradable.

A Ofelia por su amistad y su invaluable ayuda durante la realización de las pruebas de Microscopia Electrónica de Barrido.

A Eristeo por su amistad y consejos los cuales fueron de gran utilidad para la escritura de esta tesis.

A todas las personas que participaron de manera directa o indirecta en la realización de esta tesis de doctorado, así como en mi formación personal y profesional.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado para la realización de los estudios de doctorado y por la beca otorgada para la conclusión de esta tesis, a través del proyecto 45992 que lleva por nombre: "Estructuras y Propiedades Físicoquímicas de Películas Interfaciales y su Interrelación con la Protección de Nutracéuticos Emulsificados y Microencapsulados".

RESUMEN

En este trabajo se investigó la formación de complejos poliméricos entre la goma arábica (GA) y el quitosano (Q), dos polisacáridos de carga opuesta, como una función de la relación de biopolímeros, concentración total de biopolímeros, pH y concentración de NaCl. Se determinaron las condiciones de formación de los complejos interbiopoliméricos insolubles (coacervación compleja) usando mediciones potenciométricas de los biopolímeros en solución; turbidimétricas y movilidad electroforética de la fase en equilibrio; y rendimiento de la fase coacervada. Las concentraciones relativas de los biopolímeros en la fase coacervada y la fase en equilibrio fueron cuantificadas por análisis elemental y cromatografía de líquidos de alta resolución, respectivamente. Los resultados indican que el mayor rendimiento de coacervado se obtiene al mezclar 5 gramos de goma arábica por gramo de quitosano, independientemente de la concentración total de biopolímero usada. La formación de los complejos *goma arábica-quitosano* dependen del pH y concentración de sal. El intervalo de pH de máxima interacción fue ubicado entre 3.5 - 5, con un punto de resistencia de NaCl de 150 mM. Los espectros de infrarrojo indicaron que el acomplejamiento se llevan a cabo por la interacción de los grupos carboxilo de la goma arábica y los grupos amino del quitosano. Los complejos insolubles *goma arábica-quitosano* fueron caracterizados como geles débiles con carácter predominantemente viscoso característico de las matrices coacervadas, presentando mayores propiedades viscoelásticas a un pH = 4.5. Las micrografías de los complejos *goma arábica-quitosano* muestran un alto grado de entrecruzamiento entre los biopolímeros y presentan estructuras intrincadas de un gel complejo.

Posteriormente, se evaluaron las condiciones de formulación de emulsiones simples de aceite de canola como fase oleosa empleando goma arábica como emulsionante. Las emulsiones de mayor estabilidad fueron producidas empleando 7600 rpm y 10 % (p/p) de goma arábica. La emulsión simple con quitosano mostró una menor estabilidad en comparación con las emulsiones de goma arábica. Tomando en cuenta esto, la formación de una emulsión simple por coacervación se efectuó mediante la adsorción secuencial de

los biopolímeros a la interfase. Primero se formuló la emulsión simple con goma arábica al 10% (p/p) y, posteriormente, esta emulsión fue redispersada en una solución de quitosano al 2% (p/p), produciendo la emulsión por coacervación O/W_{GAQ}. El incremento de la fase dispersa en las emulsiones O/W_{GAQ} originó un incremento en las propiedades viscoelásticas de las emulsiones. Las emulsiones O/W_{GAQ} con un contenido de fase dispersa del 10 y 20% (p/p) presentaron un comportamiento viscoso en todo el intervalo de frecuencias, estas dos emulsiones pueden ser utilizadas en aplicaciones de secado por aspersión. La emulsión O/W_{GAQ} con un contenido de fase dispersa del 40% (p/p) presentó un comportamiento elástico en todo el intervalo de frecuencias.

Las emulsiones O/W_{GA} y O/W_{GAQ}, ambas con un contenido de fase dispersa del 20% (p/p), fueron secadas por aspersión bajo las mismas condiciones para obtener los respectivos sistemas microencapsulados. Ambos sistemas presentaron la formación de microencapsulados esféricos que contenían en su interior pequeñas microcápsulas. Los microencapsulados producidos a partir de la emulsión por coacervación O/W_{GAQ} mostraron una mayor uniformidad de tamaño, con menor área superficial, y mayor densidad del material de barrera en comparación con los microencapsulados de goma arábica.

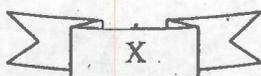
Tabla de contenido

1	Introducción.....	1
1.1	Emulsión.....	3
1.1.1	Emulsión simple.....	3
1.1.2	Emulsión múltiple.....	4
1.1.3	La fase oleosa.....	5
1.1.3.1	Aceite de canola.....	5
1.1.4	La fase acuosa.....	6
1.1.5	Emulsionante.....	6
1.1.6	Interfase aceite-agua.....	6
1.1.7	Emulsionante de bajo peso molecular.....	7
1.1.8	Poliectrolitos.....	8
1.1.9	Biopolímeros.....	9
1.1.10	Formación de emulsiones simples.....	10
1.1.11	Estabilidad.....	11
1.1.12	Mecanismos de inestabilidad de emulsiones simples.....	13
1.2	Interacción entre macromoléculas.....	15
1.2.1	Coacervación.....	18
1.2.1.1	Goma arábica.....	22
1.2.1.2	Quitosano.....	25
1.3	Microencapsulación.....	26
1.3.1	Secado por aspersión.....	28
2	Justificación.....	30
3	Hipótesis.....	31

4	Objetivo	32
5	Materiales y metodología	33
5.1	Materiales	33
5.2	Metodología.....	33
5.3	Caracterización de los complejos goma arábiga-quitosano.....	34
5.3.1	Preparación de las soluciones.....	35
5.3.2	Formación del coacervado.....	35
5.3.3	Rendimiento de la fase coacervada	35
5.3.4	Equivalencia de los biopolímeros en solución	36
5.3.5	Análisis elemental	36
5.3.6	HPLC.....	37
5.3.7	Mediciones turbidimétricas	38
5.3.8	Movilidad electroforética	39
5.3.9	Rendimiento de coacervación en función del pH.....	39
5.3.10	Rendimiento de coacervación en función del NaCl	40
5.3.11	Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR).....	40
5.3.12	Reología de la fase coacervada.....	40
5.3.13	Densidad relativa de la fase coacervada.....	41
5.3.14	Microscopía electrónica de barrido	41
5.4	Emulsión simple por coacervación O/W_{GAQ}	42
5.4.1	Formulación de emulsiones simples O/W_{GA}	43
5.4.2	Formulación de una emulsión simple O/W_Q	43
5.4.3	Difracción de luz	43
5.4.4	Determinación de las cinéticas de coalescencia	44

5.4.5	Formulación de las emulsiones simples por coacervación O/W _{GAQ}	44
5.4.6	Microscopio óptico	45
5.4.7	Reología de las emulsiones simples por coacervación O/W _{GAQ}	45
5.5	Microencapsulación	46
5.5.1	Secado por aspersión	46
5.5.2	Microscopía electrónica de barrido para los microencapsulados	46
6	Resultados y discusión	47
6.1	COACERVACIÓN COMPLEJA	48
6.1.1	Formación del coacervado	49
6.1.1.1	Relación y concentración de biopolímeros	49
6.1.1.2	Equivalencia de los biopolímeros en solución	53
6.1.1.3	Análisis elemental	55
6.1.1.4	HPLC	57
6.1.1.5	Turbidez	62
6.1.1.6	Movilidad electroforética	63
6.1.1.7	Rendimiento de coacervación en función del pH	65
6.1.1.8	Rendimiento de coacervación en función de la concentración de NaCl	67
6.1.2	Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier	69
6.1.3	Reología de la fase coacervada	70
6.1.4	Microscopía electrónica de barrido	73
6.2	SISTEMAS DISPERSOS	76
6.2.1	Formulación de emulsiones simples O/W por coacervación	78
6.2.2	Emulsiones simples con goma arábiga (O/W _{GA})	79
6.2.3	Emulsiones simples con quitosano (O/W _Q)	81

6.2.4	Emulsiones simples por coacervación compleja (O/W _{GAQ})	82
6.2.5	Efecto de la fase dispersa en la formulación de emulsiones O/W _{GAQ}	84
6.3	MICROENCAPSULACIÓN	88
6.3.1	Microencapsulación por secado por aspersión	89
7	Conclusiones	94
8	Trabajos a futuro	95
9	Bibliografía	97



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Emulsionante de bajo peso molecular.....	7
Figura 2. Orientación de un emulsionante en la interfase aceite-agua.....	8
Figura 3. Preparación de una emulsión simple O/W.....	11
Figura 4. Principales mecanismos de inestabilidad en emulsiones simples (McClements, 1999).....	13
Figura 5. Principales interacciones entre macromoléculas (Weinbreck, 2004).	16
Figura 6. Posible estructura de la goma arábica <i>Acacia senegal</i> (Williams y Phillips, 2000).	23
Figura 7. Ilustración de la estabilización de glóbulos de aceite por las moléculas de goma arábica (Williams y Phillips, 2000).	24
Figura 8. Estructura química del quitosano (Hudson y Jenkins, 2002).....	25
Figura 9. Diagrama de flujo para la caracterización del complejo goma arábica-quitosano.	34
Figura 10. Diagrama de flujo para producir emulsiones por coacervación compleja O/W _{GAQ}	42
Figura 11. Ubicación de la fase coacervada a partir de un diagrama de fases de tres componentes.	49
Figura 12. Rendimiento de coacervación como función de la relación de biopolímeros y concentración de biopolímeros después de 72 hrs de interacción.	50
Figura 13. a) Formación de complejos goma arábica-quitosano en función de la relación total de biopolímeros (3:1, 4:1, 5:1, 6:1 y 7:1, para una concentración de quitosano al 1% p/p); b) fase coacervada CTB _{6,0} R ₅	52
Figura 14. a) Miliequivalentes de NaOH por 2 g de quitosano; b) miliequivalentes de NaOH por 10 g de goma arábica.	53
Figura 15. Relación de miliequivalentes de goma arábica/quitosano como una función de la relación de biopolímeros goma arábica/quitosano	54

Figura 16. a) Relación de biopolímeros en la fase coacervada, y b) relación de biopolímeros en la “fase en equilibrio”, como función de la $R_{GA/Q}$ y CTB_n después de 72 hrs de interacción.....	56
Figura 17. Cromatogramas de los estándares (10 g/L) de 1) ácido D-glucurónico, 2) L-arabinosa, 3) L-ramnosa, y 4) D-galactosa.....	57
Figura 18. Curvas de calibración de los estándares de ácido D-glucurónico, L-arabinosa, L-ramnosa y D-galactosa.....	58
Figura 19 . Curva de calibración de los monosacáridos presentes en la goma arábica por HPLC.....	59
Figura 20. Cromatogramas de los complejos hidrolizados goma arábica-quitosano.....	60
Figura 21. Comparación de la masa de goma arábica presente en las fases coacervadas de los complejos goma arábica-quitosano determinadas por análisis elemental y HPLC.....	61
Figura 22. Turbidez de la “fase en equilibrio” en función de la relación y concentración de biopolímeros después de 72 horas.....	62
Figura 23. Movilidad electroforética de la fase en equilibrio en función de la relación y concentración de biopolímeros después de 72 horas.....	64
Figura 24. Coacervación compleja de goma arábica y quitosano en función del pH, $CTB_{6,0}R_5$ después de 72 hrs.....	66
Figura 25. Coacervación compleja de la goma arábica y quitosano en función de la concentración de NaCl, $CTB_{6,0}R_5$ después de 72 hrs.....	67
Figura 26. Espectro de FTIR de la goma arábica, quitosano y la fase coacervada GA/Q... ..	69
Figura 27. Módulo complejo de la fase coacervada en función de la deformación, a pH 3, 4.5 y 6.	71
Figura 28. Curvas de amplitud de las fases coacervadas a 25 °C y una $\omega \sim 10$ rad/s.	72
Figura 29. a) Micrografía de goma arábica; b) micrografía de quitosano.....	74
Figura 30. a) Micrografía de la fase coacervada goma arábica-quitosano $CTB_{6,0}R_5$	75
Figura 31. Tamaño y distribución de los glóbulos de la emulsión O/W _{GA} en función de la velocidad de agitación y concentración de goma arábica.	79

Figura 32. A) Distribución de los glóbulos de emulsión O/W _Q ; B) tendencia de medición de los glóbulos de emulsión O/W _Q	81
Figura 33. Microfotografía de la emulsión por coacervación O/W _{GAQ} , amplificación ×100.	83
Figura 34. Curvas de amplitud para las emulsiones simples formuladas por coacervación compleja.....	85
Figura 35. Curvas de frecuencia para las emulsiones simples formuladas por coacervación compleja.....	86
Figura 36. Microcápsulas obtenidas de la emulsión O/W _{GA} , amplificación: × 150.....	89
Figura 37. Microcápsulas obtenidas de la emulsión O/W _{GA} , amplificación × 2500.....	90
Figura 38. Microcápsulas obtenidas de la emulsión O/W _{GAQ} , amplificación: a) × 150 y b) × 2500	91
Figura 39. Microcápsulas con goma arábica (× 10000).....	92
Figura 40. Microcápsulas con el complejo goma arábica-quitosano (×10000).	93

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estudios sobre sistemas coacervados.	20
Tabla 2. Goma arábica experimental determinada mediante el análisis elemental de los diferentes coacervados a partir de $CTB_nR_{GA/Q}$	55
Tabla 3. Concentración másica de goma arábica en las fases coacervada y en equilibrio para las diferentes relaciones en peso.	60
Tabla 4. Tamaños promedios volumétricos ($D_{4,3}$) y promedio superficial ($D_{3,2}$), amplitud de la distribución y cinéticas de coalescencia de las emulsiones O/W _{GA} en función de la concentración de goma arábica y la velocidad de agitación.	80

NOMENCLATURA

ϵ	Constante dieléctrica del medio.
γ	Deformación.
ϕ	Fracción volumétrica de la fase dispersa.
ω	Frecuencia angular.
τ	Turbidez.
C	Tasa de coalescencia.
CTB _n	Concentración total de biopolímeros.
D(v,x%)	Diámetro promedio volumétrico de los glóbulos de la emulsión que se encuentran por debajo del x% de la distribución.
D _{3,0}	Diámetro promedio volumétrico.
DLS	Dispersión de luz dinámica.
f(Ka)	Función de Henry con un valor de 1.5.
FT-IR	Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier.
G*	Módulo complejo.
G'	Módulo elástico.
G''	Módulo viscoso.
GA	Goma arábica.
%GA _{Exp}	Porcentaje de goma arábica determinado experimentalmente.
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución.

I_0	Intensidad de referencia.
I_t	Intensidad de la luz transmitida.
ITC	Calorimetría isotérmica de titulación.
L	Longitud óptica de la celda (cm).
N_0	Número inicial de glóbulos de la fase dispersa.
N_t	Número de glóbulos de la fase dispersa a un tiempo dado.
O/W_{GA}	Emulsión simple aceite-en-agua de goma arábica.
O/W_{GAQ}	Emulsión simple aceite-en-agua de goma arábica-quitosano.
O/W_Q	Emulsión simple aceite-en-agua de quitosano.
Pr	Proteína.
Ps	Polisacárido.
Q	Quitosano.
$RBFC_{GAQ}$	Relación goma arábica/quitosano en la fase coacervada.
$RBFE_{GAQ}$	Relación goma arábica/quitosano en la fase en equilibrio.
R_{GAQ}	Relación goma arábica/quitosano.
RLVE	Región lineal viscoelástica.
UE	Movilidad electroforética.
z	Potencial zeta.
η	Viscosidad.

1 Introducción

La encapsulación es el proceso a través del cual una sustancia activa es envuelta con una película continua y compacta de un polímero o es distribuida uniformemente en una matriz del material polimérico (Shahidi y Han, 1993; Moreau y Rosenber, 1993). Cuando el diámetro de partícula del producto terminado se encuentra entre 1 y 1000 μm , se le denomina microcápsula y, al proceso, microencapsulación (Hoagland, 2001a). La microencapsulación es definida como "la tecnología de empacar sólidos, líquidos o gases en cápsulas selladas de tamaño microscópico, que liberan sus contenidos a velocidades controladas bajo la influencia de ciertos estímulos como pH, temperatura o fuerza iónica, por mencionar algunos" (Bertolini y col., 2001; McNamee y col., 1998; Garti, 1997; Sparks, 1981). Los sistemas microencapsulados son ampliamente utilizados en aplicaciones de las industrias química, farmacéutica, cosmética, biotecnológica y de los alimentos. Por ejemplo, en la industria de los alimentos, los ácidos grasos poliinsaturados y las vitaminas, que son de vital importancia para el tratamiento o la prevención de algunas enfermedades, se degradan rápidamente, por lo que su protección y aislamiento de factores prooxidantes (temperatura, pH, oxígeno, iones metálicos, UV y rayos X), mediante la tecnología de la microencapsulación es imprescindible para la conservación de su integridad química, física y funcional.

La funcionalidad del material encapsulado y las propiedades fisicoquímicas de la microcápsula dependen de las propiedades de la membrana protectora, las cuales se encuentran íntimamente ligadas a las interacciones entre los polímeros formadores de la membrana, así como las interacciones con otros ingredientes que la constituyen, de su estructura y de los mecanismos difusivos que puedan darse a través de ésta. En general, el material encapsulado puede estar constituido de una o varias sustancias, mientras que el material de barrera puede ser diseñado empleando una capa sencilla o múltiple (Desai y Park, 2005; Shahidi y Han, 1993). Existe una gran cantidad de materiales de barrera, por ejemplo, polímeros sintéticos o naturales, neutros o con carga (positiva o negativa), ramificados o lineales. La selección de los materiales de barrera usados para microencapsular una sustancia activa dependerán en gran medida de la disponibilidad y

costos de la materia prima, de la funcionalidad esperada del material encapsulado, de las propiedades fisicoquímicas esperadas de las microcápsulas y de la tecnología seleccionada para la microencapsulación. Las tecnologías usadas en la microencapsulación son divididas en métodos físicos, químicos y fisicoquímicos (Shahidi y Han, 1993). La selección de la tecnología de microencapsulación es función de los costos, las propiedades fisicoquímicas del material que se encapsulará, del tamaño deseado de las microcápsulas, de la aplicación y de los mecanismos de liberación deseados (Ré, 1998).

La microencapsulación por coacervación es una tecnología eficiente, pero costosa. En la década de los años noventa, la microencapsulación por coacervación compleja había encontrado un uso limitado en la encapsulación de sabores. La principal razón era la escasez de materiales de barrera que podían ser usados en la industria de los alimentos (Shahidi y Han, 1993). En los últimos años, la búsqueda de nuevos sistemas para la microencapsulación por coacervación ha propiciado nuevas líneas de investigación. La mayoría de los sistemas incluyen mezclas proteína-polisacárido, los cuales han sido aplicados exitosamente en aplicaciones farmacéuticas y alimenticias. Sin embargo, existen pocas investigaciones relacionadas con la formación de complejos insolubles a partir de mezclas de polisacáridos (Dumitriu y col., 1994; Daly y Knorr, 1988). El desarrollo de matrices polisacáridas coacervadas requiere del conocimiento básico acerca de las interacciones atractivas entre los biopolímeros, así como la influencia de éstas en las propiedades reológicas y estabilidad de los sistemas dispersos.

1.1 Emulsión

Una emulsión consiste en dos líquidos parcialmente inmiscibles, con uno de los dos líquidos disperso en el otro en forma de pequeños glóbulos esféricos (Dickinson, 1992). La fase presente en forma de pequeños glóbulos (de 0.1 a 100 micras) se le denomina fase interna o dispersa (Muñoz y col., 2007). La fase que forma la matriz en que se suspenden los glóbulos se le denomina fase externa o continua. Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables, debido a que los contactos entre las moléculas de agua y aceite no son favorables energéticamente; el estado termodinámicamente estable corresponde al sistema que presenta las dos fases separadas, minimizando el área de contacto entre las moléculas de agua y aceite (Sherman, 1968). En un intento por desarrollar “emulsiones estables”, distintos investigadores se han limitado a controlar la cinética de los procesos que conllevan al rompimiento de las emulsiones (Begenstahl, 1995). Los tecnólogos tienen dos maneras de conseguir este propósito (Begenstahl, 1995): usando dispositivos mecánicos que dispersen el sistema y mediante la incorporación de agentes emulgentes de alto o bajo peso molecular, los cuales estabilizan la dispersión. Las emulsiones encuentran aplicaciones en diversos campos: alimentación, cosmética, farmacéutica, química agrícola, detergencia, industria de la pintura y polímeros, pretratamiento de crudo de petróleo en refinerías, tratamiento de mareas negras, asfaltos, entre otras (Muñoz y col., 2007).

Para formular una emulsión se necesita una fase oleosa, una fase acuosa, energía y agentes emulgentes. La energía es necesaria para incrementar el área interfacial entre las dos fases. El emulsionante provee el mecanismo para prevenir o minimizar la inestabilidad del sistema. En general, las emulsiones son clasificadas por su estructura en: *i*) emulsiones simples y *ii*) emulsiones múltiples.

1.1.1 Emulsión simple

Regularmente las emulsiones simples son clasificadas en: *i*) emulsiones aceite-en-agua (conocida por sus siglas en inglés O/W), en donde los glóbulos de aceite están dispersos en

agua; algunos ejemplos típicos son: la leche, la crema, la mayoría de las salsas y aderezos; y *ii*) emulsiones agua-en-aceite (W/O), en donde los glóbulos de agua están dispersos en aceite; por ejemplo: la mantequilla y la margarina.

La regla de Bancroft indica que el tipo de emulsión depende más del agente emulsionante que de las proporciones relativas de aceite o agua, o de la metodología de preparación de la emulsión (McClements, 1999). En general, para formular emulsiones del tipo O/W se emplean agentes emulsionantes hidrosolubles. Mientras que, para formular emulsiones W/O se emplean agentes emulsionantes liposolubles o con una solubilidad mayor en aceite que en agua.

1.1.2 Emulsión múltiple

Las emulsiones múltiples ó emulsión de emulsiones son sistemas complejos que pueden exhibir estructuras terciarias, cuaternarias, o de mayor orden. La emulsión múltiple simple, también llamada “emulsión doble” presenta una estructura terciaria, en la cual los glóbulos dispersos contienen a su vez glóbulos más pequeños (Rosano y col., 1998). Existen dos tipos de emulsiones dobles: *i*) agua-en-aceite-en-agua ($W_1/O/W_2$) y *ii*) aceite-en-agua-en-aceite ($O_1/W/O_2$). En general, las fases internas y externas son químicamente semejantes y se encuentran separadas físicamente por una fase intermedia inmisible de naturaleza opuesta (Dickinson y McClements, 1996). Los múltiples compartimientos que ofrece una emulsión múltiple ofrecen una gran cantidad de posibilidades para la liberar, retener, eliminar y/o proteger sustancias químicas encapsuladas en su interior. Las emulsiones múltiples son usadas en varias aplicaciones industriales y desarrollos tecnológicos: removiendo metales tóxicos en agua contaminada y en la encapsulación de drogas, nutrientes, colorantes, saborizantes, enzimas y cosméticos, que pueden ser liberadas a tasas controladas y bajo la influencia de ciertos estímulos como el pH, la temperatura o enzimas (Sugiura y col., 2004; Rodríguez-Huezo y col., 2004; González-Ochoa y col., 2003; Yan y Pal, 2001; Nakano, 2000; Rosano y col., 1998; Garti, 1997; Dickinson y col., 1993).

1.1.3 La fase oleosa

La fase oleosa (O) de una emulsión puede estar constituida por un producto químico orgánico; por ejemplo, hidrocarburos o grasas y aceites procedentes de productos naturales (Muñoz y col., 2007). No obstante, también se utilizan fases oleosas basadas en lípidos naturales químicamente modificados; por ejemplo, las grasas hidrogenadas.

Entre los compuestos más importantes que constituyen a las fases oleosas alimentarias se puede citar: ácidos grasos, lípidos, colorantes liposolubles, vitaminas y esteroides. Las características más importantes de las fases oleosas alimenticias son: sus propiedades organolépticas, la densidad, punto de fusión, viscosidad y tensión superficial (McClements, 1999). También es importante el carácter no polar de la fase oleosa, ya que influyen en las propiedades interfaciales de los emulsionantes (Muñoz y col., 2007). Pérez-Orozco y col. (2004) observaron el incremento de la viscosidad interfacial en el sistema aceite de canola-goma de mezquite en comparación con el sistema aceite mineral-goma de mezquite, debido a la presencia de los grupos polares de los ácidos oléico, linoléico y linolénico presentes en el aceite de canola, los cuales interactuaban en la interfase con la goma de mezquite.

1.1.3.1 Aceite de canola

El aceite de canola contiene ácido α -linolénico (ácido graso esencial omega-3) y ácido linoléico (ácido graso esencial omega-3) los cuales ayudan a reducir el riesgo de enfermedades cardíacas y de accidentes cerebro-vasculares (Huang y col., 2007, Tricia y col., 2006). El ácido α -linolénico es un ácido graso esencial que los humanos no pueden sintetizar en el cuerpo y tienen que obtenerlo a través de la dieta, mientras que los ácidos eicosapentaenoico y docosahexaenoico pueden ser biosintetizados a partir del ácido α -linolénico provenientes de una fuente animal o vegetal (Bourre, 2007, Tricia y col., 2006). El ácido α -linolénico se encuentra en las grasas y aceites de la canola, la linaza, el germen de trigo y el frijol de soya; nueces como las nueces de nogal, las pacanas y los piñones; y las semillas de la grosella roja y negra. El aceite de canola contiene 11% de ácido α -

linolénico, 21% de ácido linoléico, 61% de grasas monoinsaturadas y 75 de grasas saturadas (Tricia y col., 2006).

1.1.4 La fase acuosa

La fase acuosa (W) de las emulsiones raramente consiste en agua pura, generalmente es el medio para solubilizar o disociar alguna sustancia de interés. Entre estas se puede mencionar: sales, ácidos, bases, azúcares, estabilizantes (polisacáridos, polímeros), conservantes, colorantes acuosos, emulsionantes, proteínas; la presencia de estas últimas dos puede deberse a un exceso de las sustancias respecto a las cantidades presentes en la interfase, por incompatibilidad con la interfase o simplemente material desplazado de la misma durante el proceso de formación (Muñoz y col., 2007).

1.1.5 Emulsionante

Un emulsionante es una molécula anfifílica, de bajo o alto peso molecular, que tiende a migrar y adsorberse en las interfases aceite-agua reduciendo la tensión interfacial. Esto favorece la formación de los glóbulos de la emulsión con un menor consumo de energía, estabilizando la emulsión en cierto periodo de tiempo (Muñoz y col., 2007; McClements, 1999).

1.1.6 Interfase aceite-agua

Las emulsiones son mezclas complejas. Estas usualmente contienen emulsionantes de bajo o alto peso molecular superficialmente activos. En sistemas que contiene más de un componente en la interfase, existen tres tipos de mecanismos adsorción (Begenstahl, 1995): 1) adsorción competitiva, 2) adsorción asociativa y 3) adsorción secuencial. En este último mecanismo, el primer componente se adsorbe en la interfase aceite-agua, mientras que el segundo componente se adsorbe (generalmente de carga opuesta) sobre la superficie del primer componente, generando un sistema multicapas.

1.1.7 Emulsionante de bajo peso molecular

Los emulsionantes de bajo peso molecular presentan en su estructura un segmento polar y un segmento no polar (Figura 1).

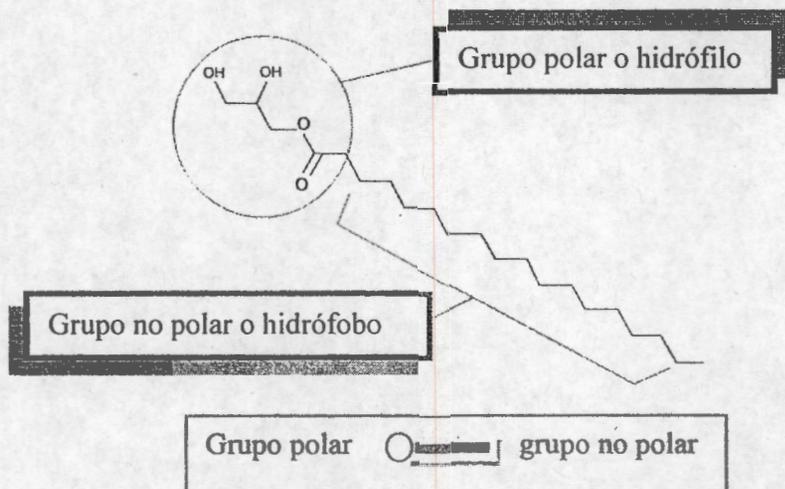


Figura 1. Emulsionante de bajo peso molecular.

La parte polar o hidrófila es conocida como “cabeza”, la cual tiene una alta afinidad por la fase acuosa; por ejemplo, grupos hidroxilos, carboxilos y iónicos (Hunter, 2001; McClements, 1999). La parte no polar o hidrófoba, es conocida como “tallo”, la cual tiene una alta afinidad por la fase orgánica, por ejemplo, residuos de hidrocarburos alifáticos o aromáticos (Hunter, 2001; McClements, 1999).

Los emulsionantes más usados en la industria de los alimentos pueden ser no iónicos (por ejemplo, ésteres de sacarosa, ésteres de sorbitan, polisorbatos), aniónicos (por ejemplo, ácidos grasos) y zwitteriónicos (por ejemplo, lecitinas). El grupo hidrófobo usualmente consiste en una o más cadenas hidrocarbonadas, entre 10 y 20 átomos de carbono por cadena. Estas cadenas pueden ser saturadas o insaturadas, lineales o ramificadas, alifáticas y/o aromáticas (McClements, 1999).

Cuando estas moléculas se adsorben en la interfase aceite-agua, se orientan de manera que los segmentos no polares apuntan hacia la fase oleosa y los segmentos polares hacia la fase acuosa (Figura 2).

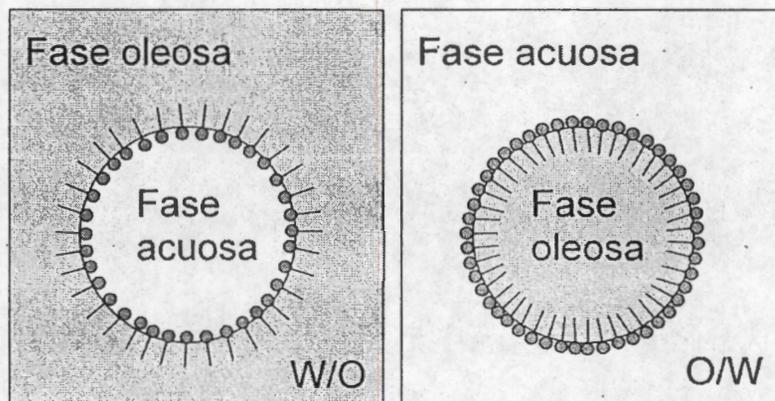


Figura 2. Orientación de un emulsionante en la interfase aceite-agua.

1.1.8 Polielectrolitos

Un polímero que contiene grupos ionizables es llamado polielectrolito o macroión. Estos pueden agruparse en tres grupos (Walstra, 2003, Hoagland, 2001b): 1) *Polímeros catiónicos*; estos generalmente contiene grupos amino ($-\text{NH}_2$ o $=\text{NH}$) los cuales pueden ser protonados a pH suficientemente bajos (normalmente 7–10); 2) *polímeros aniónicos*; estos generalmente contienen grupos carboxilo ($-\text{COOH}$), los cuales se encuentran en el ácido glucurónico o residuos semejantes presentes en la mayoría de los polisacáridos; por ejemplo, las gomas arábiga, de mezquite, xantana, así como en pectinas y alginatos; y 3) *polianfóteros*, los cuales contienen grupos catiónicos y aniónicos. Estas moléculas pueden mostrar un punto isoeléctrico, a un pH o condiciones en solución en las cuales las magnitudes de las cargas positivas y negativas son iguales (Hoagland, 2001b). Las proteínas contiene un cierto número de aminoácidos en su estructura que pueden ionizarse para formar cationes (lisina, prolina, histamina o con grupo terminal amino) o aniones (ácido glutámico y ácido aspártico o con grupo terminal carboxilo) (McClements, 1999). Si las condiciones de disociación de los grupos iónicos de los polielectrolitos dependen de las

condiciones en la solución, particularmente pH o concentración, el polielectrolito es clasificado como débil. Por otro lado si la carga del polielectrolito es relativamente insensible a las condiciones en solución, el polielectrolito es clasificado como fuerte (Hoagland, 2001b, McClements, 1999).

1.1.9 Biopolímeros

Las proteínas y los polisacáridos son dos importantes tipos de biopolímeros usados como ingredientes de las emulsiones alimenticias (McClements 1999). Las proteínas son ampliamente usadas debido a sus excelentes propiedades emulsionantes y formadoras de espumas, mientras que los polisacáridos son empleados por sus propiedades espesantes y de retención de agua (Dickinson, 2003; McClements, 1999; Dickinson, 1993; Fennema, 1982). Ambos tipos de macromoléculas contribuyen a la estructura, apariencia, textura, sabor y estabilidad de los sistemas alimenticios a través de su comportamiento de agregación y gelación (Kruif y Tuinier, 2001; Dickinson, 1993). Las propiedades coloidales no solo dependen de la funcionalidad individual de las macromoléculas presentes en el sistema, sino también de la naturaleza y fuerza de las interacciones entre las macromoléculas (Dickinson, 1993).

Cuando un biopolímero es dispersado en una fase acuosa, los residuos no polares pueden encontrarse en contacto con moléculas de agua, esta conformación no es termodinámicamente favorable debido a interacciones hidrofóbicas, por lo que las macromoléculas adoptan una conformación en donde los residuos no polares se encuentran lo más alejado del agua. Cuando una molécula orgánica es introducida en una fase acuosa que contiene un biopolímero superficialmente activo, frecuentemente disminuye la entropía del sistema (Nakai, 2001). Para minimizar estos cambios no favorables, las moléculas no polares son forzadas a coalescer en dipolos o glóbulos, reduciendo la superficie de contacto con las moléculas de agua. Como resultado de ello, las cadenas de proteínas son forzadas a desdoblarse en una estructura micelar con las fracciones orgánicas en el interior de los glóbulos y los grupos polar en el exterior. La eliminación de los residuos no polares del

contacto con el agua genera una importante contribución a la energía libre del sistema (Nakai, 2001). La adsorción de los biopolímeros en la interfase aceite-agua da origen a membranas interfaciales, las cuales reducen el área de contacto entre las moléculas de aceite y agua. No sólo las proteínas son empleadas para producir emulsiones estables, sino también algunos polisacáridos como la goma arábiga y la goma de mezquite que presentan actividad superficial, y por lo tanto, son empleados eficientemente en la formulación de emulsiones O/W. Algunos estudios indican que la presencia de una pequeña fracción de proteína (< 3%) en la estructura de los polisacáridos, parece ser la responsable de las propiedades emulsionantes y estabilizantes de los coloides (Dickinson, 2003; Williams y Phillips, 2000; Whistler 1993). De esta manera, estos dos polisacáridos son capaces de adsorberse en la interfase O/W, formando una membrana alrededor de los glóbulos de la emulsión, previniendo su agregación. Al mismo tiempo, esta membrana interfacial puede servir como material de barrera para los sistemas microencapsulados. En general, las propiedades estabilizantes y de barrera de los biopolímeros en los alimentos son determinadas por su peso molecular, conformación, flexibilidad, polaridad e interacciones (McClements, 1999).

1.1.10 Formación de emulsiones simples

La formación de una emulsión puede generarse en una sola etapa o en varias etapas consecutivas, dependiendo de la naturaleza de los materiales usados o del método para crearla (McClements, 1999). En general, las emulsiones son formadas por los métodos de condensación o dispersión. Los métodos de dispersión son los más comunes debido a que involucran energías generalmente más pequeñas. Las técnicas más usadas para producir una emulsión son: el uso de altas tasas de corte, ultrasonificación y homogenización de alta presión (Walstra, 2003; Hunter, 2001).

Para producir una emulsión simple O/W por agitación, generalmente se emplea un dispersor de alto corte, con la finalidad de romper y entremezclar las fases oleosas y acuosas, aumentando el área interfacial entre los glóbulos de la fase oleosa y la fase acuosa. El emulsionante se adsorbe en la superficie de los glóbulos durante el proceso de

homogenización, formando una membrana protectora la cual previene la agregación de los glóbulos de la emulsión (Figura 3) (Walstra, 2003; McClements, 1999).

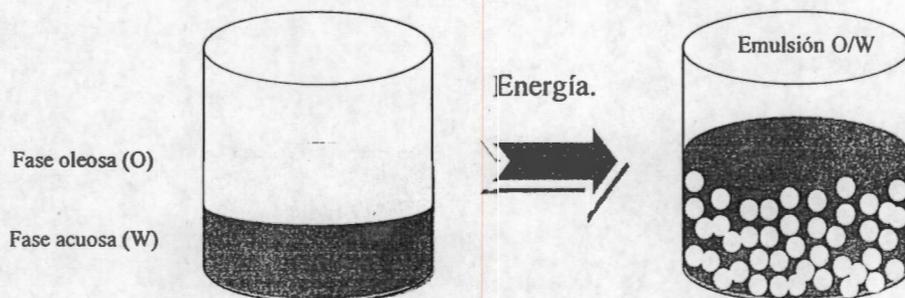


Figura 3. Preparación de una emulsión simple O/W.

La intensidad y duración del proceso depende del tiempo requerido para hidratar y distribuir uniformemente los ingredientes (McClements, 1999). Una adecuada hidratación es importante para la funcionalidad de gran número de componentes alimenticios; por ejemplo, las propiedades emulgentes de las proteínas y los polisacáridos a menudo mejoran cuando éstas son hidratadas por un determinado periodo de tiempo antes de la homogenización (McClements, 1999).

1.1.11 Estabilidad

El término de estabilidad de una emulsión se refiere a la capacidad de la emulsión a resistir cambios en sus propiedades con el tiempo: la emulsión más estable muestra pequeños cambios en sus propiedades con el tiempo (McClements, 1999). En la práctica, hay muchas barreras cinéticas que tienden a prevenir o retardar esta inestabilidad del sistema (Darling y Brikett, 1986). Hasta hace pocos años, la mayoría de los estudios relacionados con emulsiones alimenticias reportaban el uso de emulsionantes de bajo peso molecular (como los ésteres de glicerol, ésteres de sorbitol, sorbitan monolaurato, etc.) para producir la

emulsión simple. Sin embargo, estos sistemas presentan una baja estabilidad cuando la emulsión es sometida a perturbaciones hidrodinámicas, ya que, al deformar los glóbulos de la emulsión, el área interfacial aumenta, promoviendo el rompimiento de la emulsión. Actualmente, se ha conseguido obtener emulsiones de mayor estabilidad, reemplazando el emulsionante hidrosoluble de bajo peso molecular por biopolímeros con actividad superficial. Estos últimos se adsorben en la interfase aceite-agua, estabilizando los glóbulos de la emulsión mediante potenciales de repulsión estéricos y/o electrostáticos (McClements, 1999; Dickinson y McClements, 1996).

La formación de capas múltiples de biopolímeros en la fase externa de las emulsiones puede ayudar a incrementar la estabilidad de los sistemas; tales son los casos de: quitosano-goma de mezquite (Pérez-Orozco y col., 2004), proteína de suero de leche-carragenina (Weinbreck y col., 2004), goma arábica-goma de mezquite-maltodextrina (Rodríguez-Huezo y col., 2004; Pérez-Alonso y col., 2003), quitosano-alginatos y quitosano-carragenina (Tapia y col., 2004), carragenina- β -lactoglobulina (Gu y col., 2004), lecitina-quitosano-pectina (Ogawa y col., 2004), lecitina-quitosano (Ogawa y col., 2003); β -lactoglobulina-pectina (Moreau y col., 2003), proteína-goma arábica (Ibanoglu, 2002); por mencionar algunos. Además, las emulsiones finales muestran un efecto significativo en la protección de las sustancias activas, en algunos casos, a valores bajos de pH y temperaturas extremas. Lo anterior implica que, bajo ciertas condiciones de relación biopolímero-emulsionante o biopolímero-biopolímero, pH, fuerza iónica, se pueden producir emulsiones cinéticamente estables (metaestables). Asimismo, el uso de matrices polielectrolíticas puede ayudar a inhibir la oxidación de las sustancias contenidas en su interior. Cuando los glóbulos de la emulsión tienen carga positiva, son menos susceptibles a la desestabilización por cationes multivalentes, como el calcio o el hierro (Ogawa y col., 2003; Silvestre y col., 1999).

1.1.12 Mecanismos de inestabilidad de emulsiones simples

Los principales mecanismos de inestabilidad en emulsiones simples son (Figura 4):

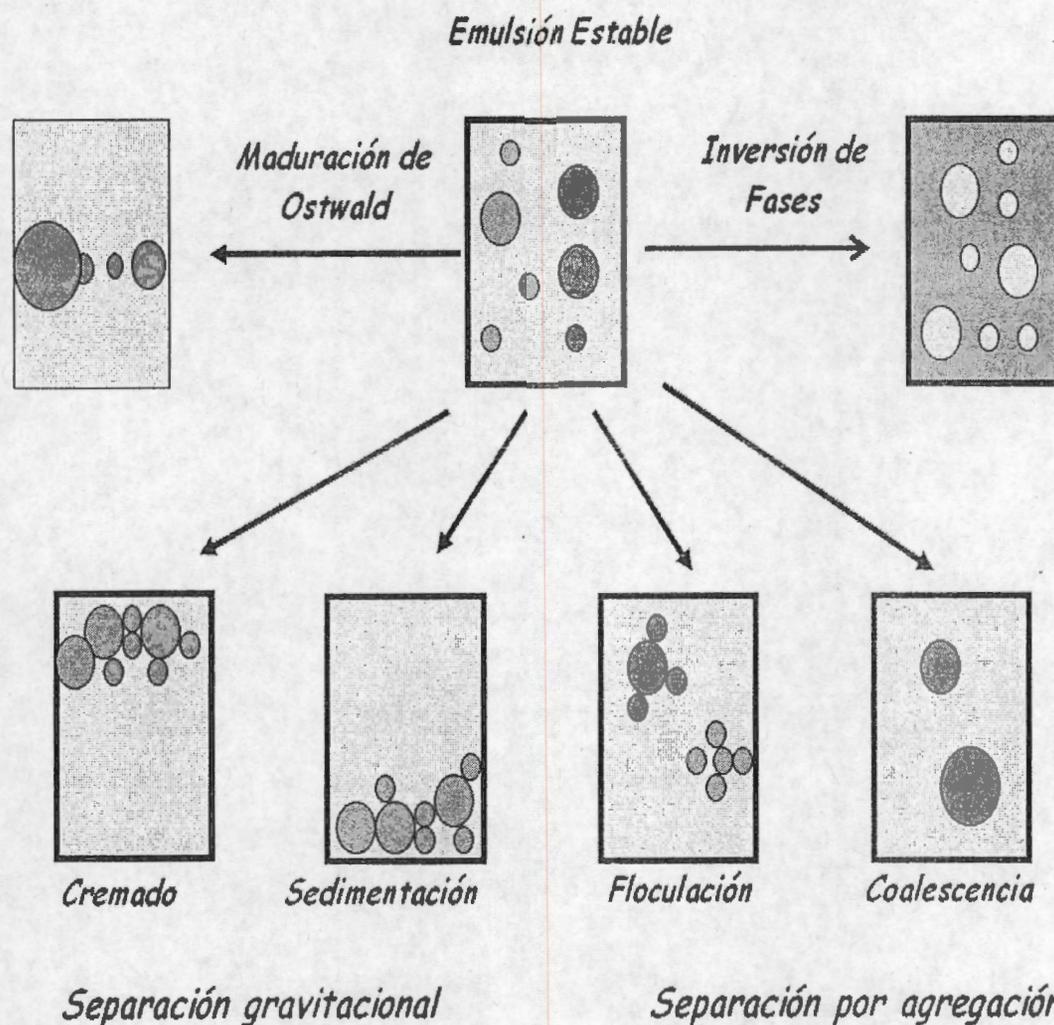


Figura 4. Principales mecanismos de inestabilidad en emulsiones simples (McClements, 1999).

- La *sedimentación* y el *cremado* son dos formas de separación gravitatorias. El *cremado* describe el movimiento de los glóbulos de la emulsión hacia la parte superior del sistema, debido a que la densidad de la fase dispersa es menor a la de la fase continua, mientras que en la *sedimentación* ocurre un proceso inverso. Ambos procesos son

reversibles y en ninguna de las dos situaciones pierden su individualidad los glóbulos de la emulsión, por lo que la distribución y el tamaño de los glóbulos no cambia con el tiempo (Damodaran, 2005; McClements, 1999; Dickinson, 1992).

- La *floculación* ocurre cuando dos o más glóbulos se agregan sin que éstos pierdan su individualidad. La agregación es originada por una fuerza de atracción neta interpartícula. La estructura de los flóculos depende de la magnitud de la fuerza atractiva entre los glóbulos y la fracción volumen de aceite (Damodaran, 2005). La floculación es un proceso de agregación reversible, el cual suele ser el mecanismo posterior al cremado y/o la sedimentación y el paso anterior a la coalescencia (McClements, 1999).
- La *coalescencia* se refiere a la combinación de dos o más glóbulos para formar un glóbulo más grande (McClements, 1999). Para que el fenómeno ocurra, los glóbulos de la emulsión deben encontrarse muy cerca uno del otro, por lo que la coalescencia generalmente ocurre en emulsiones cremadas, sedimentadas o floculadas (Damodaran, 2005); es un proceso irreversible y está descrito por el incremento lineal en el logaritmo del diámetro promedio de los glóbulos de la emulsión en función del tiempo (Sherman, 1968). La coalescencia puede ser menos probable en (Fennema, 1982): *i*) glóbulos más pequeños, *ii*) en emulsiones con películas interfaciales gruesas, y *iii*) no disminuir tanto la tensión interfacial.
- La *inversión de fases* es el proceso mediante el cual una emulsión W/O se convierte en una emulsión O/W, o viceversa. En sistemas alimenticios el proceso de inversión de fases generalmente no ocurre espontáneamente (Dickinson, 1992), pero puede ser promovida por factores como la temperatura, los cambios en la formulación del sistema o los efectos de tipo mecánico (McClements, 1999).
- La *maduración de Ostwald* es el crecimiento de los glóbulos más grandes a expensas de los más pequeños (los cuales eventualmente desaparecen), ocasionado por la difusión de

la fase dispersa de los glóbulos pequeños (que se solubiliza en el medio) a los más grandes (Dickinson, 1992; Walstra 1986). Generalmente, este tipo de inestabilidad no suele en emulsiones O/W por que las grasas constituidas por triglicéridos, que son habitualmente usadas, son insolubles en agua (Fennema 1982).

1.2 Interacción entre macromoléculas

El estudio de las interacciones entre biopolímeros tiene una gran relevancia para muchos sistemas biológicos, farmacéuticos y alimenticios (Weinbreck y col., 2003). Las interacciones entre macromoléculas son variadas, estas pueden ser: débiles o fuertes, específicas o no específicas, atractivas o repulsivas (Dickinson, 1993). Dichas interacciones son determinadas por las características fisicoquímicas de cada biopolímero (densidad de carga y masa molar), su concentración, relación y condiciones de disolución (pH, fuerza iónica y tipo de iones) (Mekhloufi y col., 2005; Schmitt y col., 2005; Xing y col., 2004; Weinbreck y col., 2003).

La formación de complejos intermoleculares se lleva acabo espontáneamente cuando el cambio total de energía libre de Gibbs (ΔG) disminuye. El valor de ΔG es determinado por un delicado equilibrio entre las contribuciones entrópicas favorables ($-T\Delta S$) y las contribuciones entálpicas no favorables, y por tanto, existe la posibilidad o no de los biopolímeros para formar un complejo (Turgeon y col., 2007). Las contribuciones entrópicas favorables incluyen principalmente la liberación de contraiones (de Kruif y col., 2004, Laugel y col., 2006) y de moléculas de agua (Jelesarov y Bosshard, 1999). Las contribuciones entálpicas no favorables provienen de la disminución de la movilidad de los biopolímeros y a interacciones no covalentes en la interfase de los complejos (Jelesarov y Bosshard, 1999). Debido a la complejidad de las estructuras y la delicadeza de los procesos involucrados es difícil estimar ambas contribuciones (Laugel y col., 2006).

La mezcla de dos biopolímeros en solución puede exhibir tres condiciones de equilibrio conocidas como miscibilidad, incompatibilidad termodinámica y formación de complejos (Figura 5).

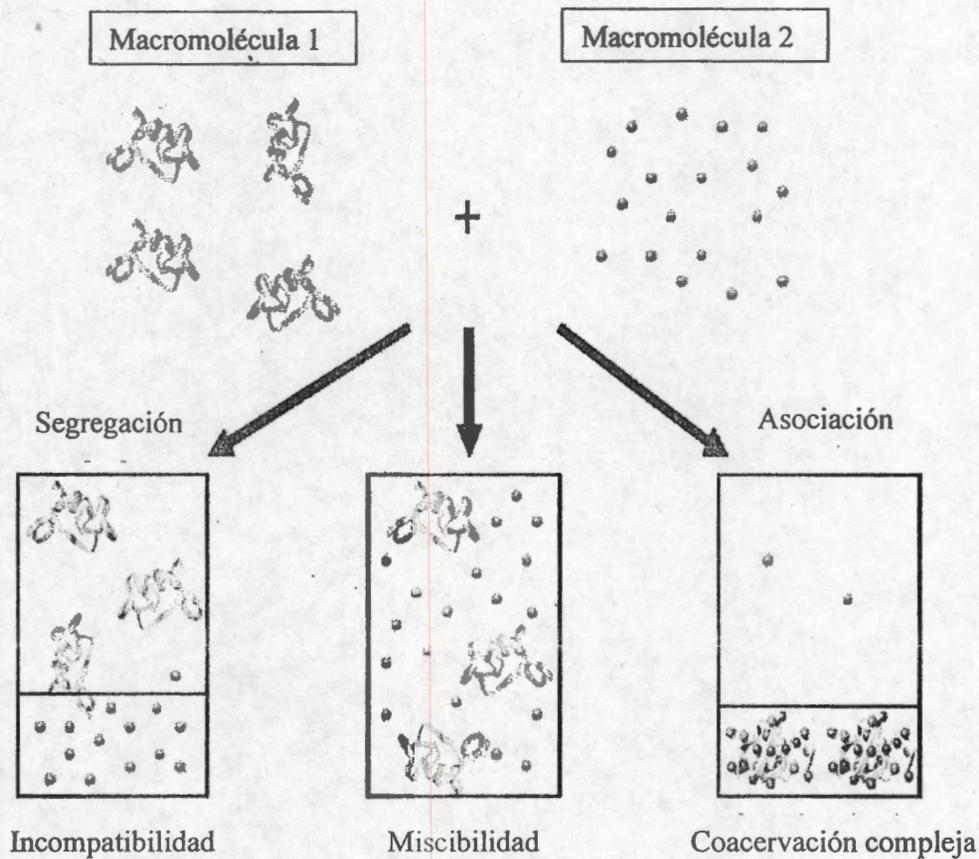


Figura 5. Principales interacciones entre macromoléculas (Weinbreck, 2004).

En soluciones diluidas, cuando las atracciones interbiopolímero son inhibidas, el sistema es estable porque la entropía de mezclado domina y las mezclas de biopolímeros son *miscibles* (Weinbreck, 2004; Tolstoguzov, 2004; Tolstoguzov, 2003; Kruif y Tuinier, 2001). Conforme se incrementan las concentraciones de los biopolímeros y exceden una concentración crítica, estos pueden volverse parcialmente miscibles. La baja entropía de mezclado de las macromoléculas en comparación con la de los monómeros es responsable de su incompatibilidad en un solvente común (Weinbreck, 2004; Tolstoguzov, 2004; Tolstoguzov, 2003; Kruif y Tuinier, 2001). Las fuerzas de repulsión netas entre las dos especies en solución a nivel molecular causan la separación espontánea del sistema en dos

fases distintas, este fenómeno es conocido como *incompatibilidad termodinámica* y comúnmente se exhibe en concentraciones semidiluidas o concentradas de biopolímeros (Dickinson y McClements, 1996). La incompatibilidad termodinámica puede presentarse en mezclas proteína-polisacárido (no iónicos o aniónicos) a un pH por debajo del punto isoelectrico de la proteína (Dickinson, 1993) o en mezclas polisacárido-polisacárido.

Las interacciones atractivas entre biopolímeros pueden ser fuertes o débiles e incluso específicas y no específicas. Un enlace covalente entre una proteína y un polisacárido representa una interacción atractiva específica, fuerte y permanente (Dickinson, 1993). Una interacción atractiva no específica entre biopolímeros presenta un resultado promedio sobre una gran variedad de interacciones químicas específicas individuales entre los grupos de los biopolímeros: iónico, dipolar, van der Waals, puentes de hidrogeno, hidrófobas, electrostáticas, entre otras (Dickinson, 1993). Las interacciones atractivas entre dos biopolímeros pueden manifestarse físicamente de varias formas (Walstra, 2003): *i*) formación de pequeños complejos solubles, manifestándose en soluciones turbias, *ii*) formación de un gel débil homogéneo, si las interacciones son débiles, y *iii*) precipitación de ambos biopolímeros, si las interacciones son fuertes. Los complejos solubles se forman cuando uno de los biopolímeros se encuentra en exceso y existen bajas concentraciones relativas en la solución (concentraciones menores al 1% p/p) (Tolstoguzov, 2003, 2002). En la formación de complejos insolubles (precipitación), existe una mutua neutralización entre los grupos ionizables de ambas macromoléculas, lo que provoca una disminución de la carga neta del sistema, reduciendo las zonas hidrófilas de las macromoléculas, mientras que sus partes hidrófobas se compactan. Estos arreglos intermoleculares provocan una separación de la solución en dos fases conocido como *coacervación compleja* (Weinbreck, 2004; Tolstoguzov, 2004, 2003; Kruif y Tuinier, 2001). De Kruif y col., (2004) proponen que si uno de los polímeros es un polielectrolito fuerte se forma un precipitado (complejos elásticos) en lugar de un coacervado (complejos viscosos).

1.2.1 Coacervación

La interacción entre biopolímeros opuestamente cargados fue observada por Tiebackx en 1911; mezclando una solución de gelatina y goma arábiga en ácido acético, él observó la opalescencia o precipitación del sistema (Weinbreck, 2004). Este fenómeno de separación de fases del sistema gelatina/goma arábiga fue extensamente estudiado por Bungenberg de Jong y Kruyt entre los años 1920 y 1940. La palabra coacervación, introducida por Bungenberg de Jong y Kruyt, proviene del latín “*coacervatus*”, del pasado participio de “*coacervare*” (amontonarse), lo que significa que precede la unión de partículas coloidales (Sanchez y col., 2002; Menger y Sykes, 1998). IUPAC define a la coacervación como la separación en dos fases líquidas en sistemas coloidales, la fase más concentrada en coloides es conocida como “fase coacervada” y la otra fase se le conoce como “fase en equilibrio”. En general, el fenómeno es dividido en coacervación simple y coacervación compleja.

La *coacervación simple* involucra el uso de una sola macromolécula, empleando un mal solvente de la macromolécula o una sal. La *coacervación compleja* involucra el uso de dos biopolímeros de carga opuesta. La coacervación compleja de dos polielectrolitos ocurre especialmente a fuerzas iónicas relativamente bajas ($< 0.2 \text{ M}$) (Walstra, 2003). La densidad de los complejos electrostáticos suele ser diferente a la del medio que los rodea, por lo que forman una fase separada en la superficie o en el fondo del sistema (Bryant y McClements, 2000). Asimismo, la viscosidad de los sistemas coacervados suelen ser entre 40 y 100 veces mayor, por lo que las estructuras generadas exhiben mayores propiedades viscoelásticas, las cuales pueden ayudar a retardar los procesos de inestabilidad de las emulsiones.

La coacervación tiene aplicaciones en los campos de la química, biotecnología y los alimentos, tales como: papel copiator sin carbón (Green y Schleicher, 1956), sustitución de grasas (Bakker y col., 1994), separación de proteínas (Zhao y col., 2005; Jensen y col., 2000; Wang y col., 1996), microencapsulación (Yu y Toh, 2006; Thimma y Tammishetti, 2003; Lamprecht y col., 2001; Thomasin y col., 1998), cosméticos (Beerse y Smith, 2001a, 2001b), alimentos funcionales (Strauss y Gibson, 2003; Gouin y col., 2003) e inmovilización de enzimas (Onishi y col., 2002), por mencionar algunas.

Weinbreck y col. (2004), Weinbreck y col. (2003) y Kaibara y col. (2000) observaron que las formaciones de complejos electrostáticos insolubles fueron inducidas a valores de pH específicos (pH_{crit} y pH_{ϕ}). La formación de complejos solubles fue iniciada a un pH_{crit} caracterizado por un ligero incremento de las propiedades ópticas del sistema (turbidez y dispersión de luz). La formación de complejos insolubles fue caracterizada por un abrupto incremento de las propiedades ópticas, así como la disminución de la carga neta del sistema conforme el pH se incrementaba. La aparición de complejos aglomerados fue observada a un pH_{ϕ} específico del sistema. La adición de NaCl a los sistemas originó un decremento en el rendimiento de los complejos, el cual fue asociado al apantallamiento de los grupos ionizables de las macromoléculas, repercutiendo en el desplazamiento del pH_{ϕ} . La independencia de la temperatura del pH_{crit} y pH_{ϕ} sugiere que las contribuciones hidrofóbicas son despreciables en el proceso de coacervación. Sanchez y col. (2002) observaron que la velocidad de sedimentación de los coacervados se encuentra íntimamente ligada a la concentración relativa de los biopolímeros en solución. Relaciones de biopolímeros no estequiométricas originan la formación de complejos electrostáticos solubles; bajo estas condiciones, los complejos sedimentan muy lentamente. Relaciones de biopolímeros estequiométricamente balanceadas originan sistemas altamente inestables, incrementando la velocidad de sedimentación de los complejos. Laneuville y col., (2000) observaron la influencia de la relación proteína-polisacárido (Pr:Ps) en el tamaño de los complejos suero de leche-goma xantana, bajas relaciones Pr:Ps (5:1 y 10:1) produjeron principalmente complejos de tamaño pequeño (40% fueron $< 20 \mu\text{m}^2$), mientras que a altas relaciones (15:1 y 20:1) 40-44% de las partículas fueron $> 300 \mu\text{m}^2$.

Varios estudios han demostrado la formación de complejos electrostáticos de mezclas proteína-polisacárido a pH por encima de su punto isoeléctrico de las proteínas. Dichas interacciones, pueden ser modificadas por cambios en el pH, la fuerza iónica y la temperatura, así como la relación de biopolímeros, la concentración total de biopolímeros, la densidad de carga y la rigidez de los polielectrolitos (Wang y col., 2007; Mathieu y col., 2006; Bohidar y col., 2005; Desai y Park, 2005; Mekhloufi y col., 2005; Schmitt y col.,

2005; Weinbreck y col., 2004; Weinbreck y col., 2004; Thimma y Tammishetti, 2003; Walstra, 2003; Weinbreck y col., 2003; Girard y col., 2003; Girard y col., 2002; Sanchez y col., 2002; Schmitt y col., 2001; Kaibara y col., 2000; Burgess, 1990). En la tabla 1 se muestra una revisión de los sistemas comúnmente estudiados, así como las diferentes técnicas de caracterización de los complejos electrostáticos.

Tabla 1. Estudios sobre sistemas coacervados.

Referencia	Sistema	Técnicas experimentales	Parámetros
(Burgess, 1990)	Gelatina-goma arábiga y albúmina de suero de bovino- goma arábiga.	Movilidad electroforética. Rendimiento de coacervado.	pH, fuerza iónica, CTB y tiempo
(Kaibara y col., 2000)	Albúmina de suero de bovino- poli(cloruro de dialildimetil amonio).	Microscopía de contraste de fases, DLS y turbidimetría.	pH, temperatura y fuerza iónica
(Laneuville y col., 2000)	Proteína lactosuero - goma xantana	Composición, microscopía óptica y viscosimetría.	Relación Pr:Ps
(Schmitt y col., 2001)	β -lactoglobulina- goma arábiga.	Microscopía confocal de barrido laser y espectroscopía de difusión de onda.	Relación Pr:Ps, CTB y pH.
(Girard y col., 2002)	β -lactoglobulina- pectin (bajo y alto metoxilo).	Titulaciones, potenciométricas, Rendimiento de coacervado por centrifugación.	Relación Pr:Ps, pH, fuerza iónica y temperatura
(Sanchez y col., 2002)	β -lactoglobulina-goma acacia.	Microscopía confocal laser y dispersión de luz estática de bajo ángulo.	pH = 4.2, relación Pr:Ps = 1 y 2. Efecto del tiempo.
(Shumilina y Shchipunov, 2002)	Quitosano-carragenina.	Reología.	Tipo de carragenina y temperatura.
(Girard y col., 2003)	β -lactoglobulina-pectina.	ITC.	Relación Pr:Ps y tiempo.

Continuación tabla 1. Estudios sobre sistemas coacervados.

Thimma y Tammishetti, (2003)	Carboximetil goma guar – gelatina.	Rendimiento de coacervado y turbidimetría.	pH, composición y CTB.
Weinbreck y col., (2003)	Proteína lactosuero – goma arábica.	Turbidimetría, DLS y conductividad.	pH y fuerza iónica.
Nordby y col., (2003)	Pectina-quitosano.	Reología.	Temperatura y relación Pr:Ps.
Weinbreck y col., (2004)	Proteína de lactosuero-carragenina.	Turbidimetría de titulación y conductividad.	pH, fuerza iónica, temperatura y CTB.
Weinbreck y col., (2004)	Proteína de lactosuero-goma arábica.	Difracción de rayos X de bajo ángulo y HPLC.	pH, fuerza iónica y relación Pr:Ps.
Bohidar y col., (2005)	Albúmina de suero de bovino – poli(cloruro de dialildimetil amonio).	DLS y Reología.	pH, fuerza iónica, relación Pr:Ps y tiempo de envejecimiento.
Mekhloufi y col., (2005)	β -lactoglobulina- goma acacia	Dispersión de luz dinámica, movilidad electroforética, turbidimetría y microscopía de contraste de fases.	pH
Schmitt y col., (2005)	β -lactoglobulina- goma acacia	ITC, DLS y tensión superficial, viscosidad superficial.	pH=4.2. Relación Pr:Ps (2:1)
Mathieu y col., (2006)	Gelatina-ácido poli-acrílico	Rendimiento de coacervación, turbidimetría.	pH, fuerza iónica, temperatura y CTB
Sanchez y col., (2006)	β -lactoglobulina y goma acacia:	Dispersión de luz estática de ángulo pequeño y turbidimetría.	Nucleación como función del pH para concentración total del 0.1 % (p/p), relación 2:1 Pr:Ps.
Yu y col., (2006)	Quitosano-ovalbúmina	Potencial Z, DLS, microscopía de transmisión y fluorescencia.	pH, tiempo y relación Pr:Ps.
Santinath y col., (2007)	Agar-gelatina	Dispersión de neutrones de bajo ángulo, DSC y Reología.	Fuerza iónica.
Wang y col., (2007)	β -lactoglobulina-pectina	Reología.	Fuerza iónica y relación Pr:Ps.

Dispersión de luz dinámica (DLS), cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), calorimetría isotérmica de titulación (ITC).

Son pocos los trabajos que exhiben interacciones atractivas entre mezclas de polisacáridos, y aún menor el número de estudios de formación de complejos insolubles polisacárido-polisacárido. Khouryieh y col. (2007) observaron sinergia en las interacciones de soluciones diluidas de mezclas de goma guar-xantana y mezclas desacetiladas xantana-guar. Este último sistema exhibía una sinergia más fuerte debido a la desestabilizada estructura helicoidal y al incremento de la flexibilidad de las cadenas de la goma xantana desacetilada. Ruíz-Ramos y col. (2006) y Pérez-Orozco y col. (2004) realizaron estudios de mezclas goma de mezquite-quitosano. Ellos observaron un incremento de las propiedades reológicas del sistema, debido a la formación de complejos solubles. Nordby y col. (2003) estudiaron las interacciones asociativas entre la pectina y el quitosano. Las mezclas de ambos biopolímeros mostraron la formación de geles termorreversibles en un amplio intervalo de concentraciones. La ausencia de coacervación en el sistema pectina-quitosano sugiere débiles interacciones asociativas entre los biopolímeros, probablemente resultado de la baja concentración de biopolímeros usada (1% p/p). Hugerth y col., (1997) observaron la formación de complejos entre el quitosano y la carragenina. La formación de los complejos fue gobernada por la densidad de carga de los biopolímeros, pero el tipo de complejos (estequiométrico o no estequiométrico) depende más de la conformación de las moléculas en solución. Shumilina y Shchipunov (2002) desarrollaron geles a partir de complejos electrostáticos solubles quitosano-carragenina. Los geles obtenidos resultaron ser sensibles a la temperatura debido a las transiciones moleculares asociadas a la molécula de carragenina. Las propiedades reológicas del sistema se incrementaron con el tipo de carragenina usada ($\lambda > \iota > \kappa$).

1.2.1.1 Goma arábiga

La goma de acacia es un exudado en forma de lágrima que producen los árboles del género *Acacia spp.* Distintas especies de acacia producen distintas gommas arábicas, su composición química varía ligeramente dependiendo del origen, clima, temporada, edad del árbol, etc. (Williams y Phillips, 2000). La goma arábiga comercial por excelencia es aquella exudada por la *Acacia senegal*. Es un polielectrolito de carga negativa ampliamente usado en las

industrias farmacéutica, cosmética y de los alimentos, debido a sus propiedades fisicoquímicas y funcionales. En la naturaleza, es una sal neutra o ligeramente ácida de un polisacárido complejo que contiene iones de calcio, magnesio, sodio y potasio (Krochta y col., 1994; Williams y Phillips, 2000). Es una arabinogalactana compuesta por tres distintas fracciones con diferentes contenidos de proteína y diferentes pesos moleculares (Osman y col., 1993; Weinbreck, y col., 2004). La Figura 6 muestra la posible estructura de la goma arábiga *Acacia senegal*.

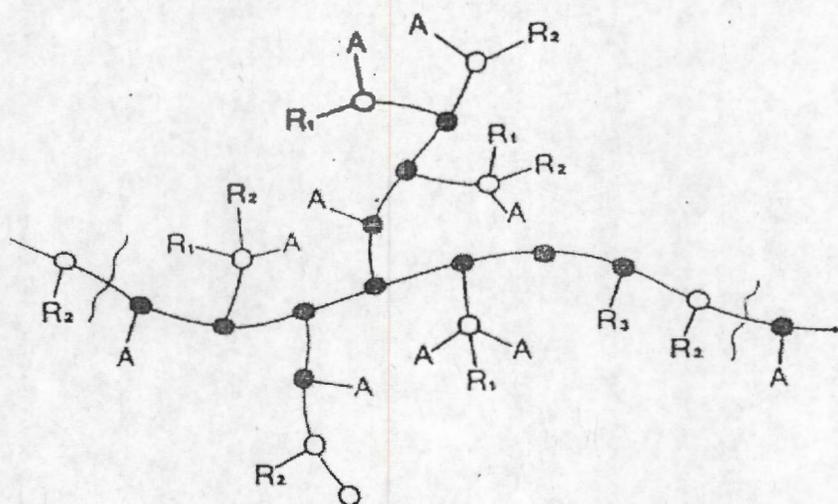


Figura 6. Posible estructura de la goma arábiga *Acacia senegal* (Williams y Phillips, 2000).

Donde A = arabinosa; círculos negros (●) = 3-galactosa; círculos abiertos (○) = 6-galactosa (galactosa o ácido glucurónico unidos o en grupo terminal); R₁ = ramnosa-ácido glucurónico; R₂ = galactosa-3arabinosa; R₃ = arabinosa-3arabinosa-3arabinosa.

Su peso molecular se encuentra alrededor de los 400–600 KDa. Su composición química revela la presencia de una cadena principal de galactana con ramificaciones de galactosa/arabinosa. La parte carbonada está compuesta por D-galactosa (~40–44%), L-arabinosa (~ 24–27 %), L-ramnosa (~13%) y dos ácidos urónicos, responsables del carácter polianiónico de la goma, los ácidos D-glucurónico (~14.5–20%) y 4-O-metil-D-

glucurónico (~2%), además de un componente proteico (~2%) que es parte integral de la estructura de la goma (Williams y Phillips, 2000; Weinbreck y col., 2003). La hidroxiprolina, serina y prolina (de carácter aniónico) son los más abundantes amino ácidos presentes en la goma arábiga (Garti y Leser, 2001; Williams y Phillips, 2000).

Es altamente soluble en agua en un amplio intervalo de pHs. Pueden prepararse soluciones acuosas por arriba del 50 % p/p. Las soluciones de goma arábiga poseen baja viscosidad a altas concentraciones, además ofrece buenas propiedades emulsionantes y encapsulantes (Krochta y col., 1994; McNamee y col., 1998; McNamee y col., 2001). Es insoluble en alcohol y la mayoría de los solventes orgánicos. Se ha sugerido que en la interfase aceite-agua el polisacárido adopta una estructura tipo “retoño de flor” (wattle blossom), con un número de unidades polisacáridas unidas a una cadena polipeptídica común (Figura 7) (Weinbreck y col., 2003; Islam y col., 1997).

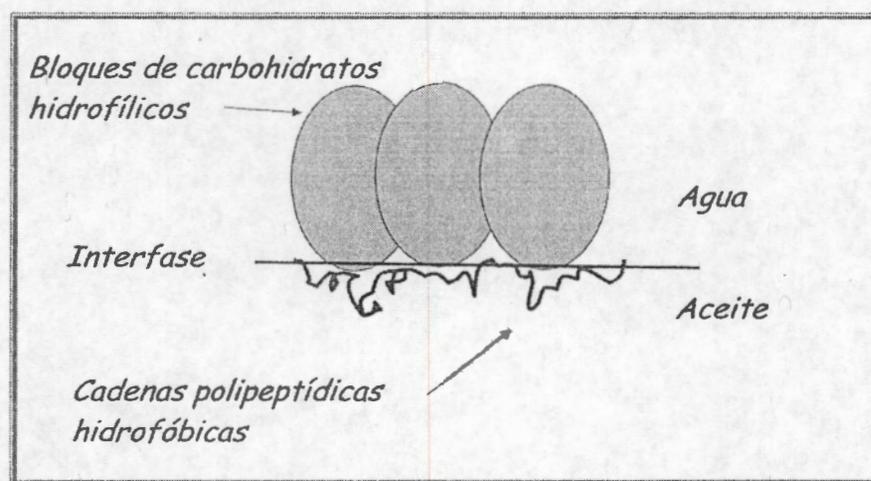


Figura 7. Ilustración de la estabilización de glóbulos de aceite por las moléculas de goma arábiga (Williams y Phillips, 2000).

Esta característica es la responsable de sus buenas propiedades superficiales y su habilidad de formar películas viscoelásticas (Garti y Reichman, 1993). La molécula de goma arábiga es algo globular, pero su estructura se puede expandir, siendo posible la existencia de

formas de espiral (hasta cierto grado), dependiendo de la cantidad de iones disociados de los ácidos urónicos o de sus sales. En su forma normal de sal cerca del pH neutro, sus grupos carboxilos pueden exhibir una gran disociación, resultando en repulsiones Coulombicas de los grupos carboxilos negativamente cargados, los cuales pueden ocasionar que la molécula adopte una estructura expandida, abierta y altamente cargada (Whistler, 1993).

1.2.1.2 Quitosano

El quitosano (Q) es obtenido por la n-desacetilación de la quitina (segundo polisacárido más abundante del planeta). La desacetilación se lleva a cabo en soluciones concentradas de hidróxido de sodio o potasio (30 a 60 %w/v) con temperaturas de reacción de 80 a 140 °C hasta por 10 h. Estos tres parámetros influyen en el grado de desacetilación, peso molecular, distribución de peso molecular, así como la distribución de unidades desacetiladas a lo largo de la cadena de polisacárido (Synowiecki y Al-Khateeb, 2003). La estructura del quitosano consiste en residuos de 2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranososa y 2-amino-2-desoxi-β-D-glucopiranososa; este último es el responsable de su carácter catiónico a valores de pH ácidos (Figura 8).

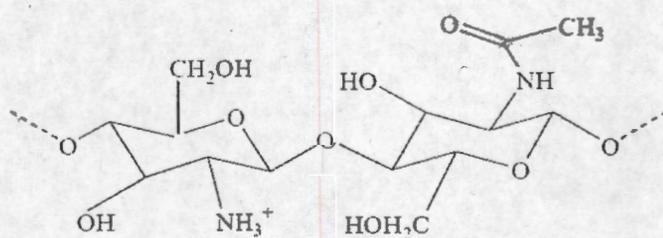


Figura 8. Estructura química del quitosano (Hudson y Jenkins, 2002).

Esta característica permite la formación de complejos electrostáticos con polímeros aniónicos dando lugar a nuevos tipos de estructuras y características fisicoquímicas.

(Tharanathan y Kittur, 2003). Las propiedades del quitosano en solución dependen de su peso molecular, grado de acetilación, pH y fuerza iónica (Wei y Hudson, 1993; Claesson y Ninhami, 1992). Moléculas de quitosano con un alto grado de desacetilación los segmentos de glucosamina tiene un valor de pK_a de 6.5, por lo que requiere de pH menores a 6 para su completa disolución. Sin embargo, con el incremento de grupos acetilo, el pK_a de la macromolécula se incrementa a valores cercanos a 7.5 (Klinkesorn y col., 2005; Hudson y Jenkins, 2002). El quitosano no es soluble en soluciones de ácidos dipróticos como el ácido sulfúrico; los aniones sulfatos divalentes facilitan las atracciones iónicas intercadena, entrecruzando las macromoléculas previniendo su disolución (Hudson y Jenkins, 2002).

Las muestras comerciales de quitosano tiene un peso molecular de aproximadamente 400KDa (Hudson y Jenkins, 2002). A bajo pH y fuerza iónica, la viscosidad intrínseca se incrementa rápidamente, debido a fuertes repulsiones segmento-segundo, adoptando una conformación extendida (Claesson y Ninhami, 1992). El uso del quitosano en las industrias farmacéutica, de cosméticos y de los alimentos es prometedora debido a su biocompatibilidad y su no toxicidad (Kim y col., 2006; Synowiecki y Al-Khateeb, 2003; Tharanathan y Kittur, 2003).

1.3 Microencapsulación

La microencapsulación puede ser usada para proteger materiales reactivos del medio ambiente, proveer una liberación controlada y/o sostenida de los materiales, según la aplicación, como medio para convertir sustancias líquidas en sólidos manipulables, enmascarar sabores y aromas indeseados o para modificar las propiedades físicas de algunas sustancias (Yeo y col., 2005; Shahidi y Han, 1993; Li y col., 1988).

La microencapsulación por coacervación compleja involucra la separación de una dispersión coloidal en una fracción rica en coloide y otra fracción pobre en coloide, a partir del control cuidadoso de la temperatura, pH, adición de electrolitos o agentes que pueden modificar la afinidad al solvente (Xing y col., 2004). La solidificación de la matriz es realizada usualmente por métodos de entrecruzado o remoción de la fase continua. Las

microcápsulas generadas son recolectadas, por filtración o centrifugación, lavadas con el solvente apropiado y subsecuentemente secadas por aspersión o lecho fluidizado con la finalidad de obtener un sistema manipulable (Shahidi y Han, 1993). Asimismo, los sistemas coacervados pueden proporcionar una matriz densa y robusta, la cual permite retardar los procesos de difusión de la sustancia encapsulada a través de los poros de la matriz. La densidad de la matriz puede ser afectada por varios factores, como: peso molecular, concentración de los biopolímeros, carga de los biopolímeros, pH del medio en el que se van a disolver las microcápsulas y el grado de interacción entre los biopolímeros (Ko y col., 2003). Las microcápsulas obtenidas mediante esta tecnología suelen exhibir diámetros promedio entre 4 μm hasta 70 μm , alta eficiencia de encapsulación ($\sim 90\%$), buena dispersión y morfología (Xing y col., 2004), además de reducir las pérdidas por volatilización y proteger a las sustancias encapsuladas contra la oxidación (Pedroza-Islas y col., 2000).

Debido a la naturaleza hidrosoluble de los biopolímeros, si el principio activo que se desea encapsular es de naturaleza lipídica, es imprescindible formular una emulsión simple aceite-en-agua. Sin embargo, en ocasiones la optimización de la concentración de material de barrera en el proceso de formación de la emulsión y el proceso de coacervación suele ser un obstáculo importante, ya que la concentración necesaria para obtener una emulsión estable puede ser diferente a la necesaria para aumentar el rendimiento de microencapsulación (Madene y col., 2006).

La coacervación compleja de gelatina con goma arábica es uno de los sistemas de mayor aplicación (Hoagland, 2001a). El proceso consiste en la dispersión de un material insoluble en una solución de gelatina. Posteriormente, se agrega una dispersión de goma arábica a esta emulsión, el pH de la fase acuosa es ajustado entre 4.0-4.5. Esto ocasiona la coacervación compleja entre la gelatina y la goma arábica. El sistema es enfriado a 10°C para producir un gel. Después el gel coacervado comúnmente es entrecruzado químicamente con glutaraldehído. Las cápsulas coacervadas entrecruzadas contienen una

gran cantidad de agua, pero pueden ser secadas por aspersion o en un secador de lecho fluidizado. El tamaño de las cápsulas se encuentra en un intervalo entre 20 a 1000 micras, pero pueden prepararse cápsulas fuera de este intervalo. Las eficiencias del proceso se encuentran alrededor del 80 al 95% (Hoagland, 2001a).

Yeo y col., (2005) encapsularon aceites esenciales a partir de la coacervación compleja gelatina-goma arábica. Las microcápsulas producidas exhibieron buena eficiencia de retención (almacenas a 4 o -20 °C durante 4 semanas) y liberación del aceite en soluciones de 100 mM de NaCl. Bayomi y col., (1998) prepararon microcápsulas para liberación controlada empleando la técnica de coacervación coloidal. La interacción entre una solución de quitosano diluida en ácido acético y una solución de caseína en 0.5M de hidróxido de sodio fue la base para formar las microesferas. El uso de formaldehído permitió endurecer la superficie de las microesferas. Yoshioka y col., (1990) encapsularon células a partir de la formación de complejos iónicos interpoliméricos de caboximetilcelulosa-quitosano. Daly y Knorr (1988) y Wang y col., (2001) desarrollaron microcápsulas a partir de mezclas quitosano-alginato y observaron un incremento en la dureza de la cápsula mediante la incorporación de CaCl_2 . Sin embargo, la microencapsulación por coacervación suele ser un proceso complejo y costoso, estos hechos aunados con el uso de agentes entrecruzantes no legislados en algunos países como el glutaraldehído son algunos de los inconvenientes asociados al proceso (Madene y col., 2006; Desai y Park, 2005; Sanchez y Renard, 2002a).

1.3.1 Secado por aspersion

El secado por aspersion es el método de encapsulación más antiguo. En los años 30's se utilizó por primera vez para encapsular sabores empleando goma arábica como material de pared (Shahidi y Han, 1993). Es utilizado frecuentemente en la industria alimentaria, debido a que emplea una tecnología simple, relativamente económica y versátil (Hoagland, 2001a; Shahidi y Han, 1993).

El proceso consiste en asperjar una mezcla de la sustancia activa y el material de barrera en una cámara con aire caliente en movimiento en donde ocurre una rápida evaporación del disolvente produciendo las microcápsulas (Hoagland, 2001a). El primer paso en la microencapsulación por secado por aspersión consiste en la adecuada selección del material de barrera. Estos materiales deben poseer buenas propiedades emulsionantes, tener la capacidad de formar una buena película, exhibir baja viscosidad a altas concentraciones (< 500 cP a >45% de sólidos), mostrar baja higroscopicidad, liberar las sustancias en el momento y lugar adecuados, tener un bajo costo, proporcionar estabilidad y brindar buena protección a las sustancias encapsuladas contra agentes externos (Madene y col., 2006; Hogan y col., 2001; Shahidi y Han, 1993). Los materiales de barrera más utilizados son la goma arábiga, maltodextrinas, algodones modificados o mezclas de ellos (Desai y Park, 2005; Ré, 1998). Otros polisacáridos (alginato, carboximetilcelulosa, goma de guar) y proteínas (proteínas del suero, proteínas de soja, caseinato de sodio) puede utilizarse como material de la pared en el secado por aspersión, pero su uso se vuelve muy tedioso y costoso debido a su baja solubilidad en agua (Desai y Park, 2005; Ré, 1998). El tipo de material de barrera influirá en la estabilidad de la emulsión, en el tamaño de partícula, en las propiedades de flujo, en las mecánicas y en la vida útil del material deshidratado (Risch, 1995; Ré, 1998).

El segundo paso es dispersar la sustancia activa en el material de barrera (Hoagland, 2001a). La sustancia activa suele ser hidrófoba, por lo que se parte de una emulsión estable que contribuya a la retención eficiente del principio activo (Madene y col., 2006; Hoagland 2001a). La cantidad de biopolímero necesaria para obtener microencapsulados estables suele ser mayor a la requerida para obtener una emulsión estable (Pedroza-Islas y col., 2000). Generalmente se busca que la emulsión tenga un tamaño de glóbulo entre 1-3 μm , con la finalidad de minimizar el aceite libre en la superficie de las microcápsulas secas (Hoagland, 2001a). Las microcápsulas producidas suelen tener un tamaño entre 10 -40 μm , las cuales pueden encontrarse solas o en agregados mostrando geometrías desde irregulares hasta muy cercanas a la esfericidad (Hoagland, 2001a).

2 Justificación

El diseño de sistemas dispersos alimenticios (emulsiones y microcápsulas) no sólo exige que éstos sean estables, sino que provean un efecto benéfico o funcional. Con base en lo anterior, se busca que el material emulsionado/microencapsulado sea encapsulado eficientemente, protegido contra factores ambientales degenerativos y, cuando sea requerido, liberado bajo condiciones controladas. El cumplimiento de todas estas condiciones es prácticamente imposible utilizando un solo biopolímero como material de barrera. El uso de mezclas binarias de biopolímeros, o incluso de mayor orden, permiten potencializar el efecto funcional de productos comerciales.

La estabilidad de largo plazo de emulsiones está íntimamente ligada a la estructura y conformación de los biopolímeros en la interfase aceite-agua. Las emulsiones que exhiben estabilidad a largo plazo son aquellas que presentan membranas interfaciales fuertes, cuya estabilidad contra la coalescencia de los glóbulos esté gobernada por las propiedades viscoelásticas de las membranas que resisten el efecto de fuerzas disruptivas como lo son esfuerzos cortantes ocasionados por su manipulación. Si bien la goma arábica y el quitosano son polisacáridos capaces de adsorberse en la interfase agua-aceite y proporcionar estabilidad estérica y/o electrostática al sistema, los complejos electrostáticos goma arábica-quitosano también deberían de proporcionar estabilidad al sistema debido al incremento del peso molecular del complejo y al aumento de las propiedades viscoelásticas del sistema.

En este trabajo se busca proporcionar información acerca de las interacciones originadas de mezclas binarias goma arábica-quitosano, para así contribuir a la formulación de productos estables y funcionales.

3 Hipótesis.

Las interacciones atractivas de mezclas de polisacáridos polielectrolitos (goma arábica y quitosano) de carga opuesta, permiten la formación de membranas interfaciales mejor estructuradas que aquellas que se pueden obtener a partir de los biopolímeros individuales, formando sistemas dispersos alimenticios, como emulsiones y microencapsulados con mejores propiedades funcionales y estabilidad.

4 Objetivo

Estudiar los factores que determinan la formación y propiedades de complejos electrostáticos insolubles (coacervados) goma arábica-quitosano y su aplicación en sistemas dispersos.

Objetivos particulares

- Estudiar las interacciones que puedan surgir entre la goma arábica y el quitosano como una función del pH, concentración de NaCl, concentración y proporciones relativas de los biopolímeros.
- Determinar las concentraciones relativas en el equilibrio de los complejos goma arábica-quitosano obtenidos a partir de diferentes concentraciones y proporciones relativas de los biopolímeros empleando las técnicas de cromatografía de líquidos de alta resolución y análisis elemental.
- Caracterizar el complejo goma arábica-quitosano mediante el estudio de sus propiedades reológicas y microestructurales, esta última aplicando microscopía electrónica de barrido.
- Establecer el efecto de la velocidad de agitación y concentración de goma arábica en la estabilidad de emulsiones simples O/W_{GA} .
- Formular una emulsión simple O/W_{GAQ} por coacervación a partir de la adsorción secuencial de los biopolímeros en la interfase aceite-agua.
- Caracterizar las propiedades reológicas de la emulsión simple O/W_{GAQ} estabilizada por los complejos goma arábica-quitosano.
- Obtener sistemas microencapsulados a partir de las emulsiones simples O/W_{GAQ} y O/W_{GA} mediante la técnica de secado por aspersión.
- Estudiar la microestructura de los microencapsulados obtenidos.

5 Materiales y metodología

5.1 Materiales

Quitosano (peso molecular medio, grado de acetilación 21%) proporcionando por Sigma-Aldrich (San Luis, MO, EUA). Goma arábiga (*Acacia senegal*) en lágrima, proporcionada por Industrias Ragar, S.A. de C.V. (D.F., México). Aceite vegetal de canola (grado alimenticio), Alimentos Capullo S., de R.L. de C.V. (México, D.F.). Hidróxido de sodio (NaOH), ácido clorhídrico (HCl), cloruro de sodio (NaCl), glutaraldehído (C₅H₈O₂), etanol grado HPLC (C₂H₆O), acetona (C₃H₆O) y agua grado HPLC (H₂O) fueron obtenidas de J.T. Baker, S.A. de C.V. (Xalostoc, Edo. México, México).

5.2 Metodología

A continuación se describe la metodología experimental, la cual se divide en tres partes: 1) ubicación y caracterización de la fase coacervada; 2) formulación de emulsiones simples por coacervación compleja; y 3) formulación de microencapsulados a partir de las emulsiones simples.

5.3 Caracterización de los complejos goma arábica-quitosano

En esta sección se describe la metodología empleada en la caracterización fisicoquímica del complejo goma arábica-quitosano.

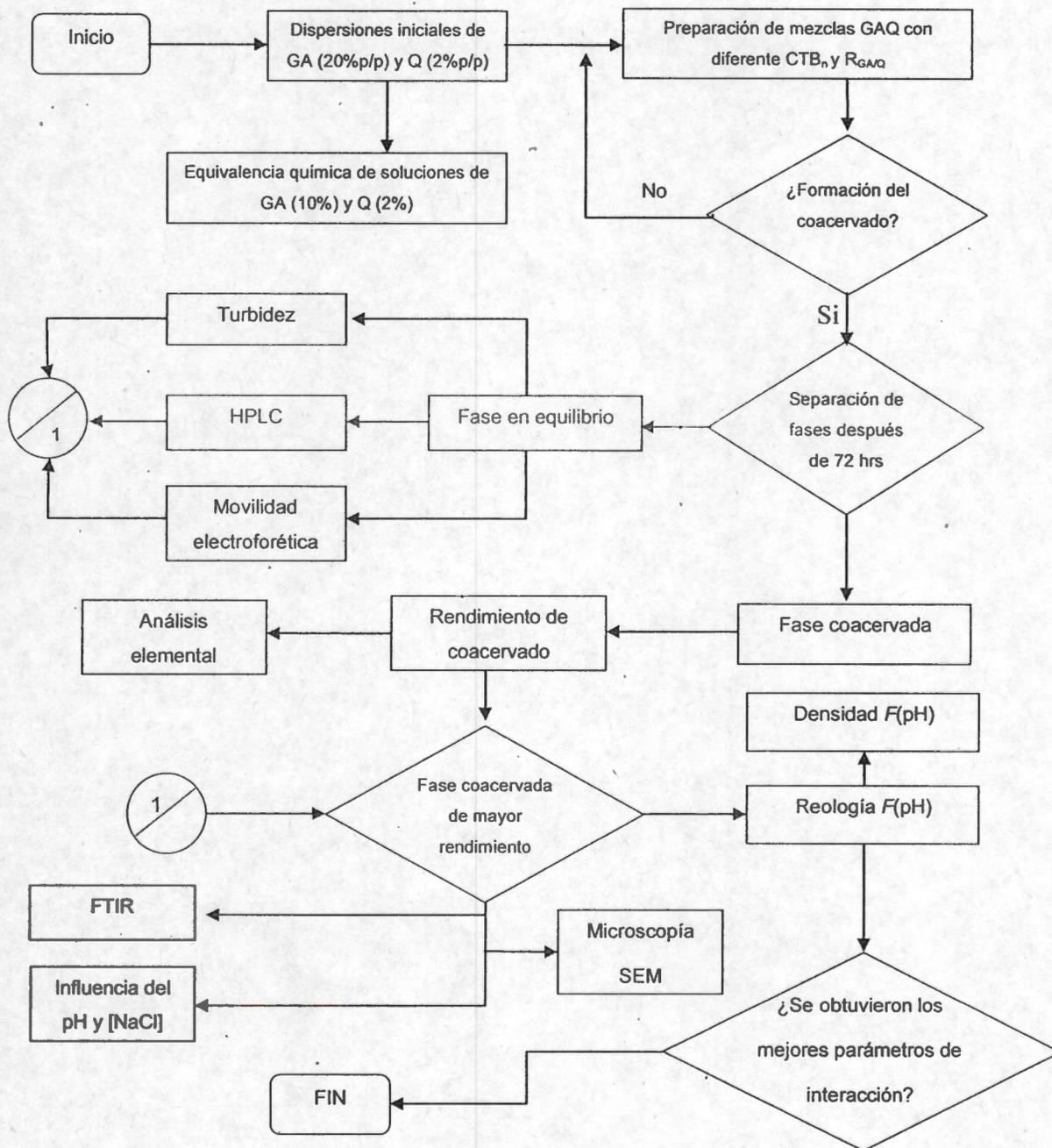


Figura 9. Diagrama de flujo para la caracterización del complejo goma arábica-quitosano.

5.3.1 Preparación de las soluciones

Se prepararon soluciones madre de quitosano y goma arábica al 2 y 20 % en peso, respectivamente. Las soluciones de quitosano fueron preparadas dispersando el quitosano en polvo en una solución de HCl 0.1N. Las soluciones de goma arábica fueron preparadas dispersando goma en trozo en agua desionizada grado MiliQ (18.2 mΩ). Ambas dispersiones fueron agitadas a 250 rpm durante 2 h, posteriormente fueron almacenadas a 4 °C por 12 hrs para asegurar la hidratación de los biopolímeros. Las soluciones de goma arábica fueron filtradas en un filtro de algodón S-254 (Corporación Arlequim S.A. de C.V., D.F., México).

5.3.2 Formación del coacervado

Se prepararon quince soluciones de biopolímeros ($CTB_n R_{GA/Q}$) con diferente concentración total de biopolímeros en peso (CTB_n) y diferente relación de goma arábica/quitosano ($R_{GA/Q}$) mezclando las cantidades requeridas de las soluciones madre y agua para formular las siguientes composiciones: $CTB_{1.00}R_3$, $CTB_{1.25}R_4$, $CTB_{1.50}R_5$, $CTB_{1.75}R_6$, $CTB_{2.00}R_7$, $CTB_{2.00}R_3$, $CTB_{2.50}R_4$, $CTB_{3.00}R_5$, $CTB_{3.50}R_6$, $CTB_{4.00}R_7$, $CTB_{4.00}R_3$, $CTB_{5.00}R_4$, $CTB_{6.00}R_5$, $CTB_{7.00}R_6$ y $CTB_{8.00}R_7$. Las soluciones fueron almacenadas durante 72 horas a temperatura ambiente antes de sus análisis. No se emplearon conservadores en las mezclas, debido a que está reportado que el quitosano actúa como fungicida y bactericida (Rabea y col., 2003). Todas las mediciones fueron hechas por triplicado y se reportan sus medias con sus respectivas desviaciones estándar.

5.3.3 Rendimiento de la fase coacervada

Después de las 72 h de reposo, la "fase en equilibrio" fue separada de la fase coacervada por decantación; esta última fue secada a 36 °C hasta alcanzar masa constante. El rendimiento (% *rend*) de la fase coacervada fue determinado por la siguiente ecuación.

Ecuación 1

$$\% \text{ rend} = \frac{m_i}{m_o} \times 100 \%$$

Donde m_o es la masa total inicial de biopolímeros que se empleó para hacer las soluciones de biopolímeros y m_i es la masa presente en la fase coacervada deshidratada.

5.3.4 Equivalencia de los biopolímeros en solución

Se emplearon dispersiones de goma arábica y quitosano al 10 % y al 2% (p/p), respectivamente. Se generaron las curvas de titulación de ambos biopolímeros mediante la adición de alícuotas de 0.5 mL de NaOH 0.1N, registrando el cambio de pH con un potenciómetro Vernier pH-BTA (Beaverton, OR, EUA). El punto de equivalencia fue determinado a partir del punto de inflexión de la curva del cambio de pH en función del cambio de volumen ($\Delta\text{pH}/\Delta V$).

5.3.5 Análisis elemental

La concentración de los polisacáridos en la fase coacervada (RBFC_{GA/Q}) fue determinada usando un equipo de análisis elemental PE2400 series II CHNS/O Analyzer (Perkin Elmer, EUA). Se empleó un método de combustión a 980 °C para convertir los elementos de la fase coacervada en gases (CO₂, H₂O y N₂). Goma arábica y quitosano como blancos, así como las diferentes fases coacervadas fueron oxidadas en una atmosfera de oxígeno puro. Los productos de la combustión incluyen al CO₂, H₂O y N₂. Los gases resultantes fueron homogeneizados y controlados en condiciones exactas de presión, temperatura y volumen en el interior del equipo. Los gases homogeneizados pasaron a través de una columna donde fueron separados y detectados en función de sus conductividades térmicas. El porcentaje total de carbono, hidrógeno y nitrógeno fueron determinados con una precisión de 0.1µg por el software del equipo. El porcentaje experimental de goma arábica (%GA_{Exp}) fue calculado por la siguiente expresión.

Ecuación 2

$$\%GA_{Exp} = \frac{\%coacervado - \%Q}{\%GA - \%Q} \times 100$$

Donde % GA, % Q y % coacervado, corresponden a la cantidad de nitrógeno encontrada en las muestras de goma arábica, quitosano y la fase coacervada, respectivamente. El nitrógeno fue seleccionado para determinar la composición de la muestra debido a que éste mostró una diferencia elemental razonable entre la goma arábica y el quitosano. La relación de biopolímeros en la fase en equilibrio ($RBF_{GA/Q}$) fue determinada mediante un balance de materia.

5.3.6 HPLC

Para cuantificar la concentración de los biopolímeros en la "fase en equilibrio" fue necesario hidrolizar las muestras de goma arábica, de quitosano y de los coacervados, reduciendo los polisacáridos a sus respectivos monómeros para posteriormente ser analizados por HPLC.

a) Hidrólisis ácida

Alícuotas de 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 g/L de goma arábica, 1 g/L de quitosano y 1.8 g de la "fase en equilibrio" fueron tomadas y colocadas en tubos de ensaye Pyrex de 30 cm³, posteriormente se agregó la cantidad necesaria de una solución de ácido sulfúrico 4 % (p/p) hasta alcanzar una masa total de 10 g. Los tubos de ensaye fueron colocados en un baño de aceite mineral a 100 °C por un periodo de 4 horas. La masa perdida durante la hidrólisis fue recuperada con agua grado (18.2 mΩ). La hidrólisis fue neutralizada mediante la adición de 2.0 g de BaCO₃ agitando las muestras durante 12 horas (Randall y col., 1989). Posteriormente, las muestras hidrolizadas fueron filtradas (0.45 μm) y analizadas por HPLC.

b) Condiciones del HPLC

Las composiciones de los monosacáridos de la goma arábica fueron determinados después de la hidrólisis ácida empleando un equipo de HPLC (Agilent serie 1100) equipado con un

inyector Rheodyne modelo 7725i (Agilent, EUA) y un loop de 20 μ L. La separación de los monosacáridos se efectuó en una columna de monosacáridos Rezex RHM (7.8 mm \times 300 mm, 8 μ m, Phenomenex, EUA) acoplada a un detector de índice de refracción (Agilent, 1100 Series, G1362A) a 35 °C. La fase móvil fue agua con un flujo de 0.2 mL/min a una temperatura de 30 °C. Los picos fueron integrados con el software del cromatógrafo Agilent Chem Station (Agilent, EUA). Todas las muestras fueron determinadas por triplicado.

c) Composición de la goma arábica

Estándares de D-galactosa, L-arabinosa, L-ramnosa y ácido D-glucurónico en un intervalo de concentraciones entre 0.05-10 g/L fueron cuantificados en el HPLC. El tiempo de retención de cada monosacárido fue determinado a partir de los cromatogramas, obteniendo las curvas de calibración para cada uno de los estándares. Después, diferentes concentraciones conocidas (0.1-2.5 g/L) de los hidrolizados de goma arábica fueron inyectados en el HPLC, cuantificando las áreas obtenidas. Se generó una curva de calibración de concentración de goma arábica como una función de la suma de las áreas individuales de los monosacáridos. A partir de la curva de calibración de goma arábica fueron calculadas las concentraciones de goma arábica en la "fase en equilibrio". La concentración de quitosano en las fases en equilibrio, el quitosano y las concentraciones de goma arábica, estas últimas dos fueron estimadas mediante un balance de masa.

5.3.7 Mediciones turbidimétricas

Para las determinaciones de turbidez se empleó un espectrofotómetro Spectronics Genesys 2 UV/Vis (Spectronic Unicam, Rochester, N.Y. EUA) para conocer la turbidez de las fases en equilibrio a 600 nm a 25 ± 0.5 °C. Las muestras fueron colocadas en una celda de cuarzo de 1 cm. La transmitancia fue registrada y la turbidez de las muestras calculada con la siguiente ecuación:

Ecuación 3

$$\tau = -\left(\frac{1}{L}\right) \ln\left(\frac{I_t}{I_0}\right)$$

Donde, τ es la turbidez (cm^{-1}), L es la longitud óptica de la celda (cm), I_t es la intensidad de la luz transmitida y I_0 es la intensidad de referencia.

5.3.8 Movilidad electroforética

Las movilidades electroforéticas de las fases en equilibrio fueron determinadas usando un medidor de electroforesis Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). La esencia clásica de un sistema de microforesis es una celda capilar con electrodos al final de la celda, a la cual se le aplica un potencial eléctrico. Las partículas se mueven hacia el electrodo, entonces se determina la velocidad con las que éstas se mueven a través del campo eléctrico (movilidad electroforética), descrita mediante la ecuación de Henry (Ecuación 4).

Ecuación 4

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(Ka)}{3\eta}$$

Donde z es el potencial zeta, ε es la constante dieléctrica del medio, η es la viscosidad y $f(Ka)$ es la función de Henry con un valor de 1.5. El equipo fue calibrado empleando un estándar de latex (-50 ± 5 mV). Todas las mediciones se efectuaron al menos en dos muestras distintas por triplicado a 25°C .

5.3.9 Rendimiento de coacervación en función del pH

A la solución de biopolímeros CTB_nR_{GMQ} que generó el mayor porcentaje de fase coacervada bajo condiciones normales, se le ajustó el pH en un intervalo de 2.5 a 7.0 con incrementos de 0.5 unidades, usando HCl (0.1N) o NaOH (0.1M) para determinar el efecto del pH en el rendimiento de la fase coacervada empleando la Ecuación 2. La separación de fases se realizó después de 72 horas.

5.3.10 Rendimiento de coacervación en función del NaCl

A la solución de biopolímeros $CTB_nR_{GA/Q}$ que produjo el mayor porcentaje de fase coacervada bajo condiciones normales, se le agregaron distintas concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) de 0 a 250 mM con incrementos de 25 mM para determinar el efecto de la concentración de sal sobre el rendimiento de la fase coacervada empleando la Ecuación 2. Las separaciones de las fases fueron realizadas después de 72 horas.

5.3.11 Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros de infrarrojo de la goma arábiga, quitosano y la fase coacervada $CTB_nR_{GA/Q}$ de mayor rendimiento fueron obtenidos usando un espectrofotómetro FT-IR GX System (Perkin-Elmer, Wellesley, MA, EUA) con accesorio ATR Durasample. Los espectros fueron determinados en los sólidos obtenidos a partir de la deshidratación de las dispersiones de biopolímeros y de la fase coacervada $CTB_nR_{GA/Q}$ de mayor rendimiento. Todos los espectros fueron generados a partir de un promedio de 16 escaneos con una resolución de 2 cm^{-1} . La posición de los picos y áreas de los espectros fueron obtenidos usando el software del equipo (Spectrum, Perkin-Elmer, Wellesley, MA, EUA).

5.3.12 Reología de la fase coacervada

Se evaluaron las propiedades viscoelásticas de la fase coacervada $CTB_nR_{GA/Q}$ de mayor rendimiento como una función del pH empleando un reómetro modular compacto Paar Physica MCR 300 (Graz, Austria) que trabaja bajo control de esfuerzos y/o deformación equipado con un control de temperatura tipo Peltier a $25 \pm 0.01\text{ }^\circ\text{C}$. Se empleó una geometría cono-plato; el cono con un ángulo de 1° y un diámetro de 75 mm (0.05 mm de separación entre el plato y el cono). Todas las mediciones fueron realizadas a la fase coacervada después de decantar la "fase en equilibrio". Aproximadamente 2 mL de la fase coacervada a diferentes pH's (3.0, 4.5 y 6.0) fueron colocadas en el interior de una cámara de humedad para minimizar la evaporación del solvente. El tiempo de espera de medición de las muestras fue determinado mediante una prueba de relajación que consiste en la

medición del módulo complejo (G^*) en función del tiempo hasta alcanzar mediciones constantes de G^* ; empleando una frecuencia angular (ω) y deformación (γ) constantes de 10 rad/s y 1 %, respectivamente. Este tiempo fue característico de cada muestra y fue usado en cada una de las subsecuentes mediciones reológicas. Las curvas de amplitud fueron determinadas empleando una $\omega \sim 10$ rad/s y un intervalo de γ de 0.01–100 %. Todas las mediciones fueran efectuadas dentro de la región lineal viscoelástica (RLVE) en donde los módulos dinámicos elástico (G') y viscoso (G'') son independientes de la amplitud de la deformación. Las curvas de frecuencia fueron determinadas mediante un barrido de $\omega \sim 100$ –0.1 rad/s dentro de la RLVE.

5.3.13 Densidad relativa de la fase coacervada.

La densidad relativa de la fase coacervada fue medida por un densímetro digital DMA35 Anthon Para (Austria) a 25°C. El instrumento muestra la densidad de la muestra a la temperatura de medición dividida por la densidad del agua a 20 °C.

5.3.14 Microscopía electrónica de barrido

Las muestras de los biopolímeros y la fase coacervada CTB_nR_{G/A/Q} de mayor rendimiento fueron fijadas en una solución de glutaraldehído al 2% (p/p) durante 90 minutos. Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas en soluciones acuosas de etanol, que diferían en su concentración de etanol (50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 100%, 30 minutos por solución). Las muestras deshidratadas fueron colocadas en acetona durante 1 hora. Las muestras fueron secadas en un secador de punto crítico CPA II Technics (Tousimis, Rockville, MD, EUA) (Lobato-Calleros y col., 2006). Todas las muestras fueron fracturadas y cubiertas con una capa de oro en una ionizadora de metales de capa fina JFC 1100 (Jeol Ltd., Akishima, Japón). Se empleó un microscopio electrónico de barrido JMS-6360LY (Jeol Ltd., Akishima, Japón) de alto vacío JEOL a 20 kV para observar cada una de las muestras a $\times 5000$.

5.4 Emulsión simple por coacervación O/W_{GAQ}

Las emulsiones por coacervación compleja (O/W_{GAQ}) fueron formadas en un proceso de dos etapas. La primera etapa consiste en formular una emulsión O/W_{GA}. La segunda etapa consiste en incorporar la emulsión O/W_{GA} a una solución de quitosano. La relación goma arábica/quitosano fue determinada a partir de los resultados de la sección 6.1.

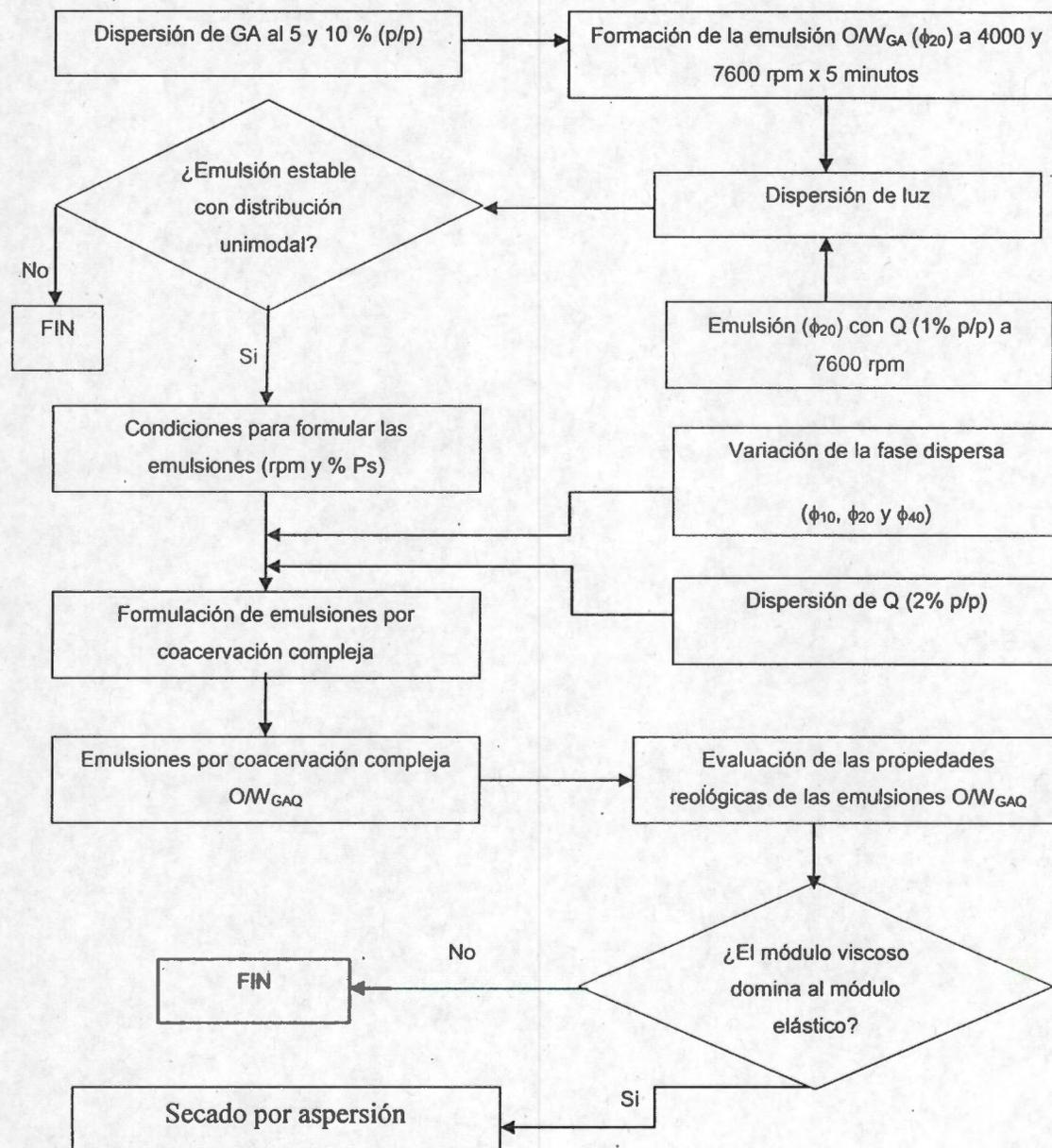


Figura 10. Diagrama de flujo para producir emulsiones por coacervación compleja O/W_{GAQ}.

5.4.1 Formulación de emulsiones simples O/W_{GA}

Se empleó un diseño factorial 2X2 con la finalidad de obtener los parámetros de formulación de las emulsiones simples con goma arábica (O/W_{GA}). Se eligieron como variables significativas del proceso, la concentración de goma arábica (5 y 10 % p/p) y la velocidad de agitación (4000 y 7600 rpm). Se utilizó un contenido de fase dispersa del 20% (p/p). Las emulsiones fueron formuladas empleando un mezclador de alto corte Ultra turrax, T-50, IKA, (Staufen, Alemania) durante 5 minutos.

5.4.2 Formulación de una emulsión simple O/W_Q

Se preparó una emulsión simple con quitosano (1% p/p) con un contenido de fase dispersa del 20% (p/p), mediante un mezclador de alto corte Ultra turrax, T-50, IKA, (Staufen, Alemania) a 7600 rpm durante 5 minutos.

5.4.3 Difracción de luz

El tamaño y distribución de los glóbulos de las emulsiones O/W_{GA} y O/W_Q fueron determinados con un equipo de difracción de luz Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). El Mastersizer 2000 con un intervalo de medición de partículas de 0.02 a 2000 μm contiene una unidad para líquidos HydroS 2000 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) con una capacidad de 50–120 mL. La velocidad de agitación de la dispersión se fijó en 1000 rpm. La amplitud de la distribución de los glóbulos de las emulsiones O/W_{GA} fue caracterizada por la Ecuación 5.

Ecuación 5

$$\text{amplitud} = \frac{D(v,90\%) - D(v,10\%)}{D(v,50\%)}$$

En donde, $D(v,x\%)$ indica el diámetro promedio de los glóbulos de la emulsión que se encuentran por debajo del $x\%$ de la distribución. Las emulsiones fueron monitoreadas en función del tiempo por un intervalo de 30 días.

5.4.4 Determinación de las cinéticas de coalescencia

Se determinó el diámetro promedio volumétrico ($D_{3,0}$) de los glóbulos de las emulsiones como función del tiempo (sección 5.4.3). La tasa de coalescencia (C) fue determinada a partir de la variación del tamaño de los glóbulos respecto al tiempo Ecuación 6 y Ecuación 7:

Ecuación 6

$$N_t = N_0 e^{-Ct}$$

donde

Ecuación 7

$$N_t = \frac{6 \times 10^{12} \phi}{\pi (D_{3,0})^3}$$

Estas dos ecuaciones relacionan el número de glóbulos de la fase dispersa a un tiempo dado (N_t), con el número inicial de glóbulos de la fase dispersa (N_0), la fracción volumétrica de la fase dispersa (ϕ) y el diámetro promedio volumétrico ($D_{3,0}$) en micrómetros a un tiempo t en segundos (Sherman, 1968).

5.4.5 Formulación de las emulsiones simples por coacervación O/W_{GAQ}

Se formularon 3 emulsiones simples O/W_{GA} empleando un mezclador de alto corte Ultraturrax, T-50, IKA, (Staufen, Alemania) con diferente contenido de fase dispersa del ϕ_{10} , ϕ_{20} y ϕ_{40} , donde el subíndice corresponde al contenido de la fase dispersa en la emulsión. Posteriormente fueron mezcladas en una relación másica 1:1 con una solución de quitosano al 2% (p/p) (determinada a partir de los experimentos de la sección 5.3), mezclando lentamente con un agitador magnético para obtener las emulsiones por coacervación O/W_{GAQ}. Las muestras permanecieron en reposo por lo menos 24 horas antes de su análisis.

5.4.6 Microscopio óptico

Con la finalidad de determinar el tamaño de los glóbulos de la emulsión O/W_{GAQ} se usó un microscopio óptico de inmersión Olympus BX45 (Tokio, Japón) con un objetivo UPlan FI 100×/1.3 oil (Tokio, Japón) conectado a una cámara Olympus C3030 (Tokio, Japón) con una resolución de 2048 x1536. Las imágenes fueron analizadas con un software de análisis de imágenes Image-Pro plus versión 4.1.0.0 Media Cybernetics, L.P. (St. Louis, EUA).

5.4.7 Reología de las emulsiones simples por coacervación O/W_{GAQ}

Para la determinación de las propiedades viscoelásticas de las emulsiones por coacervación compleja se empleó una metodología similar a la descrita en la sección 5.3.12.

5.5 Microencapsulación

5.5.1 Secado por aspersión

Se formularon dos emulsiones simples O/W_{GA} y O/W_{GAQ} a partir de los resultados de las secciones 6.2.2y 6.2.5. Ambas emulsiones fueron alimentadas a un secador por aspersión Mobile Minor Niro-Atomizer (Copenhagen, Dinamarca) con un flujo volumétrico de 20 mL/min, una presión de atomización de 2.8 bares, temperatura del aire de entrada $160 \pm 1^\circ\text{C}$, y una temperatura del aire de salida de $90 \pm 2^\circ\text{C}$ para producir las microcápsulas.

5.5.2 Microscopía electrónica de barrido para los microencapsulados

Se observó la microestructura de los microencapsulados producidos por el secado de las emulsiones simples O/W_{GA} y O/W_{GAQ} . Las muestras fueron fijadas y cubiertas con una capa de oro en una ionizadora de metales de capa fina JFC 1100 (Jeol Ltd., Akishima, Japón). Se empleó un microscopio electrónico de barrido JMS-6360LY (Jeol Ltd., Akishima, Japón), de alto vacío JEOL a 20 kV, para observar cada muestra en un intervalo de amplificación de $\times 150$, $\times 2500$ y $\times 10000$. Las imágenes fueron analizadas con un software de análisis de imágenes Image-Pro plus versión 4.1.0.0 Media Cybernetics, L.P. (St. Louis, EUA).

6 Resultados y discusión

El desarrollo de membranas interfaciales funcionales requiere del conocimiento de las interacciones entre los materiales de pared que la formarán, así como de las condiciones de formulación que generen la matriz deseada. La funcionalidad de la membrana está íntimamente relacionada con las propiedades de los materiales que la conforman. La *goma arábiga* es un polisacárido de naturaleza catiónica, ampliamente usada por sus excelentes propiedades emulsionantes y encapsulantes. Sin embargo, algunas investigaciones han demostrado que los microencapsulados de goma arábiga no proveen buena protección contra la oxidación de aceites esenciales (Djordjevic y col., 2008; Bertolini y col., 2001; Kim y Morr, 1996). Por lo que el estudio de sus interacciones con otros biopolímeros que ayuden a mejorar sus propiedades estructurales es de gran importancia. El *quitosano* es un polisacárido de naturaleza catiónica, ampliamente usado en la industria de los alimentos por sus propiedades formadoras de películas. Las películas de quitosano son claras, fuertes y flexibles y exhiben buenas propiedades de barrera contra el oxígeno y dióxido de carbono, además actúa como fungicida y bactericida.

Dependiendo de las condiciones de formulación, la mezcla de ambos polisacáridos puede formar complejos interfaciales solubles o insolubles (coacervados). Las propiedades como membrana formadora de pared están íntimamente ligadas a la naturaleza del complejo. Por lo que en las siguientes secciones se discuten los resultados obtenidos en la formulación de membranas complejas goma arábiga-quitosano, así como las propiedades fisicoquímicas que presentan estos complejos, así como el establecimiento de indicadores (formación y estabilidad de emulsiones y microencapsulados) para su aplicación en sistemas dispersos.

6.1 COACERVACIÓN COMPLEJA

6.1.1 Formación del coacervado

En este apartado se discuten los resultados obtenidos en la formación de complejos electrostáticos insolubles entre la goma arábica y el quitosano. Se estudió la influencia de la relación de biopolímeros ($R_{GA/Q}$), la concentración total de biopolímeros (CTB_n), el pH y la fuerza iónica en la formación de complejos electrostáticos, con la finalidad de proveer las condiciones apropiadas para la formulación de emulsiones O/W_{GAQ}.

6.1.1.1 Relación y concentración de biopolímeros

La formación de complejos electrostáticos insolubles entre la goma arábica y el quitosano depende fuertemente de la relación y concentración total de biopolímeros, el pH y la fuerza iónica. La formación de complejos insolubles es el resultado de las interacciones atractivas entre los grupos carboxílicos de la goma arábica ($-COO^-$) y los grupos amino del quitosano ($-NH_3^+$). La Figura 11 muestra un diagrama de fases de tres componentes para el sistema goma arábica, quitosano y agua, a un pH de 4.0, sin modificación de la fuerza iónica.

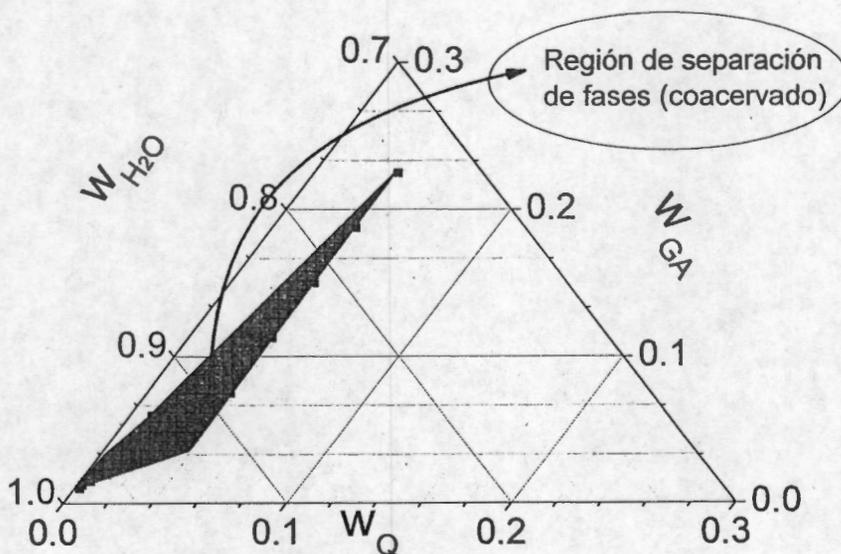


Figura 11. Ubicación de la fase coacervada a partir de un diagrama de fases de tres componentes.

El área sombreada representa la región en donde el sistema presenta una segregación de fases (complejos insolubles). Cuando uno de los polisacáridos se encuentra en exceso, los grupos funcionales presentes en solución se encuentran desbalanceados, el sistema presenta la formación de complejos solubles, caracterizados por una suspensión turbia.

El rendimiento de coacervación fue usado para comprender el efecto de la $R_{GA/Q}$, la CTB_n , el pH (sección 6.1.1.7) y la concentración de NaCl (sección 6.1.1.8) en la eficiencia de coacervación entre la goma arábica y el quitosano. Todos los factores mencionados influyen en la configuración tridimensional y densidad de carga relativa de los biopolímeros; por lo tanto, estos factores tienen un efecto significativo en el grado de interacción entre ambas macromoléculas. La Figura 12 muestra el rendimiento de coacervado como una función de la $R_{GA/Q}$ y la CTB_n (obtenido a partir del porcentaje en peso de la solución de quitosano y la $R_{GA/Q}$).

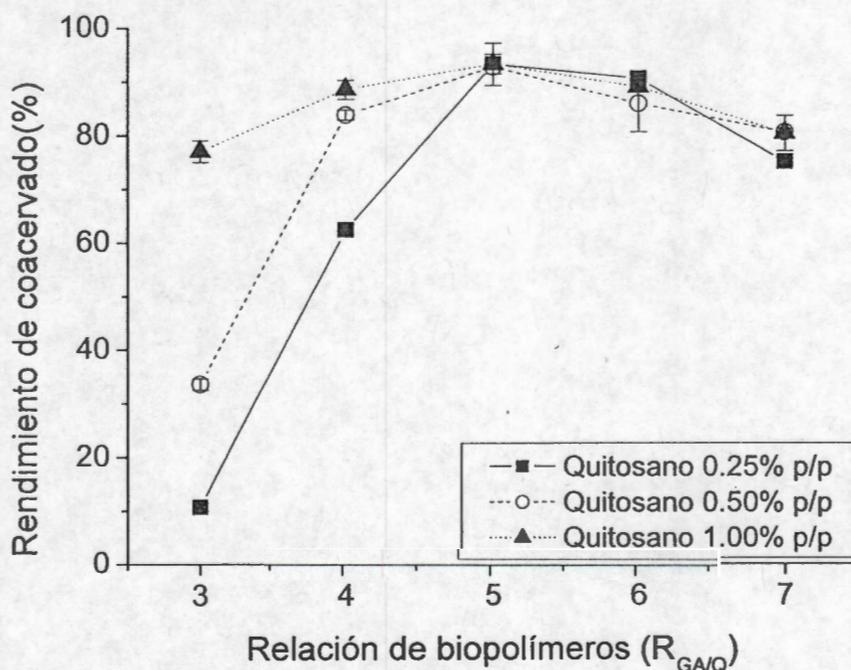


Figura 12. Rendimiento de coacervación como función de la relación de biopolímeros y concentración de biopolímeros después de 72 hrs de interacción.

Se observa un máximo del rendimiento de coacervado con un valor de $R_{GA/Q}$ de 5, el cual es independientemente de la CTB_n usada. Este fenómeno implica la neutralización de cargas entre ambos biopolímeros. Conforme $R_{GA/Q}$ se aleja de la relación óptima (R_5), el balance de cargas entre las macromoléculas también se desplaza de su relación estequiométrica y el rendimiento de coacervado disminuye. La disminución en el rendimiento de coacervado de R_5 a R_7 , pero en términos generales no se ve afectada por la CTB_n . De forma contraria, el rendimiento de coacervado disminuye y es dependiente de la CTB_n a R_4 y R_3 (Figura 12). A bajas relaciones de biopolímeros (R_3 y R_4) son necesarias altas concentraciones de biopolímeros para obtener rendimientos de coacervado por arriba del 80%, pero a relaciones de biopolímeros mayores (R_5 , R_6 y R_7) prácticamente no existe diferencia en el rendimiento de coacervación, independientemente de la concentración de biopolímeros usada.

El efecto de la CTB_n en el rendimiento de coacervado puede ser explicado en términos del comportamiento de las macromoléculas polielectrolíticas (Pasika, 1977). La ionización de los compuestos polielectrolitos ayuda a solubilizar las macromoléculas, las cuales se disuelven produciendo polianiones y contra iones. Un polianión tiene un gran número de cargas en su proximidad cercana, debido a que están unidas a la cadena carbonada de la macromolécula y, aunque el polianión tiene cierto grado de movilidad, las cargas individuales unidas a la cadena no. No todos los contraiones son libres de moverse alrededor de la macromolécula. Los iones libres forman una nube de contraiones cerca del polianión, mientras que los iones inmovilizados están limitados a un sitio específico o en punto de la estructura de la macromolécula. Mientras que la solución del polielectrolito se diluye cada vez más (esto implica un incremento en la solubilidad del polielectrolito), libera un mayor número de contraiones, generando la carga del macroión, el cual se expande. Esta expansión en el medio no puede ocurrir indefinidamente, debido a que la macromolécula posee cierto grado de flexibilidad. Mientras más expandido se encuentra el polianión, mayor es la rigidez de su estructura, por lo que los sitios cargados expuestos poseen una menor libertad para interactuar. Este fenómeno, aunado al hecho de que el número de los polianiones

disponibles en sistemas diluidos es menor, explica la aguda disminución del rendimiento de coacervado a bajas concentraciones de biopolímeros. A concentraciones de biopolímeros relativamente altas, el grado de ionización de las macromoléculas es menor y la flexibilidad de la estructura es mayor, así como menos expandida, por lo que los sitios cargados se encuentran más disponibles para la interacción, resultando en un incremento del rendimiento de coacervado. Estos resultados son importantes desde el punto de vista de que no se necesitan concentraciones bajas o altas de biopolímeros para obtener una mayor rendimiento de coacervado. La Figura 13a muestra la formación de complejos goma arábica-quitosano en función de la relación total de biopolímeros para una concentración de quitosano del 1 % (p/p) al pH natural de la mezcla de biopolímeros sin adición de NaCl.

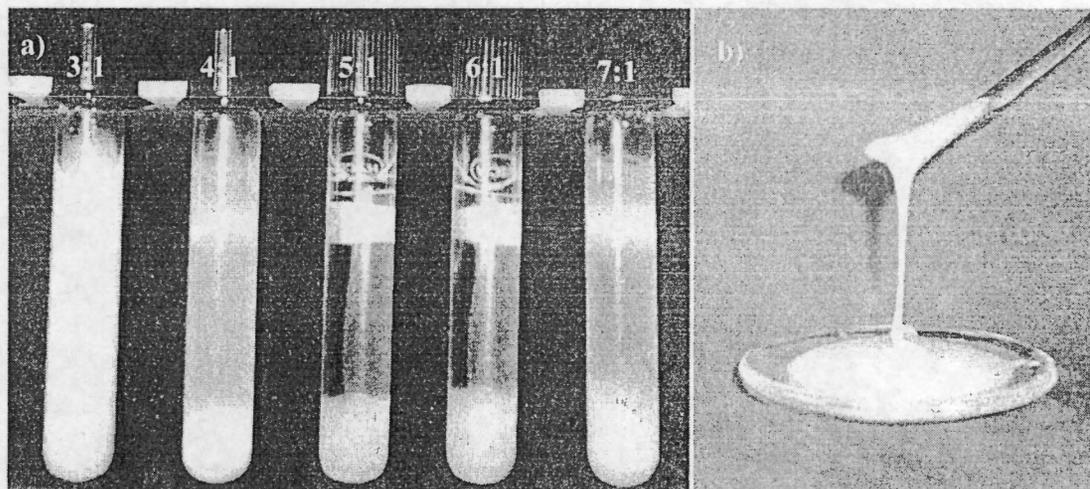


Figura 13. a) Formación de complejos goma arábica-quitosano en función de la relación total de biopolímeros (3:1, 4:1, 5:1, 6:1 y 7:1, para una concentración de quitosano al 1% p/p); b) fase coacervada CTB_{6,0}R₅.

Después de la separación de fases, la fase coacervada tuvo un aspecto similar al de un líquido viscoso (Figura 13b), similar a lo reportado por Weinbreck y col., (2004).

6.1.1.2 Equivalencia de los biopolímeros en solución

El punto de equivalencia de los biopolímeros ocurre cuando la primera derivada del cambio de pH respecto al volumen de NaOH agregado presenta un máximo. En las Figuras 14a y 14b se muestran las curvas de titulación, así como la derivada del cambio de pH de soluciones de quitosano y goma arábica al 2 y 10 % (p/p), respectivamente, en función de los miliequivalentes agregados de NaOH.

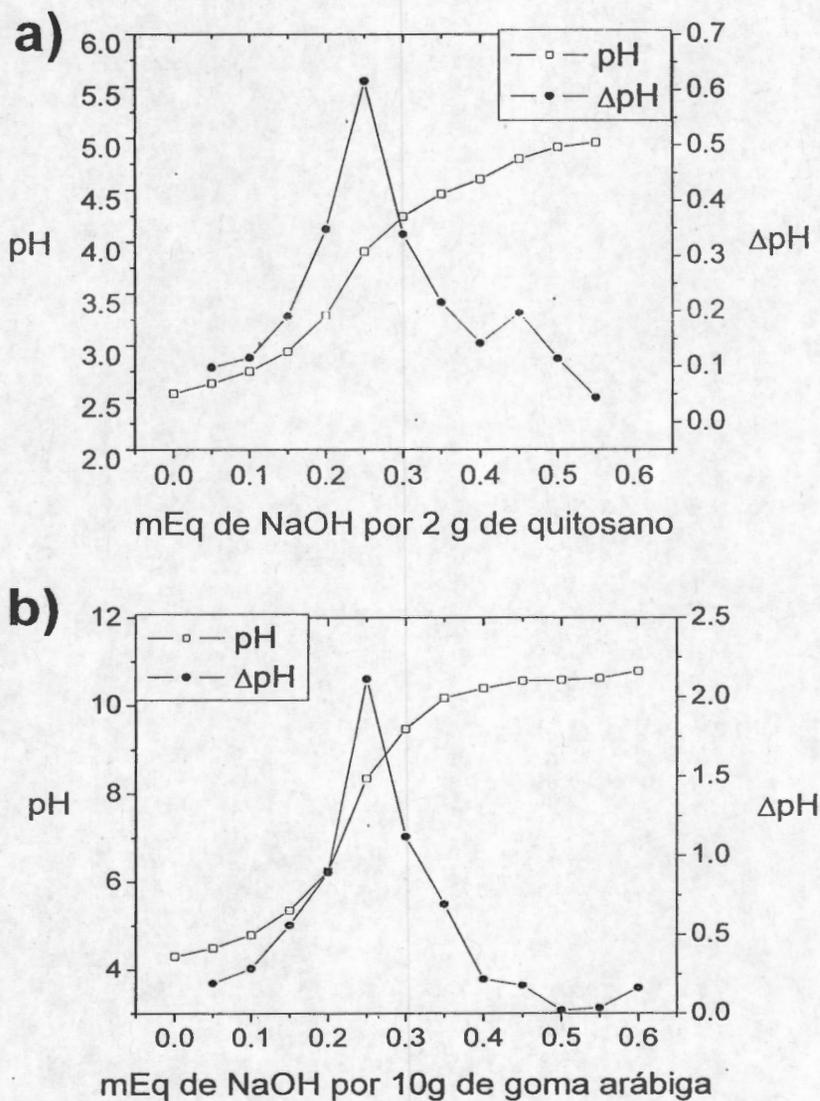


Figura 14. a) Miliequivalentes de NaOH por 2 g de quitosano; b) miliequivalentes de NaOH por 10 g de goma arábica.

Se puede observar en las Figuras 14a y 14b que ambas soluciones requirieron de 0.25 miliequivalentes de NaOH para neutralizar las cargas de los macroiones.

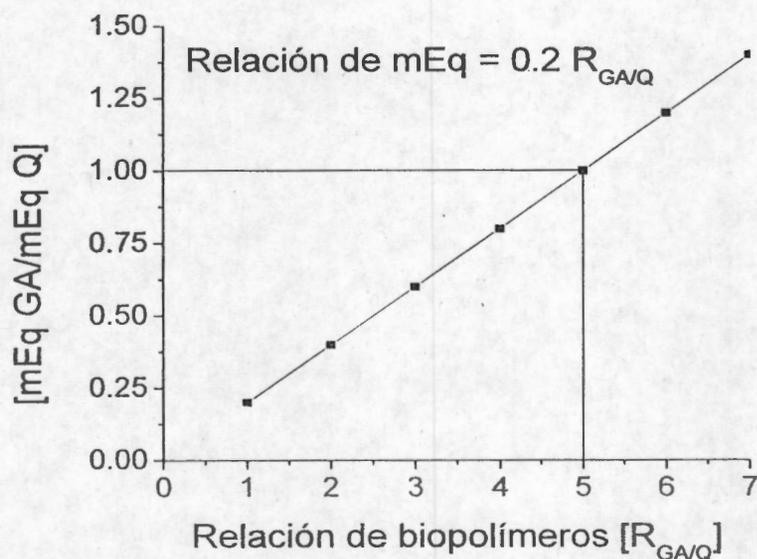


Figura 15. Relación de miliequivalentes de goma arábica/quitosano como una función de la relación de biopolímeros goma arábica/quitosano

La Figura 15 muestra la relación de los miliequivalentes de goma arábica/quitosano como una función de la relación de biopolímeros iniciales ($R_{GA/Q}$). Cuando la relación de mezclado de los dos polisacáridos presenta cargas de la misma magnitud y opuestas, las fuerzas de atracción entre los polisacáridos cargados se saturan entre ellos permitiendo una intensa interacción y el mayor grado de interacción. La máxima coacervación (en términos del rendimiento de coacervación) ocurre a una relación de polisacáridos muy cercana a la relación de equivalentes de mezclado (5 gramos de goma arábica por gramo de quitosano). A otra relación de mezclado, las cargas no se encuentran estequiométricamente balanceadas, por lo que existe una menor interacción entre los polisacáridos opuestamente cargados, y por lo tanto, un menor rendimiento de coacervación. Estos resultados concuerdan con los resultados encontrados en la sección anterior (6.1.1.1).

6.1.1.3 Análisis elemental

El análisis elemental de la goma arábica mostró un contenido de carbono, hidrógeno y nitrógeno (CHN) de: 42.64 %C, 6.20 %H y 0.64 %N, mientras que el contenido de CHN del quitosano fue de: 34.14 %C, 6.58 %H y 6.27 %N. El análisis elemental de las diferentes muestras de coacervados varió entre 42.38–45.51 %C, 6.05–6.81 %H y 1.38–1.89 %N. El porcentaje de goma arábica experimental (%GA_{Exp}) de las diferentes formulaciones de coacervados fue calculado por la Ecuación 3, los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Goma arábica experimental determinada mediante el análisis elemental de los diferentes coacervados a partir de CTB_nR_{GA/Q}.

CTB _{1.00} R ₃	CTB _{1.25} R ₄	CTB _{1.50} R ₅	CTB _{1.75} R ₆	CTB _{2.00} R ₇
8.0%	51.3%	80.6%	77.2%	67.4%
CTB _{2.00} R ₃	CTB _{2.50} R ₄	CTB _{3.00} R ₅	CTB _{3.50} R ₆	CTB _{4.00} R ₇
26.9%	67.5%	77.3%	68.9%	68.6%
CTB _{4.00} R ₃	CTB _{5.00} R ₄	CTB _{6.00} R ₅	CTB _{7.00} R ₆	CTB _{8.00} R ₇
60.2%	72.5%	79.0%	62.2%	67.4%

CTB_n = concentración total de biopolímeros.; R_{GA/Ch} = relación en peso goma arábica/quitosano.

La Figura 16a muestra la relación de biopolímeros de la fase coacervada (RBFC) como una función de las dispersiones CTB_nR_{GA/Q}. En términos generales, la RBFC_{GA/Q} aumenta con la R_{GA/Q} de las soluciones iniciales de biopolímeros, pero es más o menos independiente de CTB_n. La Figura 16b muestra la relación de biopolímeros de la "fase en equilibrio" (RBFEG_{GA/Q}) como una función de las mezclas de biopolímeros CTB_nR_{GA/Q}. En la Figura 16a se observa que la RBFEG_{GA/Q} aumenta conforme la R_{GA/Q} aumenta, pero la CTB_n tiene cierta influencia en el sistema, particularmente a R₅.

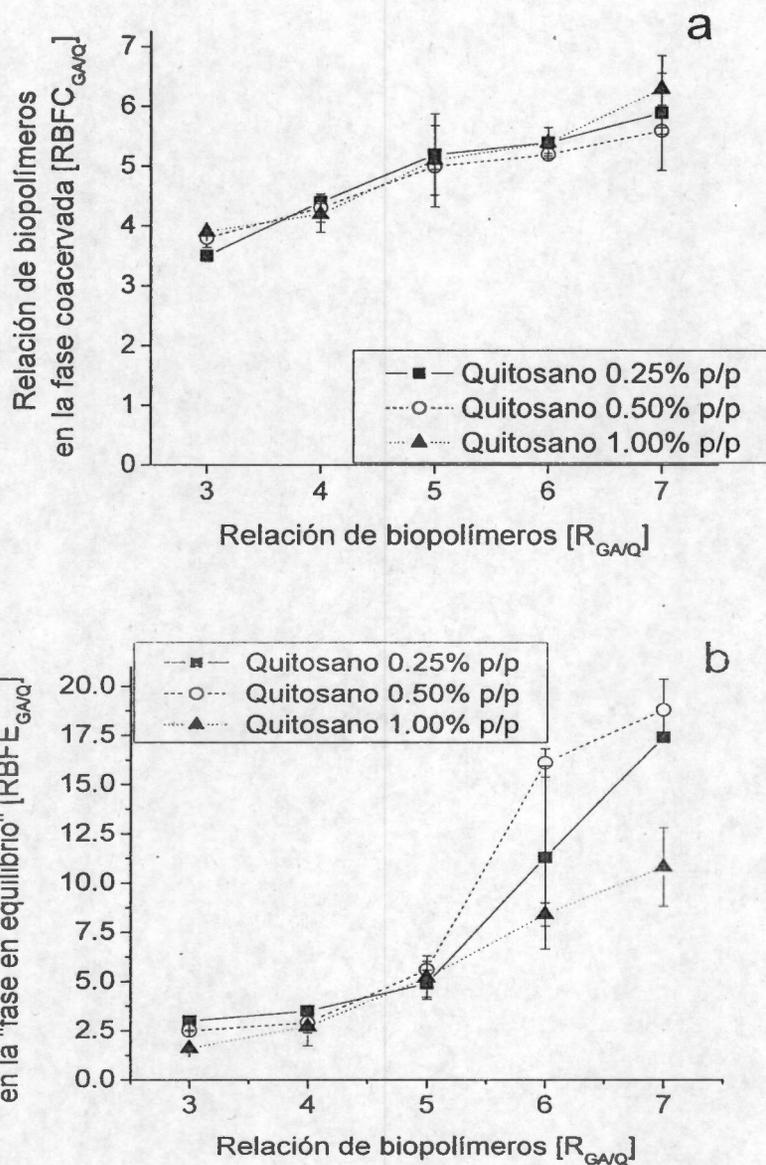


Figura 16. a) Relación de biopolímeros en la fase coacervada, y b) relación de biopolímeros en la "fase en equilibrio", como función de la $R_{GA/Q}$ y CTB_n después de 72 hrs de interacción.

Sin embargo, es de particular interés hacer notar que, por comparación de las Figuras 16a y 16b, puede observarse que a R_5 , tanto $RBFC_{GA/Q}$ como $RBE_{GA/Q}$, exhiben valores muy cercanos a 5, siendo este un indicio de que la fase coacervada y la "fase en equilibrio" se

encuentran muy cerca del equilibrio. Fuera de esta región, el exceso del componente coloidal se distribuye entre la fase coacervada y la fase en equilibrio, favoreciendo en mayor grado a ésta última. Consecuentemente, el proceso de coacervación tiende a mantener la separación de un coacervado equivalente, como lo demuestra la relativa plana curva de composición del coacervado comparada con la curva en equilibrio.

6.1.1.4 HPLC

Los cromatogramas de las soluciones estándar de: 1) ácido D-glucurónico, 2) D-galactosa, 3) L-arabinosa, y 4) L-ramnosa muestran picos característicos en 23.5, 31.5, 32.3 y 33.8 minutos de tiempo de retención, respectivamente (Figura 17).

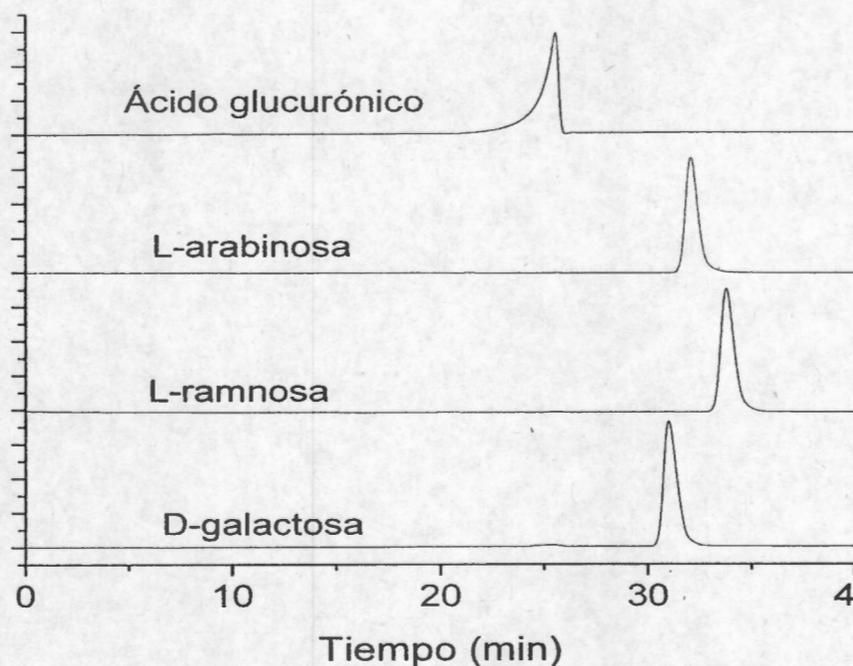


Figura 17. Cromatogramas de los estándares (10 g/L) de 1) ácido D-glucurónico, 2) L-arabinosa, 3) L-ramnosa, y 4) D-galactosa.

Las curvas de calibración (Figura 18) fueron generadas graficando la variación de las áreas de los picos en función de la concentración; cuatro inyecciones de las soluciones estándar fueron ensayadas. Los coeficientes de correlación fueron mayores que 0.997 y las

intercepciones no son diferentes de cero significativamente ($p \leq 0.01$) en todos los casos. Estos resultados indican que fueron establecidas las condiciones para la cuantificación de los azúcares por HPLC.

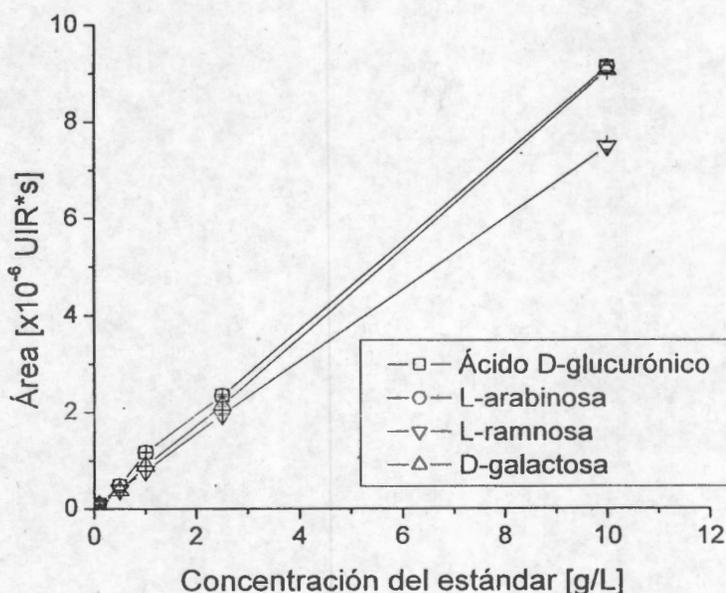


Figura 18. Curvas de calibración de los estándares de ácido D-glucurónico, L-arabinosa, L-ramnosa y D-galactosa.

Seis muestras hidrolizadas de goma arábiga en un intervalo de concentraciones entre 0.1 a 2.5 g/L fueron inyectadas al HPLC. Los tiempos de retención característicos para cada monosacáridos y el ácido glucurónico fueron reproducibles. Sin embargo, los datos obtenidos para el ácido D-glucurónico no mostraron una buena linealidad ($R^2 = 0.89$), comparados con los exhibidos por los monosacáridos ($R^2 > 0.99$). Esta desviación de la linealidad del ácido D-glucurónico exhibe una sobreestimación de la concentración del ácido, probablemente debido a la interacción del ácido D-glucurónico con otras especies resultantes de la hidrólisis. Así, la curva de calibración de la goma arábiga se obtuvo a

partir de la combinación de las áreas de los monosacáridos (Figura 19), la cual muestra linealidad ($R^2 = 0.99$).

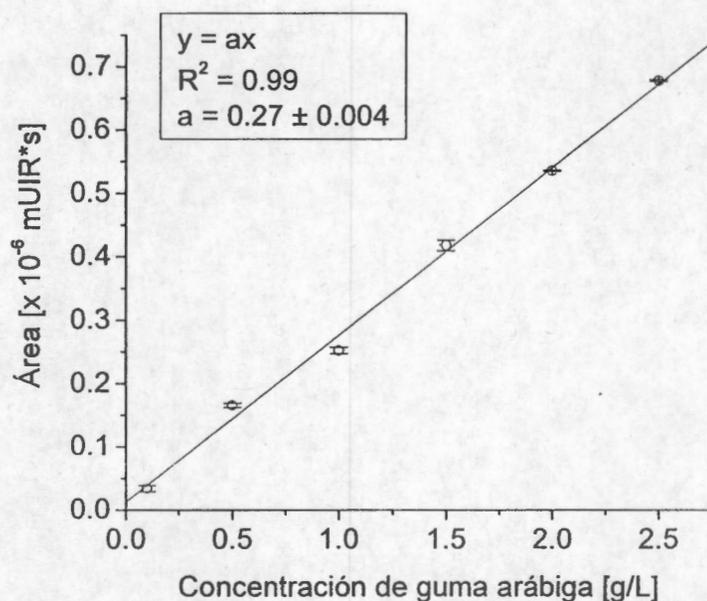


Figura 19 . Curva de calibración de los monosacáridos presentes en la goma arábica por HPLC.

Asimismo, la muestra del hidrolizado de quitosano inyectada en el HPLC, bajo las mismas condiciones de las muestras hidrolizadas de goma arábica, no produjo picos cromatográficos. Algunos trabajos indican que el quitosano ha sido cuantificado bajo condiciones de hidrólisis más agresivas (Novikov, 2004; Boas, 1953) o por hidrólisis enzimática (Il'ina y col., 2004; Kuroiwa y col., 2002) rompiendo eficientemente la molécula en sus constituyentes monosacáridos. Este resultado asegura que cuando se hidrolice la "fase en equilibrio", los monosacáridos detectados por el cromatógrafo son producidos únicamente por la goma arábica. Las muestras hidrolizadas de la "fase en equilibrio" para cada mezcla de solución de biopolímeros fueron inyectadas en el HPLC. Los cromatogramas representativos de la fase en equilibrio se muestran en la Figura 20.

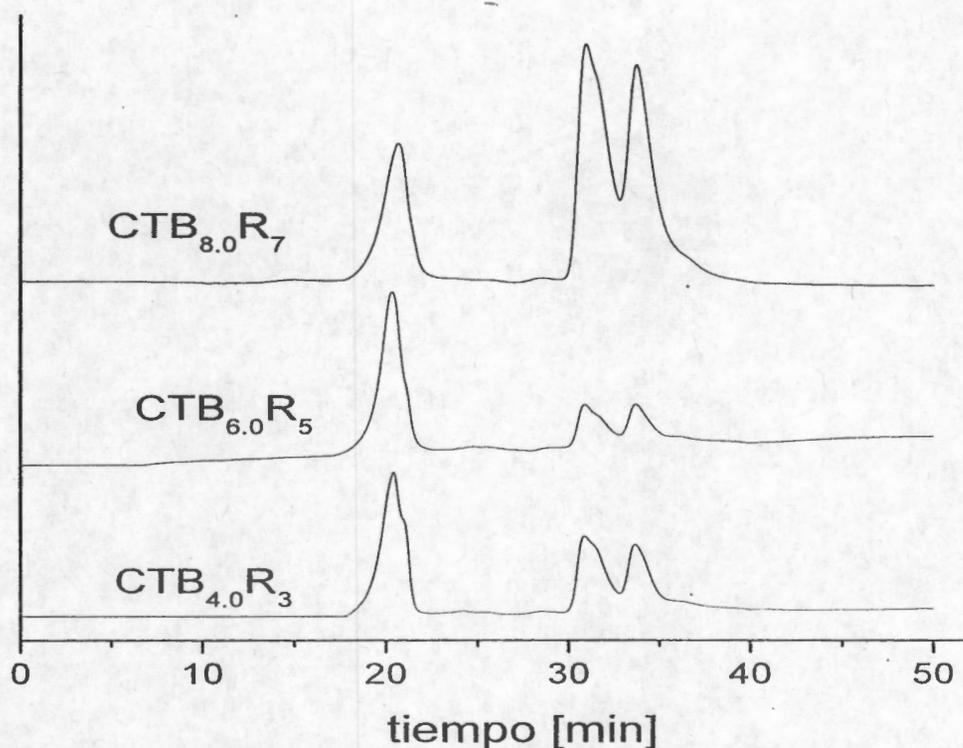


Figura 20. Cromatogramas de los complejos hidrolizados goma arábica-quitosano.

Las concentraciones máscas de la goma arábica en las “fases en equilibrio” para cada mezcla de biopolímeros inyectada fueron calculadas a partir de la curva de calibración de goma arábica (Figura 19). Las concentraciones máscas de goma arábica en las fases coacervadas fueron determinadas restando las concentraciones máscas de goma arábica encontrada en las fases en equilibrio por HPLC de las concentraciones máscas iniciales de goma arábica de las mezclas de biopolímeros (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración máscas de goma arábica en las fases coacervada y en equilibrio para las diferentes relaciones en peso.

Fase (g)	CTB _{0.25} R ₃	CTB _{0.25} R ₅	CTB _{0.25} R ₇	CTB _{0.5} R ₃	CTB _{0.5} R ₅	CTB _{0.5} R ₇	CTB _{1.00} R ₃	CTB _{1.00} R ₅	CTB _{1.00} R ₇
coacervada	0.007	0.285	0.324	0.102	0.582	0.633	0.509	1.180	1.349
en equilibrio	0.181	0.028	0.115	0.274	0.042	0.242	0.167	0.088	0.403

Estos resultados fueron comparados con los obtenidos por análisis elemental (Figura 21).

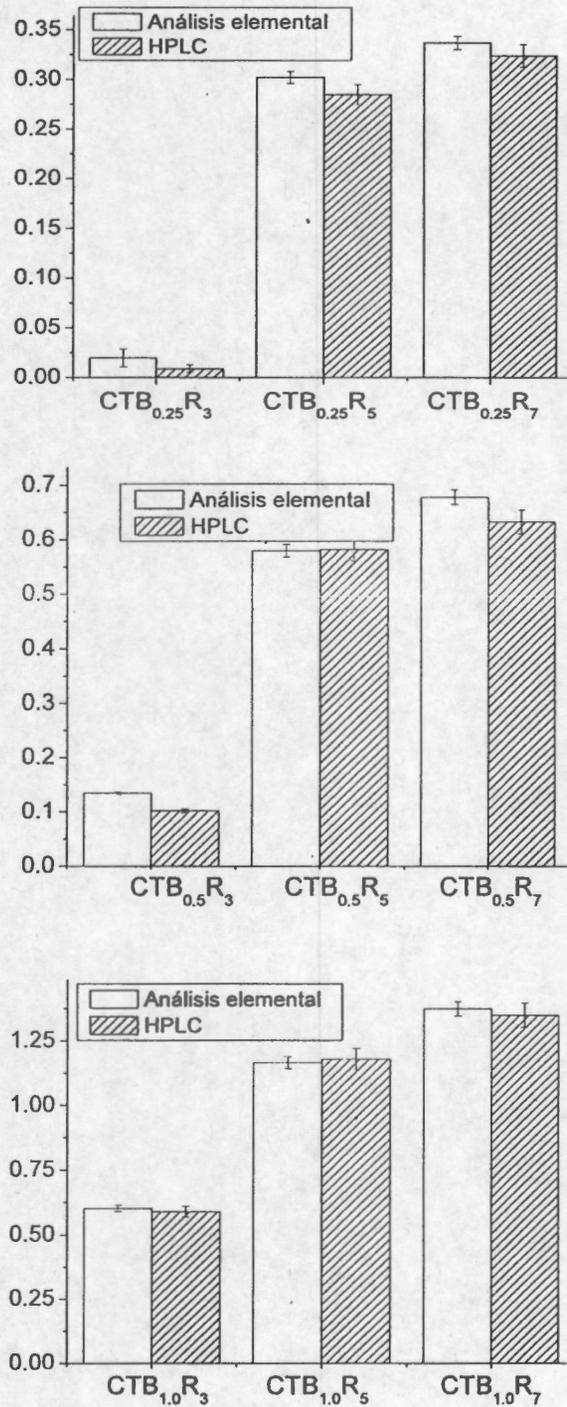


Figura 21. Comparación de la masa de goma arábica presente en las fases coacervadas de los complejos goma arábica-quitosano determinadas por análisis elemental y HPLC.

No existen diferencias significativas ($p < 0.03$) entre los métodos, independientemente de la concentración inicial de las mezclas de biopolímeros usadas. Estos resultados indican que la concentración de goma arábiga puede ser cuantificada analizando las mezclas hidrolizadas por HPLC o mediante el análisis elemental de la fase coacervada.

6.1.1.5 Turbidez.

La turbidez de la "fase en equilibrio" fue relacionada con la formación de una fase insoluble, la cual puede precipitar o permanecer suspendida por grandes o cortos periodos de tiempo. Si la fase insoluble permanece por grandes periodos de tiempo en suspensión, se le conoce como "complejos solubles". Lo anterior implica que las soluciones turbias contienen una mayor cantidad de macromoléculas en suspensión que las soluciones translucidas. Soluciones translucidas implican altos rendimientos de coacervación. Los datos de turbidez de las "fases en equilibrio" del sistema goma arábiga-quitosano para las diferentes relaciones y concentraciones totales de biopolímeros se muestran en la Figura 22.

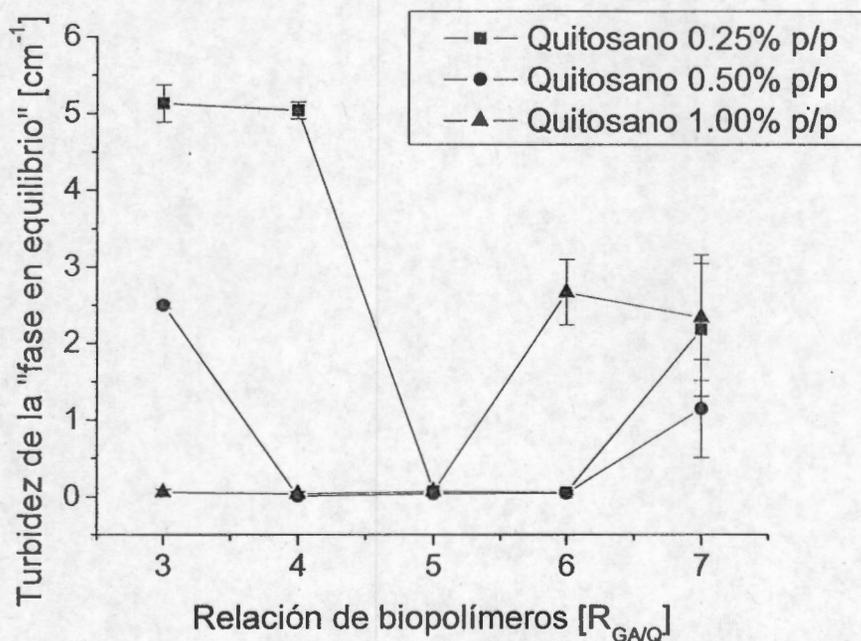


Figura 22. Turbidez de la "fase en equilibrio" en función de la relación y concentración de biopolímeros después de 72 horas.

Las mediciones de turbidez corresponden con los resultados de rendimiento. Como se puede ver en la Figura 22, la $R_{GA/Q}$ en la cual existe la menor turbidez en la “fase en equilibrio” ocurrió para cualquiera de las CTB_nR_5 . Este comportamiento de la “fase en equilibrio” indica la precipitación de los complejos eléctricamente neutros, los cuales han formado la fase coacervada. Asimismo, a $R_{GA/Q}$ por abajo o por encima de 5, la turbidez se incrementa, debido a la formación de complejos solubles.

Un biopolímero puede adsorberse en la superficie de partículas coloidales (por ejemplo, en otro biopolímero) como un resultado de: (a) una interacción Coulombica (partícula-partícula), (b) interacciones entre dipolos, (c) puentes de hidrógeno o (d) por interacciones de tipo Van der Waals. El biopolímero suele ser anclado a la superficie de las partículas coloidales en varios puntos, pero al mismo tiempo una parte de la cadena se encuentra disponible para expandirse en la solución. Cuando las partículas se encuentran juntas, existe la posibilidad para un biopolímero de formar puentes o enlaces de una macromolécula a otra, especialmente si la densidad de adsorción en la superficie de las partículas no es muy alta y el biopolímero es de gran masa molecular (Dickinson y McClements, 1996; Hunter, 2001). A altos valores de $R_{GA/Q}$, las moléculas de quitosano actúan como moléculas enlazantes entre las moléculas de goma arábiga (floculación por agotamiento), pero a bajos valores de $R_{GA/Q}$ sucede lo opuesto, con las moléculas de goma arábiga enlazando las moléculas de quitosano.

6.1.1.6 Movilidad electroforética.

Lo anterior puede ser corroborado con las mediciones electroforesis de la “fase en equilibrio” (Figura 23). Valores de electroforesis de la “fase en equilibrio” positivos indican que los grupos predominantes en la “fase en equilibrio” son los grupos amino libres (esto ocurre para valores menores a R_5), mientras que si los valores de electroforesis son negativos, predominan los grupos carboxilo libres en la “fase en equilibrio”, esto ocurre para valores mayores a R_5 . Cuando los valores de electroforesis se aproximan a cero significa que el fenómeno que predomina es la neutralización de las cargas entre ambos

biopolímeros. Este fenómeno ocurre a una relación de biopolímeros cercana a 5 gramos de goma arábica por gramo de quitosano, independientemente de la CTB_n usada (Figura 23).

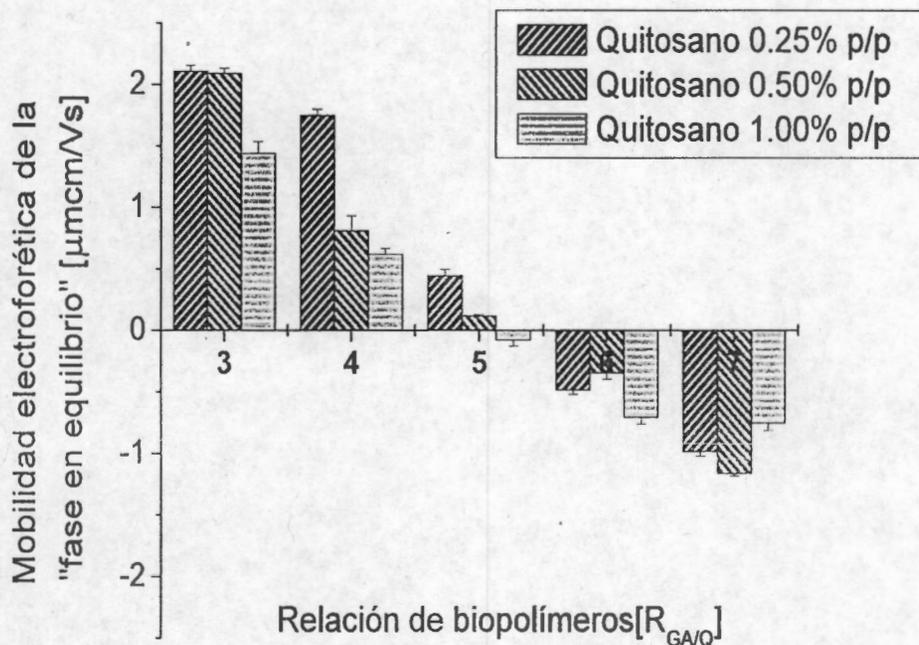


Figura 23. Movilidad electroforética de la fase en equilibrio en función de la relación y concentración de biopolímeros después de 72 horas.

Una vez más, se confirma que a bajas relaciones de biopolímeros (R_3 y R_4), cuando la CTB_n es relativamente baja (1–2% (p/p) para R_3 y 1.25–2.5% (p/p) para R_4) las interacciones entre la goma arábica y el quitosano son restringidas, probablemente por la rigidez de las cadenas macromoleculares, las cuales se encuentran cada vez más expandidas a estas diluciones. Relaciones de biopolímeros por mayores de 5 (R_5), a cualquier CTB_n , las cadenas macromoleculares poseen mayor flexibilidad y, por lo tanto, tienen la capacidad de interactuar con otras macromoléculas. Conforme se incrementa la cantidad de goma arábica en la mezcla, la movilidad electroforética de la “fase en equilibrio” disminuye, debido a la presencia de una mayor cantidad de grupos carboxilo, los cuales interactúan o se

neutralizan con los grupos amino del quitosano, disminuyendo la cantidad de macromoléculas con grupos ionizables libres, lo que ocasiona la disminución de la movilidad electroforética del sistema.

6.1.1.7 Rendimiento de coacervación en función del pH.

La formación del coacervado obedece a la disposición de cargas en la periferia de las macromoléculas. Uno de los factores que afectan la disposición de cargas en sistemas polielectrolíticos es el pH del medio. Cambios de pH en el sistema alteran directamente la conformación tridimensional (tamaño y forma), la disposición de grupos (interacción), la solubilidad de la macromolécula, sus propiedades fisicoquímicas, así como sus propiedades emulsionantes y formadoras de pared. Esto implica que existe un intervalo de pH en el cual las interacciones entre las macromoléculas son maximizadas. La Figura 24 muestra la influencia del pH en el rendimiento de coacervado, así como los datos de turbidez de la "fase en equilibrio" como función del pH del sistema.

Altos rendimientos de coacervación y bajos valores de turbidez son obtenidos en un intervalo de pH de 3.5–5.0. En este intervalo, la densidad de carga de ambas macromoléculas parece estar estequiométricamente balanceadas. A valores de pH por debajo de 3.5 y por encima de 5.0, el rendimiento de coacervación disminuye y la turbidez aumenta. El rendimiento de coacervado disminuye cuando los valores de pH se encuentran por debajo de 3.5 probablemente debido a dos factores: *i*) la protonación de los grupos carboxilo de la goma arábiga, y *ii*) la contracción de la estructura molecular, ambos factores parecen ser máximos a pH de 2.5, por lo que a este pH se suprime completamente la coacervación compleja.

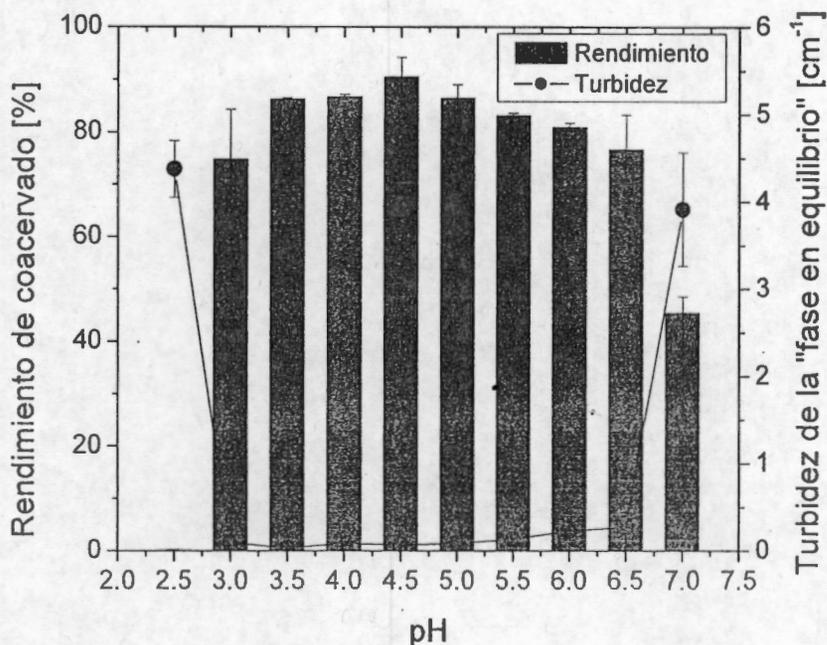


Figura 24. Coacervación compleja de goma arábiga y quitosano en función del pH, CTB_{6,0}R₅ después de 72 hrs.

A valores de pH arriba de 5, el rendimiento de coacervado disminuye debido a fenómenos asociados con la molécula de quitosano. Conforme la molécula de quitosano se aproxima a su valor de pK_a (~6.3–7.0), el grado de ionización y la solubilidad del quitosano en el medio disminuyen, por lo que pequeñas cantidades de quitosano precipitan cerca del pH de 7.0 (Figura 24). Además, existe un incremento en la curva de turbidez a pH 6.5 a 7.0 ocasionado por la alta solubilidad de la goma arábiga, la cual a este valor de pH se encuentra cerca de su máximo grado de ionización (Basu y col., 1951).

Todas las soluciones de biopolímeros independientemente de la CTB_n y el R_{GAAQ} exhiben un pH natural de 3.8 ± 0.1 . Esto implica que todas las mezclas de biopolímeros fueron estudiadas cerca del pH óptimo en el que se induce la máxima interacción del sistema. La dependencia de la coacervación con el pH ha sido reportada por varios autores (Schmitt y

col., 2005; Weinbreck y col., 2004; Weinbreck y col., 2003), con intervalos de pH donde las interacciones dependen fuertemente de la naturaleza de las macromoléculas como su densidad de carga y flexibilidad del macroión.

6.1.1.8 Rendimiento de coacervación en función de la concentración de NaCl

El rendimiento de coacervación fue inversamente proporcional a la concentración de sal [NaCl]. La Figura 25 muestra el rendimiento de coacervado y la turbidez de la fase en equilibrio en función de la concentración de NaCl para el sistema CTB_{6,0}R₅.

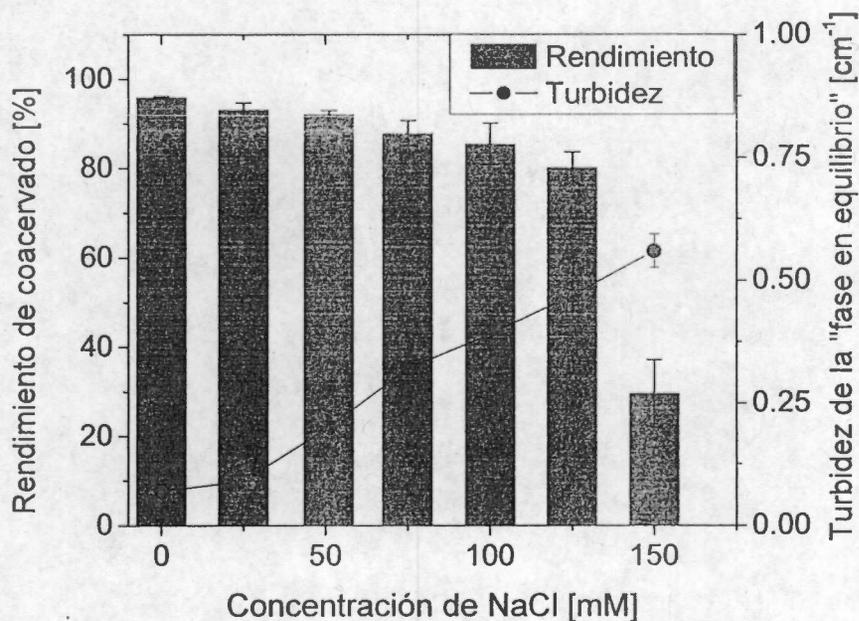


Figura 25. Coacervación compleja de la goma arábica y quitosano en función de la concentración de NaCl, CTB_{6,0}R₅ después de 72 hrs.

Altas concentraciones de sal escudan los pequeños iones libres, y suprimen la fuerza motriz para llevar a cabo la formación de complejos (Biesheuvel y Stuart, 2004; Overbeek y Voorn, 1957) reduciendo efectivamente los sitios disponibles para la interacción entre las macromoléculas (Figura 25). Conforme la concentración de cloruro de sodio se incrementa,

las interacciones entre las macromoléculas disminuyen, este fenómeno ha sido observado en el sistema goma arábica-proteína de suero de leche en donde la adición de concentraciones mayores a 54 mM de NaCl inhiben la formación de complejos (Weinbreck y col., 2004). La cantidad de sal agregada necesaria para disminuir drásticamente la coacervación es conocida como el punto de resistencia de sal, para el sistema goma arábica-quitosano fue de 150 mM de NaCl.

6.1.2 Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier.

La Figura 26 muestra los espectros de FTIR de la goma arábica, el quitosano y la fase coacervada (CTB_{6,0}R₅) en condiciones estándar, sin variaciones del pH y fuerza iónica.

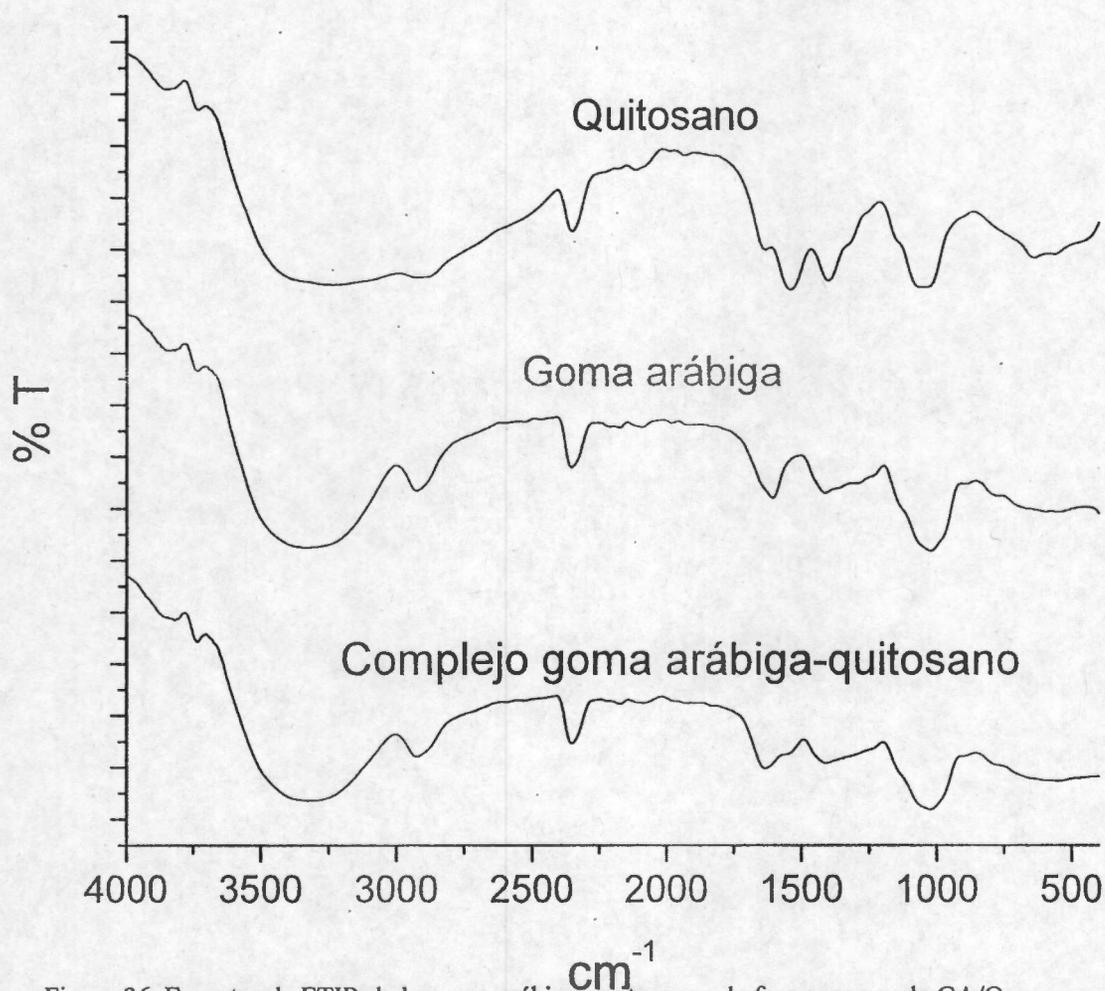


Figura 26. Espectro de FTIR de la goma arábica, quitosano y la fase coacervada GA/Q.

Los espectros de quitosano muestran bandas típicas a 3230 cm^{-1} referentes a los grupos $-\text{OH}$, estas bandas son amplias debido al acoplamiento con las bandas de $-\text{NH}$. Vibraciones de estiramiento de los enlaces $\text{C}-\text{H}$ a 2925 cm^{-1} (Dong y col., 2002). Una banda característica, amida I (grupos $-\text{CONH}_2$) correspondiente a las vibraciones de los

grupos acetilo a 1635 cm^{-1} ; una banda fuerte asociada a los grupos amida III ($-\text{NH}_3^+$ grupos) a 1535 cm^{-1} (Grant y col., 2006). La banda ubicada a 1405 cm^{-1} fue atribuida a las contribuciones en conjunto de flexiones de $-\text{OH}$ y $-\text{CH}$ (Feng y col., 2006). La banda a 1150 cm^{-1} corresponde a las vibraciones de alargamiento simétrico de $\text{C}-\text{O}-\text{C}$; las bandas a 1070 cm^{-1} y 1020 cm^{-1} corresponden a las vibraciones de alargamiento del grupo $\text{C}-\text{O}$ (de Vasconcelos y col., 2006).

La goma arábica muestra bandas típicas de grupos hidroxilo $-\text{OH}$ a 3330 cm^{-1} . Dos bandas intensas a 1600 cm^{-1} y 1420 cm^{-1} fueron atribuidas a las vibraciones de alargamiento asimétrico y simétrico de las sales de ácido carboxílico $-\text{COO}^-$. Pequeñas bandas cercanas a 1300 cm^{-1} fueron ocasionadas a vibraciones de grupos $-\text{CH}_2$. Las bandas a 1280 cm^{-1} y 1020 cm^{-1} fueron asociadas al alargamiento de los enlaces $\text{C}-\text{O}$.

El complejo de goma arábica/quitosano ($\text{CTB}_{6,0}\text{R}_5$) muestra una banda a 3295 cm^{-1} atribuida a vibraciones de los grupos $-\text{NH}_2$ y $-\text{OH}$. Como resultado de la interacción entre los biopolímeros, el espectro muestra cambios significativos en la región carboxilo-amida ($1700-1400$). Los grupos $-\text{NH}_3^+$ (banda a 1535 cm^{-1}) y las vibraciones de alargamiento asimétricos y simétricos del $-\text{COO}^-$ (1600 cm^{-1} y 1420 cm^{-1} , respectivamente) desaparecen, indicando una interacción electrostática entre los grupos amino del quitosano y los grupos carboxilo de la goma arábica ($-\text{NH}_3^+ \text{ } ^-\text{OOC}-$).

6.1.3 Reología de la fase coacervada.

Una vez obtenidas las condiciones para formar el sistema coacervado goma arábica-quitosano ($\text{CTB}_{6,0}\text{R}_5$), se procedió a determinar el comportamiento reológico del sistema en función del pH. Las curvas oscilatorias de barrido en el tiempo fueron usadas para determinar el tiempo requerido para que las muestras alcancen y mantengan la estabilidad en el sistema. Este tiempo permite la reconstrucción de la estructura de las muestras,

además de indicar efectos de evaporación del solvente. A las fases coacervadas les tomo alrededor de 40 minutos alcanzar valores constantes del módulo complejo (G^*). Con base en estos experimentos, se fijó el tiempo de espera para efectuar mediciones de oscilación en 50 minutos, para todas las formulaciones. Posteriormente, se realizaron las pruebas de amplitud o de deformación (0.01–100%) en donde se determinó la dependencia de G^* en función de la deformación a diferentes pH (Figura 27).

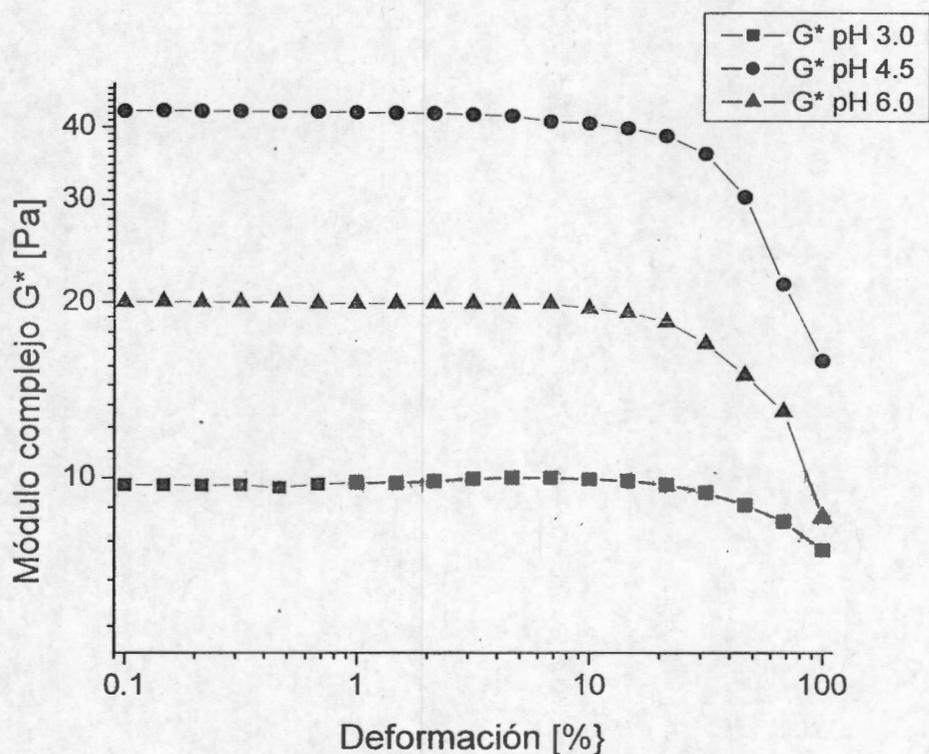


Figura 27. Módulo complejo de la fase coacervada en función de la deformación, a pH 3, 4.5 y 6.

En esta prueba se ubicó un intervalo de deformación, en donde G^* es independiente de la deformación aplicada, conocido como la *región lineal viscoelástica* (RLVE) (Pal, 2006; Steffe, 1996). La RLVE indica qué tanto puede deformarse la muestra sin observar cambios en su estructura. En todas las muestras la RLVE fue ubicada a deformaciones menores a 10% (Figura 27). Con base en estos resultados, se decidió emplear una deformación

constante de 1% para realizar las pruebas de barrido de frecuencia. La Figura 28 muestra la respuesta viscoelástica de las fases coacervadas a diferentes valores de pH durante los experimentos de oscilación a 25 °C y una $\gamma \sim 1\%$.

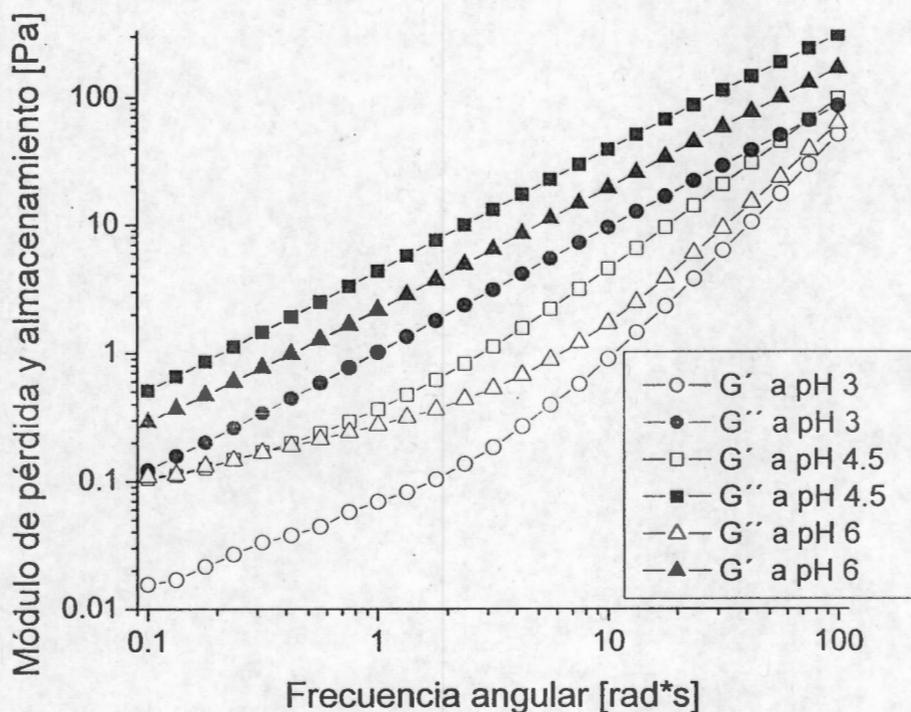


Figura 28. Curvas de amplitud de las fases coacervadas a 25 °C y una $\omega \sim 10$ rad/s.

El barrido de frecuencia permite determinar las características viscoelásticas de una muestra en función del tiempo, a partir del módulo de almacenamiento (G' → componente elástico de la muestra) y del módulo de pérdida (G'' → componente viscoso de la muestra). Cualquiera de los módulos puede ser dominante a una frecuencia en particular, indicando si el material completamente estructurado tiene un comportamiento elástico o viscoso, en un proceso de similar escala de tiempo (Steffe, 1996). Los coacervados son materiales viscoelásticos, el módulo de pérdida (G'') fue mayor al módulo de almacenamiento (G') independientemente de la frecuencia, exhibiendo un comportamiento más viscoso que

elástico. Todas las curvas mostraron ser dependientes de la frecuencia, lo que implica que los coacervados se comportan como líquidos viscosos. Este comportamiento ha sido observado en los sistemas albúmina de suero de bovino – poli(cloruro de dialildimetil amonio) (Bohidar y col., 2005) y suero de leche-goma arábica (Weinbreck y col., 2004). La formación del gel esta siempre relacionada con la agregación de macromoléculas y una disminución del efecto de volumen excluido (Hill y col., 1998), los cuales se encuentran íntimamente ligados al incremento en la concentración de los biopolímeros en la fase coacervada, la pérdida de solubilidad del complejo, la disminución en cantidad y movilidad de los espacios entre partículas. La viscoelasticidad de la fase coacervada como una función del pH del medio varia conforme al siguiente orden: $4.5 > 6.0 > 3.0$. Cuando dos macromoléculas opuestamente cargadas interaccionan asociativamente originan la formación de redes macromoleculares (coacervados), entrapando moléculas de agua es su interior (Burgess, 1990). El agua presente en el coacervado contribuye a estructura de los complejos. La densidad relativa de la fase coacervada a 25°C fue de 1.077 ± 0.005 , 1.100 ± 0.004 y 1.065 ± 0.005 , para los valores de pH de 3.0, 4.5 y 6.0, respectivamente. Este hecho aunado a un mayor potencial de atracción electrostática de las macromoléculas ($\text{pH } 4.5 > 3.0 > 6.0$) explica el comportamiento reológico de los complejos.

Las propiedades reológicas y estructurales de los geles entre mezclas de biopolímeros son dependientes del comportamiento de los biopolímeros en solución, los cuales son influenciados por factores ambientales (Ould y Turgeon, 2000). La modificación del pH en el sistema goma arábica-quitosano modifica las propiedades viscoelásticas de los complejos permitiendo el diseño de geles con diferentes respuestas al corte los cuales pueden ser usados en aplicaciones de las industrias farmacéuticas, de cosméticos y de los alimentos.

6.1.4 Microscopía electrónica de barrido.

Se observó la morfología y estructura de las muestras de goma arábica, quitosano y la fase coacervada (CTB_{6,0}R₅). Las Figuras 29a y 29b muestran las micrografías de la goma arábica y quitosano, respectivamente.

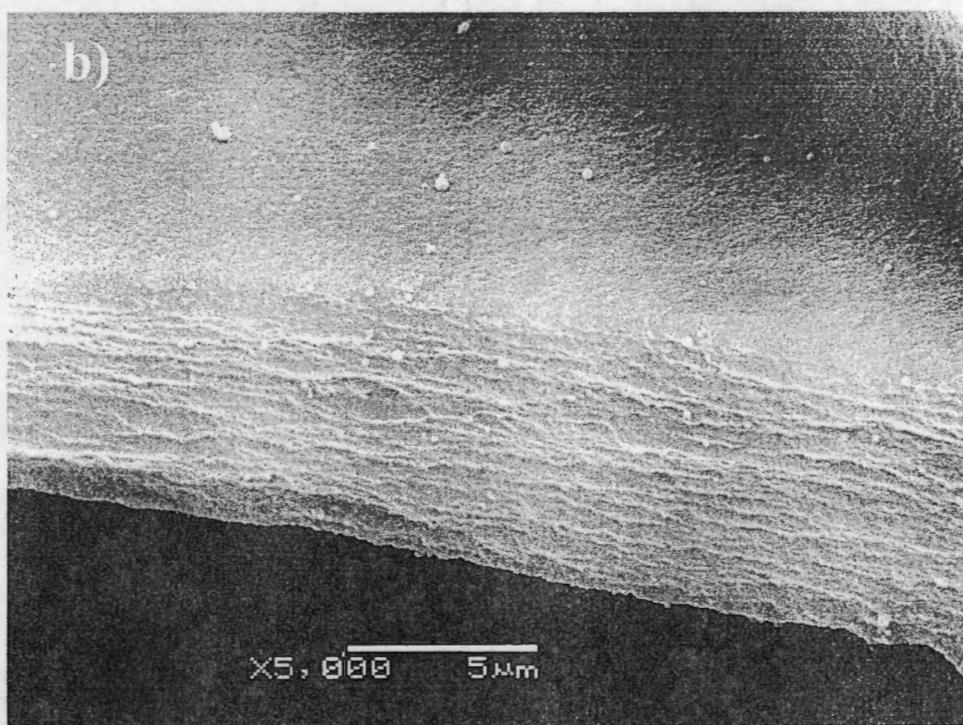
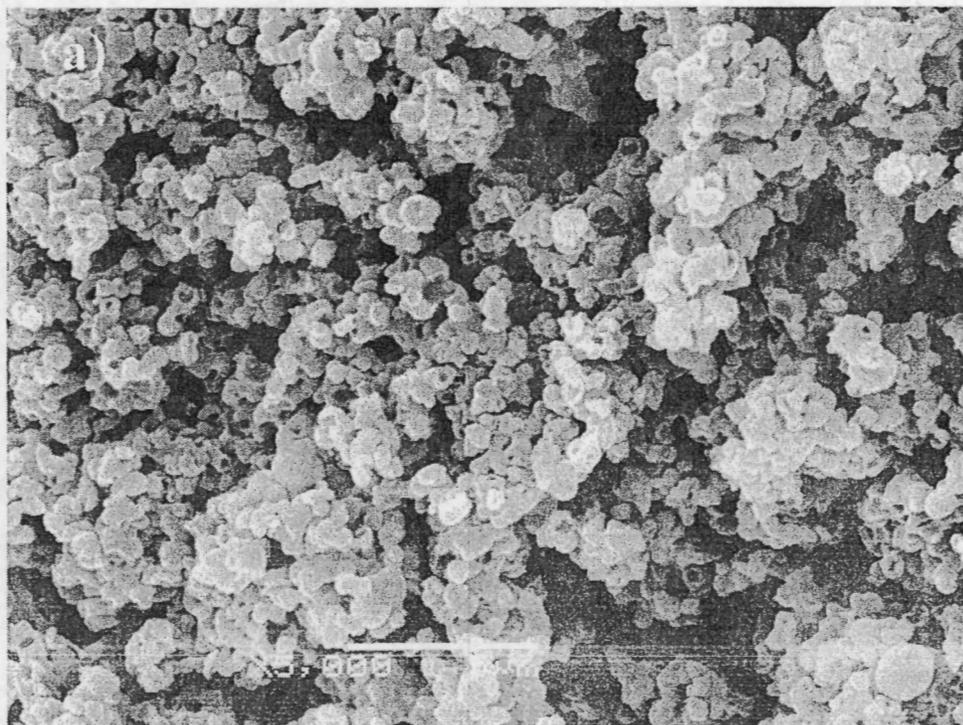


Figura 29. a) Micrografía de goma arábica; b) micrografía de quitosano.

La Figura 29a muestra una micrografía de goma arábica, la cual es caracterizada por una red polisacárida globular aleatoria. La Figura 29b muestra una micrografía de quitosano caracterizada por estructuras compactas laminares multicapas. Estas estructuras han sido observadas por Pinotti y col., (2007).

La Figura 30 muestra una microscopía de los complejos de goma arábica-quitosano. Se puede observar la formación de un gel complejo caracterizado por una red polisacárida globular entrecruzada con el quitosano modificando considerablemente la morfología y características fisicoquímicas del complejo. El complejo polisacárido muestra estructuras porosas aleatorias en donde estuvieron alojadas las moléculas de agua. Estas moléculas contribuyen a comportamiento viscoso del coacervado.

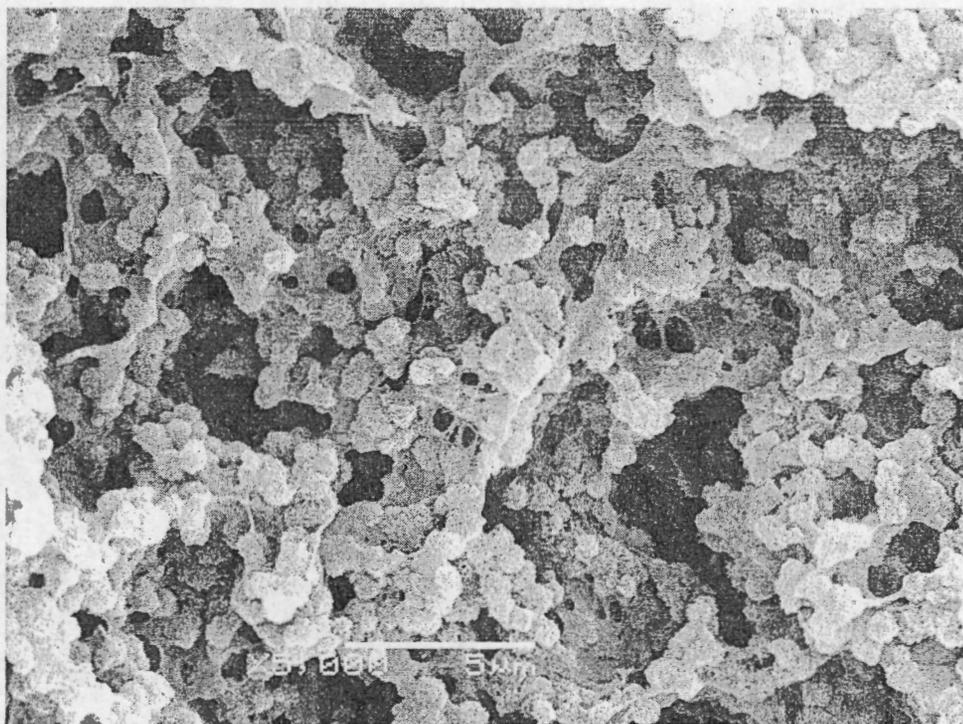


Figura 30. a) Micrografía de la fase coacervada goma arábica-quitosano CTB_{6,0}R₅.

6.2 **SISTEMAS DISPERSOS.**

La goma arábica es uno de los materiales de preferencia empleado comúnmente en la encapsulación de aceites esenciales y como agente emulsionante en bebidas (Akhtar y Dickinson, 2007). Una de las desventajas de la goma arábica como emulsionante es que se deben de usar cantidades relativamente altas comparadas con otros biopolímeros (Harnsilawat y col., 2006; Beristain y col., 1996). Por ejemplo, para producir una emulsión estable aceite-en-agua con 12.5 % (p/p) de fase dispersa es necesario usar 20 % (p/p) de goma arábica (Harnsilawat y col., 2006). Asimismo, para producir microcápsulas por secado por aspersión es necesario emplear relaciones entre 3:1 y 4:1 (goma arábica : material encapsulado) (Rodríguez, 2005).

Las interacciones electrostáticas de polisacáridos cargados en las superficies de biopolímeros de carga opuesta anclados en los glóbulos de la emulsión (recubrimiento capa-por-capla) puede aumentar la estabilidad de los sistemas (Guzey, 2007; Harnsilawat y col., 2006; Klinkesorn y col., 2005; Girard y col., 2002a; Kato y col., 1989). Esta técnica de recubrimiento produce membranas interfaciales gruesas, las cuales ayudan a estabilizar y reducir la oxidación de los lípidos emulsionados (Klinkesorn y col., 2005). Asimismo, asociaciones atractivas (condiciones específicas de relación y concentración de biopolímeros, pH y fuerza iónica) conllevan a la formación de matrices coacervadas (gel complejo), las cuales, al encontrarse adsorbidos en las interfases aceite agua favorecen la formación de emulsiones O/W por coacervación. De esta manera el conocimiento de los principios fisicoquímicos que gobiernan la formación y propiedades de los complejos interfaciales adsorbidos es importante para establecer las condiciones óptimas requeridas para producir emulsiones multicapa que exhiban las propiedades deseadas.

6.2.1 Formulación de emulsiones simples O/W por coacervación

Esta sección describe la formación y caracterización de emulsiones simples O/W por el método de coacervación compleja. En la sección 6.2.2 fueron investigadas las condiciones de preparación (velocidad de agitación y concentración de goma arábica) de la emulsión O/W_{GA}. En la sección 6.2.3 fue evaluada la formación de una emulsión simple con quitosano. En la sección 6.2.4 fue desarrollada la metodología para producir emulsiones simples por coacervación compleja con base en los experimentos de las secciones anteriores. En la sección 6.2.5 fueron caracterizadas reológicamente las emulsiones simples O/W_{GAQ} en función de la concentración de la fase dispersa con la finalidad de seleccionar la formulación adecuada para secar.

6.2.2 Emulsiones simples con goma arábica (O/W_{GA})

Se formularon emulsiones aceite-en-água empleando goma arábica como material emulsionante (O/W_{GA}). A partir de un experimento factorial 2² fueron evaluados los efectos de la concentración de goma arábica y la velocidad de agitación en el tamaño y distribución de los glóbulos de la emulsión O/W_{GA} (Figura 31).

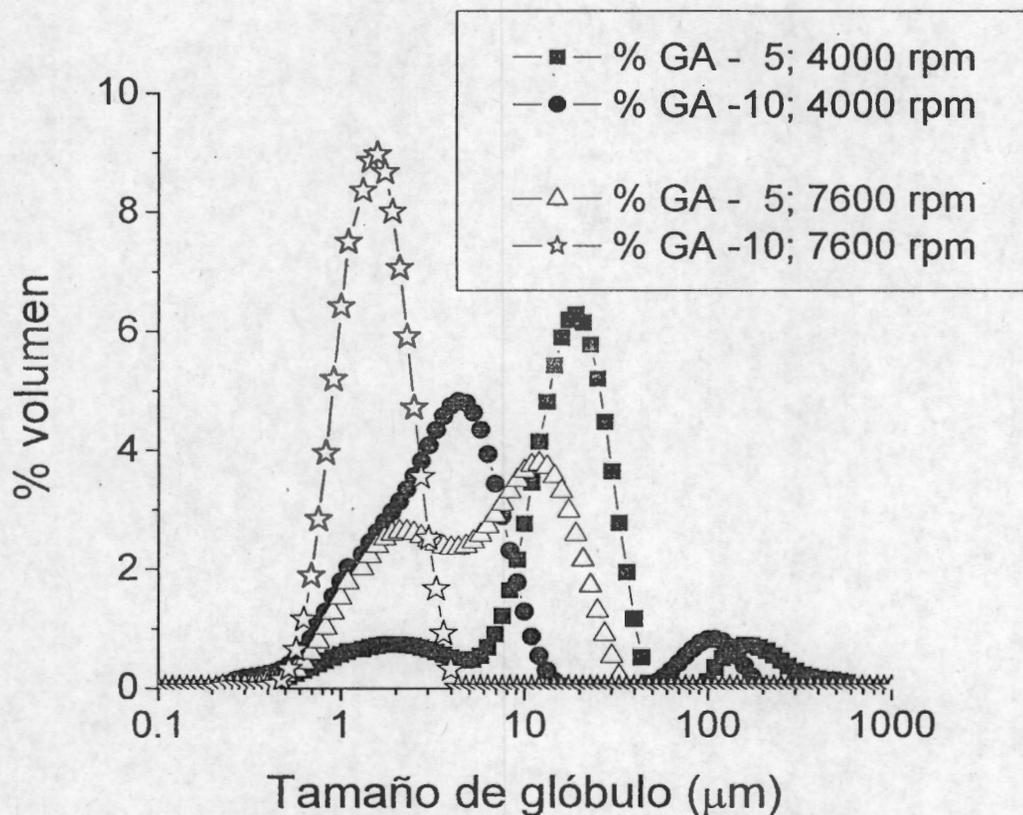


Figura 31. Tamaño y distribución de los glóbulos de la emulsión O/W_{GA} en función de la velocidad de agitación y concentración de goma arábica.

Las emulsiones producidas a 4000 rpm con concentraciones de goma arábica del 5% y 10% (p/p) exhibieron distribuciones multimodales, caracterizadas por tres diferentes

distribuciones: pequeñas ($< 5 \mu\text{m}$), medianas ($5 \mu\text{m} < \text{diámetro} < 50 \mu\text{m}$) y grandes ($> 50 \mu\text{m}$). Cuando se empleó una concentración de goma arábica del 5% (p/p) y 7600 rpm, fueron producidas emulsiones con glóbulos pequeños y medianos. Cuando se empleó una concentración de goma arábica del 10% (p/p) y 7600 rpm, fueron producidas emulsiones que contenían únicamente glóbulos de tamaño pequeño con una distribución monomodal y relativamente homogénea. Generalmente, una emulsión con tamaños de glóbulos pequeños presenta una mayor estabilidad a la coalescencia (Walstra, 2003). Los diámetros medios volumétricos ($D_{4,3}$) y promedio superficial ($D_{3,2}$), la amplitud de la distribución y las cinéticas de coalescencia de las emulsiones de goma arábica se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Tamaños promedios volumétricos ($D_{4,3}$) y promedio superficial ($D_{3,2}$), amplitud de la distribución y cinéticas de coalescencia de las emulsiones O/W_{GA} en función de la concentración de goma arábica y la velocidad de agitación.

Formulación	$D_{4,3}$ (μm)	$D_{3,2}$ (μm)	Amplitud de la distribución	Cinética de coalescencia (s^{-1})
5 % GA y 4000 rpm	30.01 ± 0.15	6.70 ± 0.20	2.03 ± 0.10	895×10^{-8}
10 % GA y 4000 rpm	7.87 ± 0.05	2.63 ± 0.05	2.52 ± 0.03	47.8×10^{-8}
5 % GA y 7600 rpm	10.84 ± 0.13	3.42 ± 0.01	2.20 ± 0.08	63.5×10^{-8}
10 % GA y 7600 rpm	1.75 ± 0.03	1.53 ± 0.01	0.97 ± 0.01	5.05×10^{-8}

Las diferencias en los diámetros de las emulsiones O/W_{GA} (Tabla 4) pueden ser explicadas en el proceso de formación de las emulsiones, constituido principalmente por dos etapas. La primera etapa consiste en la deformación y ruptura de la fase dispersa dando origen a los glóbulos de la emulsión, los cuales incrementan su área interfacial en el sistema disperso; la segunda etapa, consiste en la estabilización de la nueva interfase a partir de la adsorción en la interfase (aceite-agua) del material de barrera (Tesch y Schubert, 2002; McClements, 1999). La presencia de la goma arábica (polisacárido de alto peso molecular) proporciona una mejor estabilidad a largo plazo, probablemente por la inmovilización de los glóbulos de la emulsión en una red estabilizada por repulsión electrostática o efectos estéricos entre las moléculas (Dickinson, 1992). La formulación que presentó la menor polidispersidad, así como la menor cinética de coalescencia fue obtenida empleando: 10 % de goma arábica y

7600 rpm (Tabla 4). Estas condiciones de formación de la emulsión fueron seleccionadas para realizar los experimentos posteriores.

6.2.3 Emulsiones simples con quitosano (O/W_Q)

Se formuló una emulsión simple con 20 % (p/p) de fase dispersa a 7600 rpm x 5 minutos empleando quitosano como material encapsulante O/W_Q. En la Figura 32A se muestran la distribución y tamaño de los glóbulos de la emulsión O/W_Q. Los glóbulos de la emulsión O/W_Q mostraron valores de iniciales de $D_{3,2} = 8.21 \mu\text{m}$ y $D_{4,3} = 19.33 \mu\text{m}$ con una amplitud de la distribución de 0.91. La emulsión O/W_Q fue caracterizada por una distribución bimodal compuesta por glóbulos de tamaño pequeño (~1% v/v) en un intervalo de 0.4 a 3 μm y glóbulos de tamaño medianos (~16% v/v) en un intervalo de 10 a 40 μm .

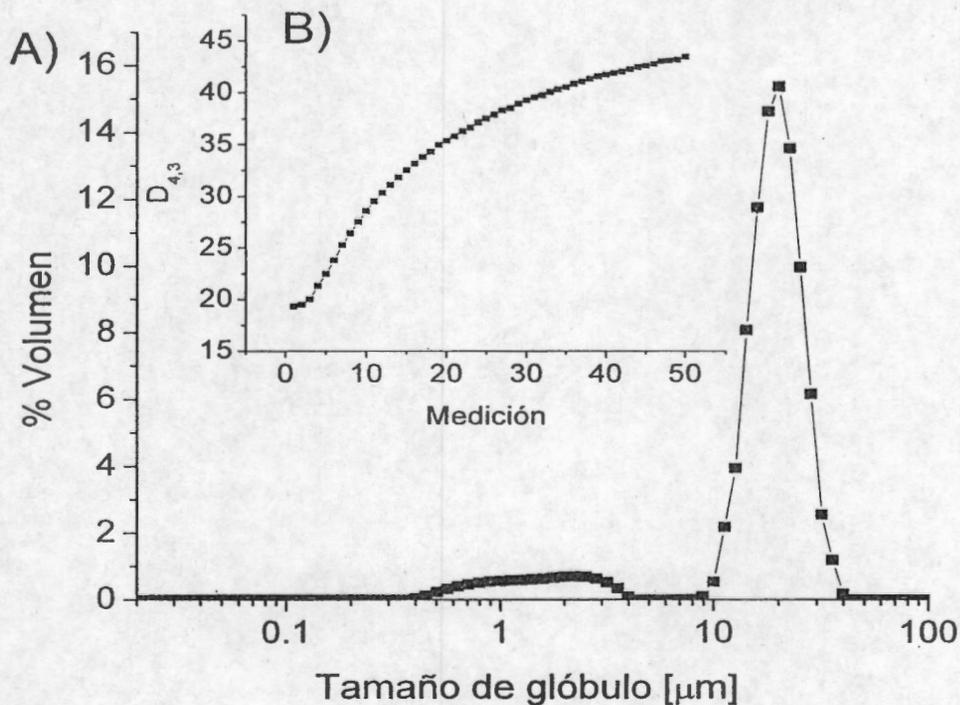


Figura 32. A) Distribución de los glóbulos de emulsión O/W_Q; B) tendencia de medición de los glóbulos de emulsión O/W_Q.

Sin embargo, durante el proceso de medición se observó un incremento de los diámetros de la emulsión O/W_Q (Figura 32B). Este hecho indica que el sistema es altamente inestable a la coalescencia. Durante el proceso de medición la emulsión O/W_Q fue mezclada produciendo colisiones entre los glóbulos, dichas colisiones aceleraron los procesos de coalescencia (McClements, 2007; Walstra, 2003). Schulzy col., (1998) y Rodríguez y col., (2002) estudiaron la formación y estabilidad de emulsiones de quitosano con diferente grado de acetilación, observando la formación de emulsiones relativamente estables a pequeñas escalas de tiempo (horas). La emulsión O/W_Q presentó una menor estabilidad a la coalescencia en comparación con la emulsión O/W_{GA} a las mismas condiciones de fase dispersa y homogenización, por lo que esta última retendrá con mayor eficiencia la fase oleosa. Para obtener la máxima protección de un material encapsulado, es crucial que los glóbulos de la emulsión presenten el menor tamaño posible y estabilidad contra la coalescencia, de esta manera, emulsiones poco estables resultan en encapsulados con altos contenidos de aceite superficial y una baja retención de compuestos volátiles (Jafari y col., 2007; Reineccius, 2004).

6.2.4 Emulsiones simples por coacervación compleja (O/W_{GAQ})

La formación de emulsiones simples a partir de la coacervación compleja entre la goma arábica y el quitosano (O/W_{GAQ}) se llevó a cabo a partir de la adsorción secuencial de los biopolímeros en la interfase. Este proceso consistió en dos etapas: en la primera etapa fue formada una emulsión simple O/W_{GA} con una fase dispersa del 20% a 7600 rpm durante 5 min, usando 10 % de goma arábica (sección 6.2.2); en la segunda etapa, la emulsión O/W_{GA} fue redispersada en una dispersión de quitosano al 2% (p/p). El resultado de la redispersión fue la interacción entre las moléculas de goma arábica y las moléculas de quitosano ocasionando la floculación de los glóbulos de la emulsión O/W_{GAQ} . (Figura 33).

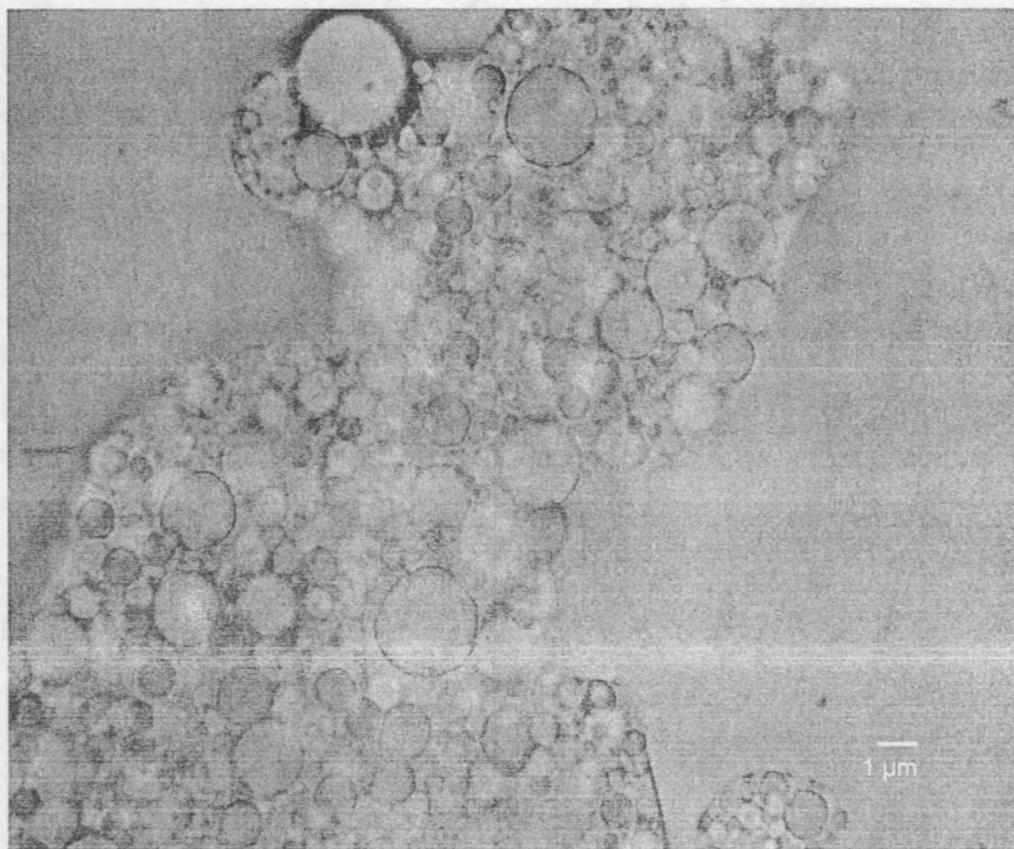


Figura 33. Microfotografía de la emulsión por coacervación O/W_{GAQ} , amplificación $\times 100$.

El $D_{4,3}$ de los glóbulos de la emulsión O/W_{GAQ} fue de $2.34 \pm 0.19 \mu\text{m}$, con una amplitud de la distribución de $2.0 \pm 0.23 \mu\text{m}$ y una cinética de coalescencia de $6.9 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$. La formación de la emulsión O/W_{GAQ} bajo las mismas condiciones de formulación que la coacervación de los polisacáridos solos, refuerza la idea de que la parte proteica de la goma arábica es la encargada de adsorberse en la interfase aceite-agua formando la emulsión O/W_{GA} , mientras que los grupos carboxilo presentes en la goma son los encargados de interactuar con los grupos amino del quitosano para formar la emulsión O/W_{GAQ} . Este fenómeno ha sido atribuido a la neutralización de las cargas de los biopolímeros y/o a efectos de floculación por agotamiento (Harnsilawat y col., 2006), lo cual conduce a fuertes entrecruzamientos interpartículas (Dickinson, 2001).

6.2.5 Efecto de la fase dispersa en la formulación de emulsiones O/W_{GAQ}

Se formularon tres emulsiones O/W_{GAQ} que difieren en sus contenidos de fase dispersa: ϕ_{10} , ϕ_{20} y ϕ_{40} (donde el subíndice representa el porcentaje en peso de la fase dispersa presente en la emulsión). La fracción volumen de la fase dispersa determina las propiedades reológicas de las emulsiones (Walstra, 2003). El incremento de la fase oleosa ocasionó cambios en la densidad y viscoelasticidad de los sistemas emulsionados O/W_{GAQ}. Las emulsiones ϕ_{10} y ϕ_{20} presentaron sedimentación, mientras que la formulación ϕ_{40} presentó cremado.

La estabilidad de las emulsiones simples O/W esta correlacionada con las propiedades reológicas de los biopolímeros adsorbidos en las interfases aceite-agua (Vernon-Carter y Sherman, 1981). Algunos autores han observado la influencia de las interacciones proteína-polisacárido en las propiedades reológicas de las emulsiones simples O/W, encontrando efectos de engrosamiento en los biopolímeros adsorbidos en las interfases, así como la formación de estructuras tipo gel de las emulsiones (Valdez y col., 2006; Dickinson y Pawlowsky, 1995). Las curvas oscilatorias de barrido en el tiempo para las emulsiones O/W_{GAQ} requirieron de 10 a 15 min para alcanzar valores constantes de G^* . Por esta razón, el tiempo de espera para efectuar mediciones de oscilación se fijó en 20 minutos. La Figura 34 muestra las curvas de amplitud de las emulsiones O/W_{GAQ} para los diferentes contenidos de la fase dispersa.

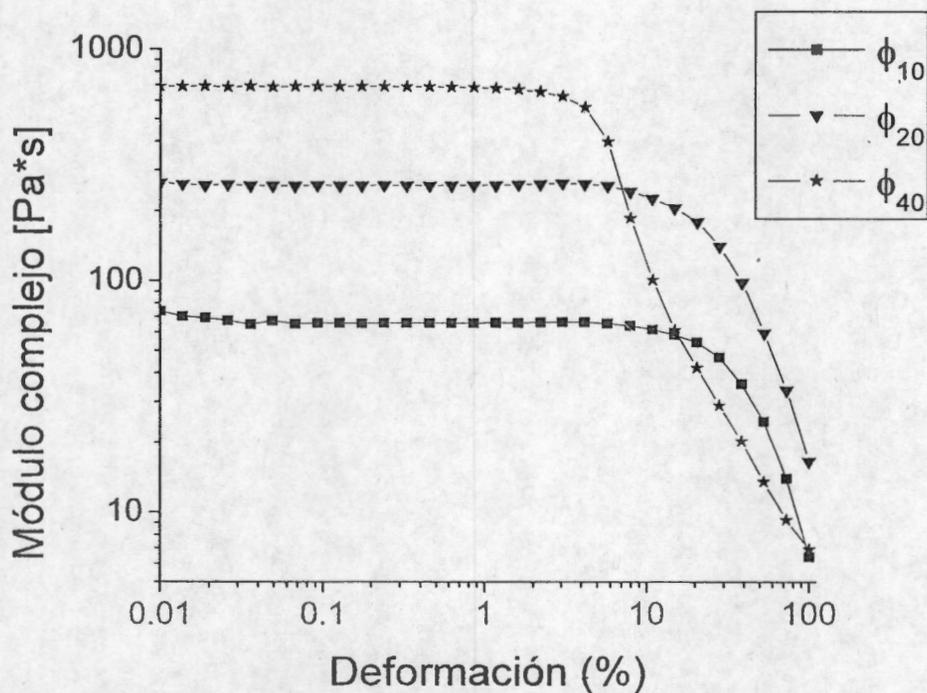


Figura 34. Curvas de amplitud para las emulsiones simples formuladas por coacervación compleja.

Las RLVE de las emulsiones por coacervación fueron ubicadas a deformaciones (γ) inferiores de 8%, 4% y 2% para ϕ_{10} , ϕ_{20} y ϕ_{40} , respectivamente (Figura 34). La disminución de la RLVE con el incremento de la fase dispersa ha sido observada en emulsiones O/W (Pal, 2006). Con base en estos experimentos se decidió emplear una deformación de 1% para realizar las mediciones de barrido de frecuencia para todas las emulsiones. La Figura 35 muestra la respuesta viscoelástica de las emulsiones O/W_{GAQ} para los diferentes contenidos de la fase dispersa, durante los experimentos de oscilación (curvas de frecuencia) a 25 °C y una $\gamma \sim 1\%$.

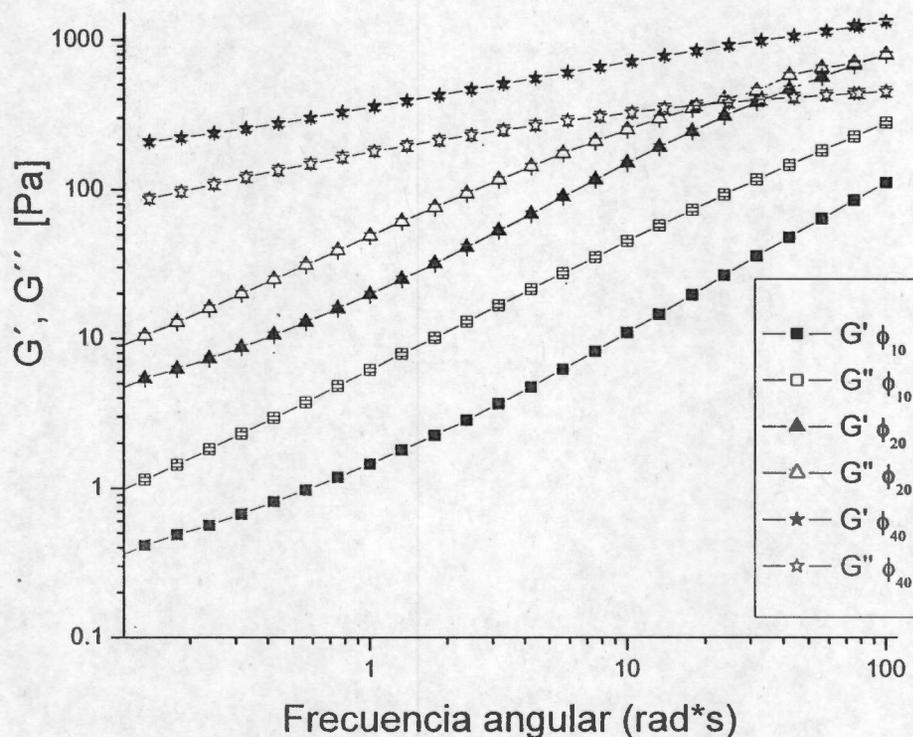


Figura 35. Curvas de frecuencia para las emulsiones simples formuladas por coacervación compleja.

Las emulsiones coacervadas forman un gel complejo a partir de las interacciones entre dos o más moléculas adsorbidas a la superficie de un mismo glóbulo de la emulsión (interacciones intraglobulares) o entre moléculas adsorbidas en diferentes glóbulos (interacciones interglobulares), o entre moléculas adsorbidas con moléculas no adsorbidas (Dickinson y McClements, 1996). Dichas interacciones juegan un papel importante en las propiedades reológicas del gel, las cuales pueden actuar como promotoras o inhibidoras de estructura dependiendo de la naturaleza de las interacciones entre los emulsionantes adsorbidos en los glóbulos y los polímeros que componen la estructura gelada (McClements y col., 1993).

Las formulaciones ϕ_{10} y ϕ_{20} muestran el comportamiento de sistemas débilmente estructurados (gel viscoso), ya que el módulo viscoso domina al módulo elástico en todo el intervalo de frecuencias (Figura 35). Este tipo de estructuras pueden actuar como barreras para minimizar la deformación o ruptura de los glóbulos de la emulsión. Este comportamiento ha sido observado en emulsiones de goma arábiga (15% p/p) con aceite esencial de limón (Valdez y col., 2006). La emulsión ϕ_{40} puede clasificarse como un sistema bien estructurado (geles fuertes). En esta emulsión las partículas se encuentran fuertemente asociadas produciendo una red estructurada de glóbulos gelados los cuales incrementan la fuerza del gel, el módulo de almacenamiento (G') es mayor al módulo de viscoso (G''), ambos ligeramente dependientes de la frecuencia. Este comportamiento es característico de emulsiones estabilizadas con biopolímeros en las que se desarrolla una red elástica ocasionada por un proceso de floculación por puenteo (Moros y col., 2002).

El comportamiento viscoso a altas frecuencias ($G'' > G'$) de las emulsiones ϕ_{10} y ϕ_{20} indican que estas formulaciones pueden ser utilizadas en aplicaciones de secado por aspersión. A diferencia de la formulación ϕ_{40} , la cual exhibe un comportamiento elástico a altas frecuencias ($G' > G''$), por lo que esta emulsión puede presentar malas propiedades de aspersión. Sin embargo, el comportamiento reológico de esta última emulsión indica que podría ser empleada en aplicaciones de la industria cosmética, debido a que exhibe mejores propiedades para untar. Con base en estos resultados se decidió secar por aspersión la emulsión ϕ_{20} .

6.3 MICROENCAPSULACIÓN

En esta sección se muestran los resultados obtenidos para el secado por aspersión de las emulsiones O/W_{GA} y O/W_{GAQ} . Ambas emulsiones contenían 20% (p/p) de fase dispersa. Las condiciones de homogenización fueron de 7600 rpm x 5 minutos. Posteriormente, ambas emulsiones fueron secadas por aspersión y observadas con un microscopio electrónico de barrido con la finalidad de observar la microestructura de las microcápsulas obtenidas.

6.3.1 Microencapsulación por secado por aspersión

Con base en los experimentos de las secciones 6.2.2 y 6.2.5 fueron obtenidos los microencapsulados de las emulsiones O/W_{GA} y O/W_{GAQ} empleando la técnica de secado por aspersión. Se empleó un microscopio electrónico de barrido para observar la microestructura de las microcápsulas obtenidas. Las Figuras 36 y 37 muestran las micrografías de las microcápsulas obtenidas por aspersión de la emulsión O/W_{GA} con una amplificación de $\times 150$ y $\times 2500$, respectivamente.

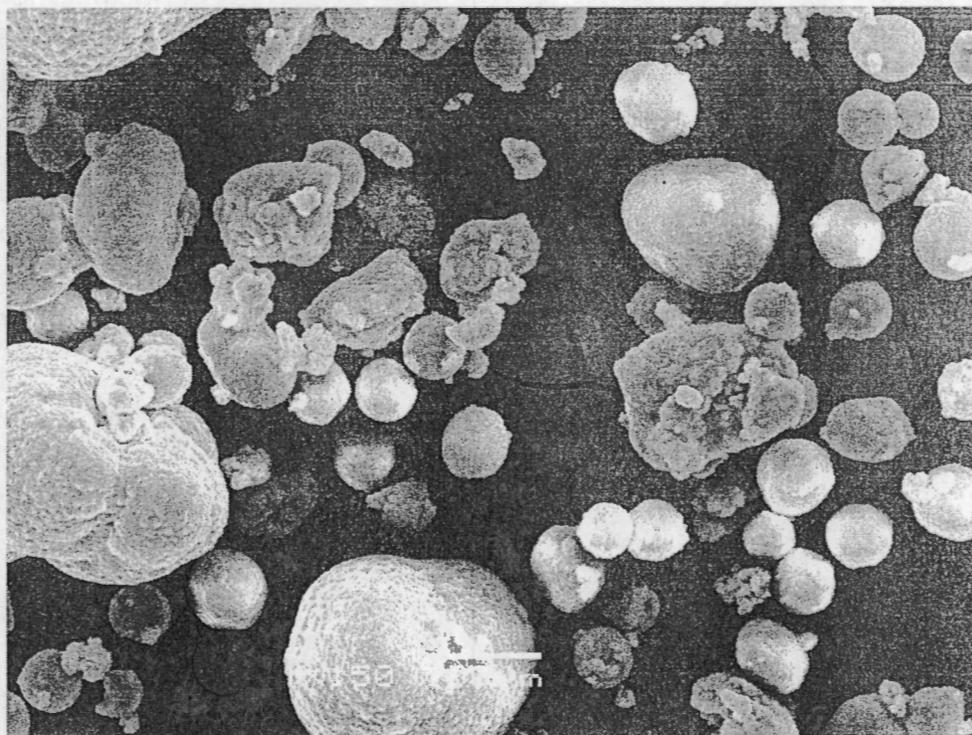


Figura 36. Microcápsulas obtenidas de la emulsión O/W_{GA} , amplificación: $\times 150$

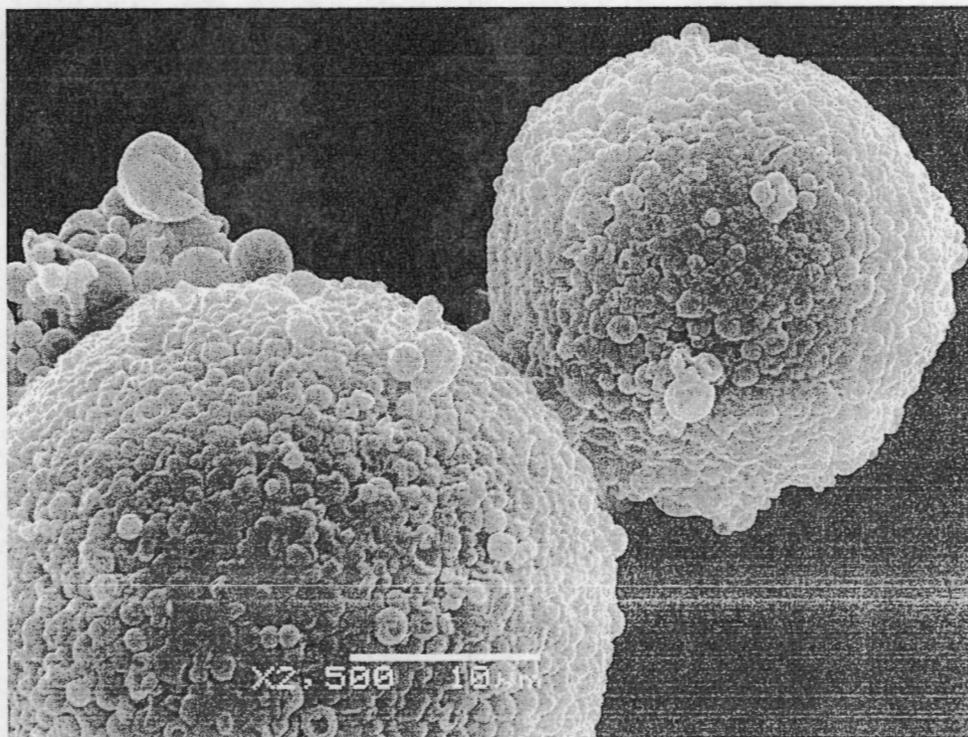


Figura 37. Microcápsulas obtenidas de la emulsión O/W_{GA}, amplificación $\times 2500$

Se puede observar la formación de microcápsulas esferoidales polidispersas con diámetros promedio que van de 50 a 250 μm (Figura 36). La Figura 37 muestra la que estas microcápsulas están constituidas por un sinnúmero de microesferas aglomeradas, debido al secado de las gotas de emulsión O/W_{GA} que contenían un gran número de glóbulos de emulsión O/W_{GA} con un $D_{4,3} = 0.74 \mu\text{m}$.

Las Figuras 38a y 38b muestran las microcápsulas obtenidas por el secado por aspersion de la emulsión O/W_{GAQ} con una amplificación de $\times 150$ y $\times 2500$, respectivamente.

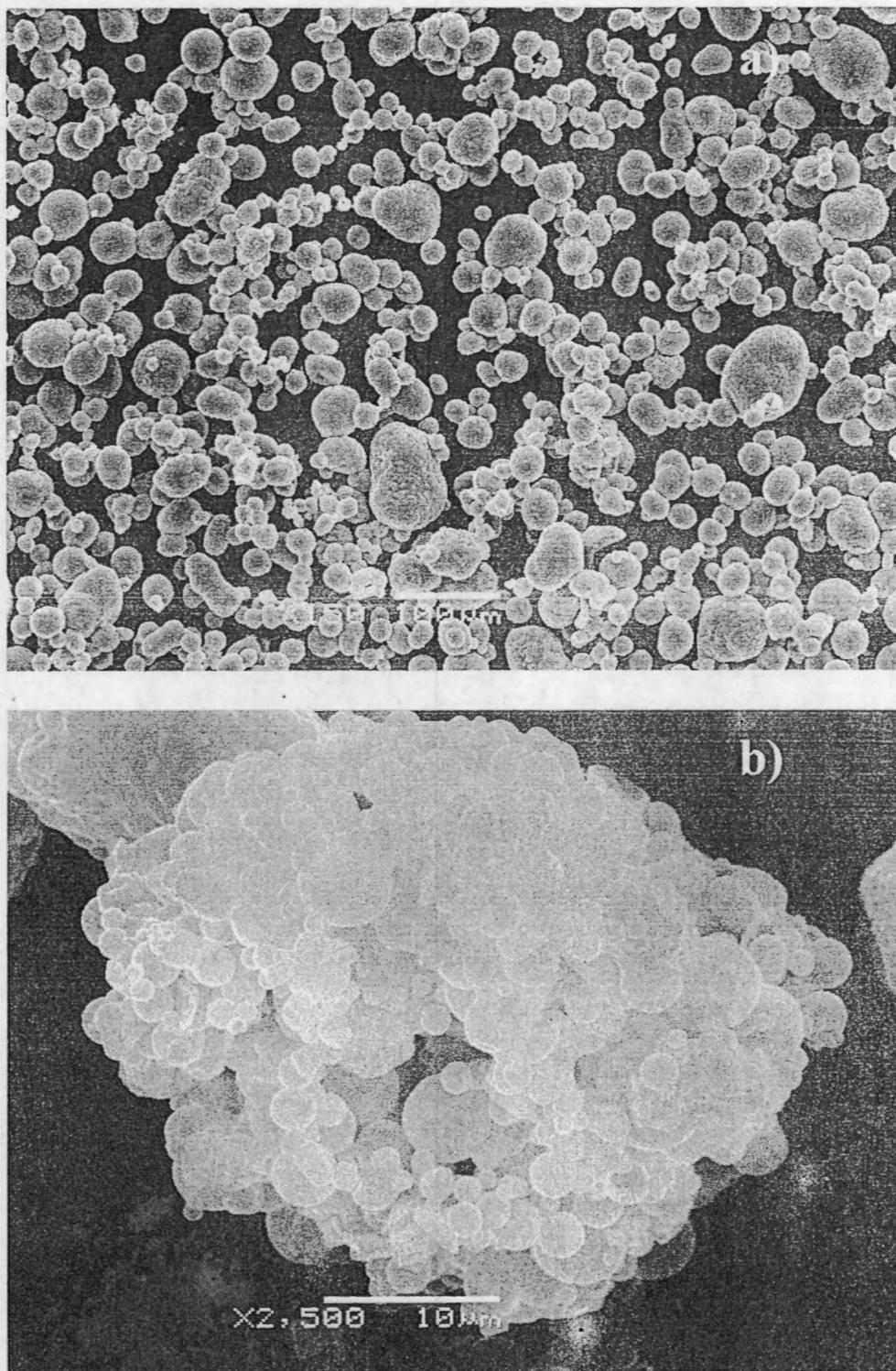


Figura 38. Microcápsulas obtenidas de la emulsión O/W_{GAQ}, amplificación: a) $\times 150$ y b) $\times 2500$

Similarmente, se muestra la formación de microcápsulas esferoidales polidispersas con diámetros promedio que van de 30 a 100 μm (Figura 38a). Sin embargo, se puede observar que las microcápsulas obtenidas con el complejo goma arábica-quitosano muestran una mayor uniformidad de la muestra con tamaños de partícula menores en comparación con las microcápsulas de goma arábica. La Figura 38b muestra que estas microcápsulas también están constituidas por un sinnúmero de microesferas aglomeradas con un $D_{4,3} = 1.74 \mu\text{m}$.

Las Figuras 39 y 40 muestran las micrografías de microcápsulas obtenidas por el secado de la emulsión O/W_{GA} y O/W_{GAQ} , respectivamente, donde se puede observar el espesor de pared de las microcápsulas.

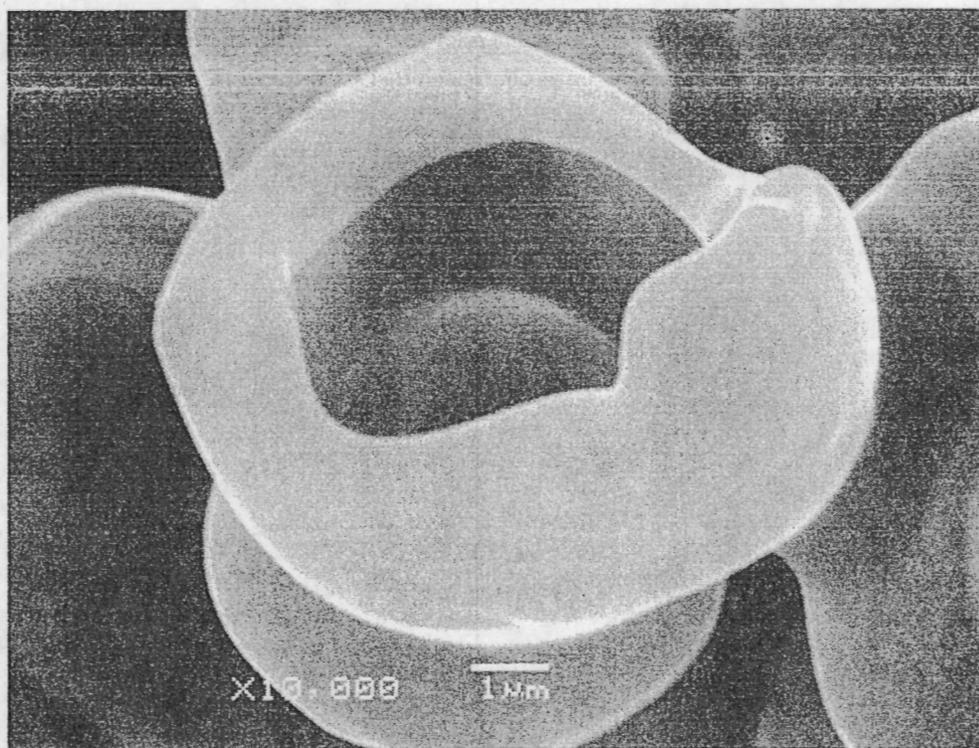


Figura 39. Microcápsulas con goma arábica ($\times 10000$)

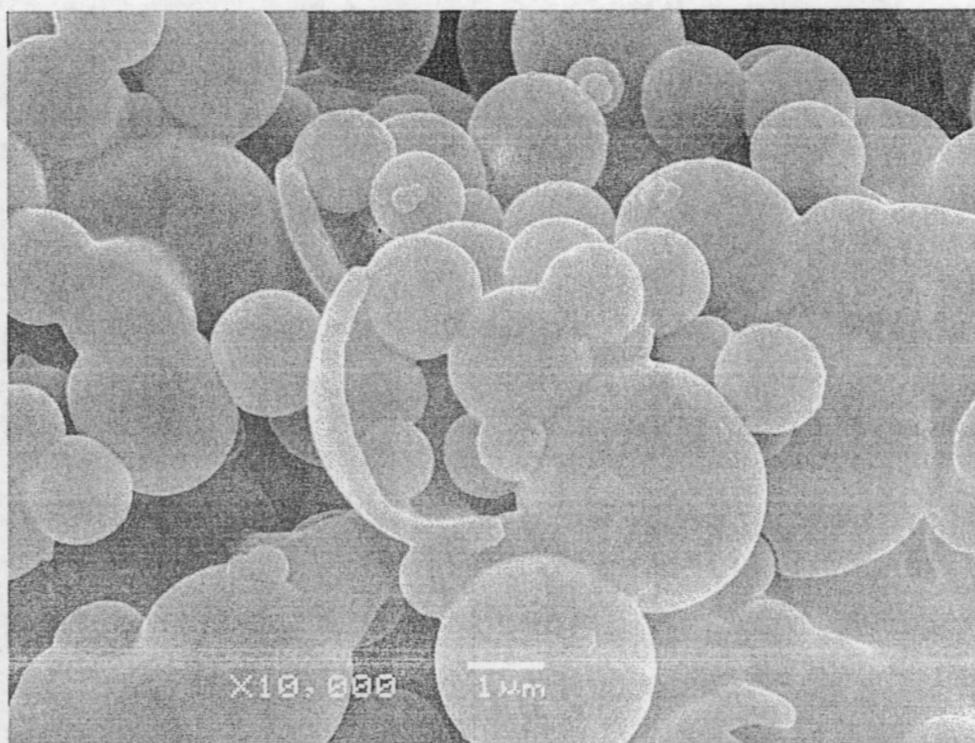


Figura 40. Microcápsulas con el complejo goma arábica-quitosano ($\times 10000$).

Los espesores de las paredes de las microcápsulas fueron de $0.7 \pm 0.02 \mu\text{m}$ para la goma arábica (Figura 39) y $0.34 \pm 0.02 \mu\text{m}$ para el complejo goma arábica-quitosano (Figura 40). Este hecho es un indicio de que la pared formada por el complejo presenta una mayor densidad originada por el compactamiento de las moléculas de goma arábica debido a la presencia de las moléculas de quitosano. La retención del material encapsulado durante el proceso de microencapsulación por secado por aspersion puede ser incrementada por el incremento del peso molecular del material de barrera, la viscosidad y tamaño de los glóbulos de la emulsión (Reineccius, 2004). Las microcápsulas producidas por el complejo muestran una mayor uniformidad de tamaño con menor área superficial y mayor densidad del material de barrera en comparación con los microencapsulados de goma arábica. Las microcápsulas producidas con los complejos goma arábica-quitosano podrían minimizar los procesos de oxidación de la fase oleosa microencapsulada a partir de fuertes acomplejamientos intermoleculares de los biopolímeros en solución.

7 Conclusiones

1. La interacción de un polisacárido aniónico (goma arábica) y un polisacárido catiónico (quitosano) permite la formación de complejos interpoliméricos los cuales pueden ser solubles o insolubles. La formación estos complejos está íntimamente relacionada con la relación y concentración de biopolímeros en solución, así como de las condiciones del medio como el pH y la fuerza iónica.
2. El origen de las interacciones goma arábica-quitosano es de tipo electrostático, debido a las interacciones entre los grupos carboxilo del ácido glucurónico presente en la goma arábica y los grupos amino del quitosano.
3. La máxima interacción entre la goma arábica y el quitosano fue localizada a una relación de biopolímeros de 5, independientemente de la concentración total de biopolímeros, un intervalo de pH de 3.5 a 5.0, sin modificación de la fuerza iónica. Mostrando mayores propiedades viscoelásticas a un pH= 4.5.
4. La adición secuencial de los biopolímeros a la interfase permitió la formación de una emulsión simple por coacervación O/W_{GAQ} , estabilizando al sistema mediante la formación de complejos interfaciales interbiopoliméricos, los cuales incrementan las propiedades viscoelásticas del sistema. Las emulsiones producidas muestran un comportamiento viscoelástico fuertemente dependiente de la fase dispersa.
5. Las microcápsulas producidas por el secado por aspersion de la emulsión por coacervación O/W_{GAQ} muestran una mayor uniformidad de tamaño con menor área superficial y mayor densidad del material de barrera en comparación con los microencapsulados de goma arábica.

8 Trabajos a futuro

Al término de este proyecto de investigación es recomendable proponer algunos temas que considero interesantes para seguir estudiándolos:

1. Caracterizar las interacciones entre la goma arábica y el quitosano por técnicas de calorimetría diferencial de titulación y dispersión de luz. Estos experimentos reforzarían los resultados obtenidos mediante la determinación de parámetros termodinámicos como la entalpía de mezclado, energía libre y segundo coeficiente viral.
2. Realizar estudios acerca del grado de protección contra la oxidación de emulsiones simples obtenidas mediante la coacervación compleja del sistema. Con la finalidad de determinar el orden de reacción, parámetros cinéticos y grado de conversión o deterioro de las sustancias encapsuladas.
3. Desarrollar emulsiones múltiples W/O/W empleando como materiales barrera la mezcla goma arábica-quitosano. En este tipo de sistemas se podría incorporar alguna sustancia de interés de naturaleza hidrosoluble. El reto tecnológico y científico que implica el desarrollo de emulsiones múltiples se basa en determinar las relaciones óptimas de emulsionantes de la fase acuosa interna, con la finalidad de no desestabilizar el complejo adsorbido en la fase acuosa externa, así como determinar las concentraciones adecuadas del material que se pretenda encapsular minimizando los gradientes de presión osmótica del sistema, de esta manera se podrían obtener las condiciones óptimas de formación de emulsiones múltiples estables y funcionales.
4. Estudiar los sistemas dispersos (emulsiones o microencapsulados) en aplicaciones de liberación controlada, evaluando la influencia de variables como el pH, fuerza iónica y temperatura en las cinéticas de liberación del material encapsulado.

5. Evaluar diferentes métodos para producir las microcápsulas, ya que considero que el secado por aspersión puede ser un método muy agresivo para sustancias sensibles al calor, como las vitaminas, compuestos fenólicos, microorganismos o enzimas. Esto podría incrementar el grado de aplicación de los sistemas dispersos.

6. Estudiar la relación entre la estructura y las características físicas de las microcápsulas preparadas con el complejo goma arábica-quitosano a diferentes condiciones de secado.

7. Con base en los conocimientos, propongo que se podría emplear la misma metodología desarrollada en este trabajo, pero utilizando distintas mezclas de biopolímeros como suero de leche quitosano, pectinas de bajo o alto metoxilo con proteínas, quitosano- goma de mezquite o mezclas de mayor orden como goma arábica-goma de mezquite-quitosano.

9 Bibliografía

- Akhtar, M., y E. Dickinson. «Whey Protein-Maltodextrin Conjugate as Emulsifying Agents: An Alternative to Gum Arabic.» *Food Hydrocolloids* 21, 4 (2007): 607-616.
- Bakker, M. A. E., M. M. G. Konig, y J. Visser. Fatty Ingredient. Patente World Patent Application WO94/14334. 1994.
- Basu, S., P.Ch. Dasgupta, y A.K. Surcar. «Studies in Polyelectrolytes. II. gum Arabate.» *Journal of Colloid Science* 6 (1951): 539-549.
- Beerse, Peter William, y Edward Dewey Smith. III. Personal Care Articles Comprising Cationic Polymer Coacervate Compositions. Patente PCT Int. Appl. 59. 2001a.
- Beerse, Peter William, y Edward Dewey, III. Smith. Personal Care Articles Comprising Cationic Polymer Coacervate Compositions. Patente PCT Int. Appl. 62. 2001b.
- Begenstahl, B. «Emulsions.» En *Physicochemical Aspects of Food Processing*, de Beckett ST, 49-63. London: Blackie Acad. & Prof., 1995.
- Beristain, C.I. Azuara, E., H.S. García, y E.J. Vernon-Carter. «Kinetic Model for Water/Oil Adsorption of Mezquite Gum (*Prosopis juliflora*) and Gum Arabic (*Acacia senegal*).» *International Journal of Food Science and Technology* 31 (1996): 379-386.
- Bertolini, A.C., A.C. Siani, y C.R.F. Grosso. «Stability of Monoterpenes Encapsulated in Gum Arabic by Spray-Drying.» *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (2001): 780-785.
- Biesheuvel, P.M., y M.A.C. Stuart. «Cylindrical Cell Model for the Electrostatic Free Energy of Polyelectrolyte Complexes.» *Langmuir* 20 (2004): 4764-4770.
- Boas, N.F. «Method for the Determination of Hexosamines in Tissues.» *The Journal of Biological Chemistry* 204, 2 (1953): 553-563.
- Bohidar, H., P. L. Dubin, P.R. Majhi, C. Tribet, y W. Jaeger. «Polyelectrolyte Affinity and Polyelectrolyte Molecular Weight on Dynamic Properties of Bovine Serum Albumin-

Poly(diallyldimethylammonium chloride) Coacervates.» *Biomacromolecules* 6 (2005): 1573-1585.

Bryant, C.M., y D.J. McClements. «Influence of Xanthan Gum on Physical Characteristics of Heat-denatured Whey Protein Solutions and Gels.» *Food Hydrocolloids* 14 (2000): 383-390.

Burgess, D. J. «Practical Analysis of Complex Coacervate Systems.» *Journal of Colloid and Interface Science* 140 (1990): 227-238.

Bourre, J.M. «Dietary Omega-3 Fatty Acids for Women.» *Biomedicine & Pharmacotherapy* 61 (2007): 105-112

Cho, Y.H., H.K. Shim, y J. Park. «Encapsulation of Fish Oil by an Enzymatic Gelation Process Using Transglutaminase Cross-linked Proteins.» *Journal of Food Science: Food Engineering and Physical Properties* 68, 9 (2003): 2717-2723.

Claesson, P.M., y B.W. Ninhami. «pH-Dependent Interactions Between Adsorbed Chitosan Layers.» *Langmuir* 8 (1992): 1406-1412.

Daly, M.M., y D Knorr. «Chitosan-Alginate Complex Coacervate Capsules: Effects of Calcium Chloride, Plasticizers, and Polyelectrolytes on Mechanical Stability.» *Biotechnology Progress* 4, 2 (1988): 76-81.

Damodaran, S. «Protein Satabilization of Emulsions and Foams.» *Journal of Food Science* 70, 3 (2005): 54-66.

Darling, D.F., y R.J. Brikett. Food Colloids in Practice. En *Foos Emulsions and Foams*. Editado por E. Dickinson. Whitstale, Kent: Royal Society of Chemistry, 1986

de Kruif CG, F. Weinbreck, y R. de Vries. «Complex Coacervation of Proteins and Anionic Polysaccharides.» *Current Opinion Colloid Interface Science* 9 (2004):340-9.

de Vasconcelos, C. L., P. M. Bezerril, D. E. S. dos Santos, T. N. C. Dantas, M. R. Pereira, y J.L.C. Fonseca. «Effect of Molecular Weight and Ionic Strength on the Formation of Polyelectrolyte Complexes Based on Poly(methacrylic acid) and Chitosan.» *Biomacromolecules* 7 (2006): 1245-1252.

Desai, K.G.H., y H.J. Park. «Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients.» *Drying Technology* 23 (2005): 1361-1394.

Dickinson, E. *An Introduction to Food Colloids*. Oxford, Reino Unido: Oxford: University Press., 1992.

Dickinson, E. «Hydrocolloids at Interfaces and the Influence on the Properties of Dispersed Systems.» *Food Hydrocolloids* 17 (2003): 25-39.

Dickinson, E. «Milk Protein Interfacial Layers and the Relationship to Emulsion Stability and Rheology.» *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 20 (2001): 197-210.

Dickinson, E. Protein-Polysaccharide Interactions in Food Colloids. En *Protein-Polysaccharide Interactions in Food Colloids: Stability and Mechanical Properties*. Editado por E. Dickinson y P. Walstra. Melksham, Wiltshire: Royal Society of Chemistry, 1993.

Dickinson, E., J. Evison, R.K. Owusu, y Q. Zhu. Studies of Water-in-Oil-in-Water (W/O/W) Multiple Emulsions: Stabilization and Controlled Nutrient Release. En *Protein-Polysaccharide Interactions in Food Colloids: Stability and Mechanical Properties*. Editado por E. Dickinson y P. Walstra. Melksham, Wiltshire: Royall Society of Chemistry, 1993.

Dickinson, E., y D.J. McClements. *Advances in food colloids*. London: Blackie Academic & Professional, 1996, pp 5-10.

Dickinson, E., y K. Pawlowsky. *Rheology as a Probe of Protein-Polisaccharide Interactions in Oil-in-Water Emulsions*. En *Gums and Stabilisers for the Food Industry*, de G.O. Phililips, P.A. Williams y D.J. Wedlock, Oxford: IRL Press, 1995, Vol. 8, 181-191.

- Dong, Y., C. Xu, J. Wang, Y. Wu, M. Wang, y Y. Ruan. «Influence of Degree of Deacetylation on Critical Concentration of Chitosan/Dichloroacetic Acid Liquid Crystalline Solution.» *Journal of Applied Polymer Science*, 83, 6 (2002), 1204–1208. 1993.
- Djordjevic, D., L. Cercaci, J. Alamed, D.J. McClements, y E.A. Decker Stability of Citral in Protein- and Gum Arabic-Stabilized Oil-in-Water Emulsions *Food Chemistry* 106, 2, 15 (2008), 698-705.
- Dumitriu, S., P. Magny, D. Montané, P.F. Vidal, y E. Chornet. «Polyionic Hydrogels Obtained by Complexation between Xanthan and Chitosan: Their Properties as Supports for Enzyme Immobilization.» *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 9 (1994): 184-209.
- Fennema, O. *Introducción a la Ciencia de los Alimentos*. 2a. Edición. Barcelona: Reverté, 1982.
- Garti, N. «Double Emulsion – Scope Limitations and New Achievements.» *Lebensm-Wiss U-Technol*, 30 (1997): 222.
- Garti, N. «Progress in Stabilization and Transport Phenomena of Double Emulsions in Food Applications.» *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 1997: 222-235.
- Garti, N., y D. Reichman. «Hydrocolloids as Food Emulsifiers and Stabilizers.» *Food Structure* 12 (1993): 411-426.
- Garti, N., y M.E. Leser. «Emulsification Properties of Hydrocolloids.» *Advances in Polymer Technology* 12 (2001): 123-135.
- Girard, M., S. L. Turgeon, y S. F. Gauthier. «Interbiopolymer Complexing Between β -lactoglobulin and Low- and High- Methylated Pectin Measured by Potentiometric Titration and Centrifugation.» *Food Hydrocolloids* 16 (2002): 585-591.
- Girard, M., S.L. Turgeon, y P. Paquin. «Emulsifying Properties of Whey Protein-Carboxymethylcellulose Complexes.» *Journal of Food Science: Food Engineering and Physical Properties* 67, 1 (2002a): 113-119.

Girard, M., S.L. Turgeon, y S.F. Gauthier. «Thermodynamic Parameters of β -Lactoglobulin – Pectin Complexes Assessed by Isothermal Titration Calorimetry.» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003: 4450-4455.

González-Ochoa, H., L. Ibarra-Bracamontes, y J.L. Arauz-Lara. «Two-Stage Coalescence in Double Emulsions.» *Langmuir* 19 (2003): 7837-7840.

Gouin, S., K.L. Tse, y C.B. Hansen. Food Additive Capsules as Aqueous Beads Coated with Hydrophobic Vegetable Fat. Patente Brit. UK Pat. Appl. 33. 2003.

Grant, J., J. Cho, y C. Allen. «Self-Assembly and Physicochemical and Rheological Properties of a Polysaccharide-Surfactant System Formed from the Cationic Biopolymer Chitosan and Nonionic Sorbitan Esters.» *Langmuir* 22 (2006): 4327-4335.

Green, B. K., y L. Schleicher. Manifold Record Material, Patente US Patent Application 2 730 456. 1956.

Gu, Y.S., E.A. Decker, y D.J. McClements. «Influence of pH and κ -Carrageenan Concentration on Physicochemical Properties and Stability of β -lactoglobulin-Stabilized Oil-in-Water Emulsions.» *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (2004): 3626-3632.

Guzey, D.: McClements, D.J. «Impact of Electrostatic Interactions on Formation and Stability of Emulsions Contain Oil Coated by β -lactoglobulin-Pectin Complexes.» *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 55 (2007): 475-485.

Harnsilawat, T., R. Pongsawatmanit, y D.J. McClements. «Stabilization of Model Beverage Cloud Emulsions Using Protein-Polysaccharide Electrostatic Complexes Formed at the Oil-Water Interface.» *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54, 15 (2006): 5540-5547.

Hill, S.E., D.A. Ledward, y J.R. Mitchell. *Funtional Properties of Food Macromolecules*. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publication, 1998.

Hoagland, D. *Microencapsulation*. En *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, Editores: Jonh Wiley & Sons, Inc., NJ, 2001a, Vol. 1, pp 26.

- Hoagland, D. *Polyelectrolites*. En *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, N.J., 2001b; Vol. 7, pp 439-497.
- Hogan, S.A., B.F. McNamee, E.D. O'Riordan, y M. O'Sullivan. «Microencapsulating Properties of Whey Protein Concentrate.» *Journal of Food Science*, 2001: 675-680.
- Hudson, S.M., y D.W. Jenkins. *Chitin and chitosan*. En *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. Editores: John Wiley & Sons, Inc., NJ, 2002, Vol. 1, pp 569-580.
- Huang, S.S.Y., A.N. Oo, D.A. Higgs, C.J. Brauner, y S. Satoh. Effect of Dietary Canola Oil Level on the Growth Performance and Fatty Acid Composition of Juvenile Red Sea Bream, *Pagrus major*. *Aquaculture* 271 (2007): 420-431
- Hugerth, A., Caram-Lelham N. y Sundelöf, L.O. «The Effect of Charge Density and Conformation on the Polyelectrolyte Complex Formation between Carrageenan and Chitosan.» *Carbohydrate Polymers* 34, 3, 20 (1997): 149-156.
- Hunter, R.J. *Foundations of Colloid Science*. 2a. Nueva York: Oxford University Press, 2001.
- Ibanoglu, E. «Rheological Behaviour of Whey Protein Stabilized Emulsions in the Presence of Gum Arabic.» *Journal of Food Engineering* 52 (2002): 273-277.
- Il'ina, A.V., O.Yu. Zueva, S.A. Lopatin, y Varlamov. V.P. «Enzymatic Hydrolysis of α -Chitin.» *Applied Biochemistry and Microbiology* 40, 1 (2004): 35-38.
- Islam, A. M., G. O. Phillips, A. Sljivo, M. J. Snowden, y P. A. Williams. «A Review of Recent Developments on the Regulatory, Structural and Functional Aspects of Gum Arabic.» *Food Hydrocolloids* 11 (1997): 493-505.
- Jafari, S.M., Y. He, y B. Bhandari. «Encapsulation of Nanoparticles of d-Limonene by Spray Drying: Role of Emulsifiers and Emulsifying Techniques.» *Drying Technology* 25, 6 (2007): 1069 - 1079.

Jelesarov I, y H.R. Bosshard. «Isothermal Titration Calorimetry and Differential Scanning Calorimetry as Complementary Tools to Investigate the Energetic of Biomolecular Recognition.» *Journal of Molecular Recognition* 12 (1999):3-18.

Jensen, S.A., B. Vrhovski, y A.S. Weiss. «Domain 26 of Tropoelastin Plays a Dominant Role in Association by Coacervation.» *Journal of Biological Chemistry* 275, 37 (2000): 28449-28454.

Jo, Y.S., M.C. Kim, D.K. Kim, C.J. Kim, Y.K. Jeong, K.J. Kim, y M. Muhammed. «Mathematical Modelling on the Controlled-Release of Indomethacin-Encapsulated Poly(lactic acid-co-ethylene oxide) Nanospheres.» *Nanotechnology* 15 (2004): 1186-1194.

Kaibara, K., T. Okazaki, H. B. Bohidar, y P. L. Dubin. «pH-Induced Coacervation in Complexes of Bovine Serum Albumin and Cationic Polyelectrolytes.» *Biomacromolecules* 1, 1 (2000): 100-107.

Kanouni, M., H.L. Rosano, y N. Naouli. «Preparation of Stable Double Emulsion (W1/O/W2): Role of the Interfacial Films on the Stability of the System.» *Advances in Colloid and Interface Science* 99 (2002): 229-254.

Kato, A., T. Sato, y K. Kobayashi. «Emulsifying Properties of Protein-Polysaccharide Complexes and Hybrids.» *Agricultural and Biological Chemistry* 53, 8 (1989): 2147-2153.

Khouryieh, H.A., T. J. Herald, F. Aramouni, S. Bean, y S. Alavi. «Influence of Deacetylation on the Rheological Properties of Xanthan-Guar Interactions in Dilute Aqueous Solutions.» *Journal of Food Science* 72, 3 (2007): C173- C181.

Kim, K.M., J.H. Son, S.K. Kim, C.L. Weller, y M.A. Hanna. «Properties of Chitosan Films as a Function of pH and Solvent Type.» *Journal of Food Science* 71 (2006): E119-E124.

Kim, Y.D., y C.V. Morr. «Microencapsulation Properties of Gum Arabic and Several Food Proteins: Spray-Dried Orange Oil Emulsion Particles.» *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (1996): 1314-1320.

Klinkesorn, U., P. Sophanodora, P. Chinachoti, D.J. McClements, y E.A. Decker. «Stability of Spray-Dried Tuna Oil Emulsions Encapsulated with Two-Layered Interfacial Membranes.» *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53 (2005): 8365-8371.

Ko, J.A., H.J. Park, Y.S. Park, S.J. Hwang, y J.B. Park. «Chitosan Microparticle Preparation for Controlled Drug Release by Response Surface Methodology.» *Journal of Microencapsulation* 20, 6 (2003): 791-797.

Krochta, J.M., E.A. Baldwin, y M.O. Nisperos-Carriedo. *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*. Lancaster Basel: Technomic Publishing Co., Ing., 1994.

Kruif, C.G., y R. Tuinier. «Polysaccharide Protein Interactions.» *Food Hydrocolloids* 15 (2001): 555-563.

Kuroiwa, T., S. Ichikawa, O. Hiruta, S. Sato, y S. Mukataka. «Factors Affecting the Composition of Oligosaccharides Produced in Chitosan Hydrolysis Using Immobilized Chitosanases.» *Biotechnology Progress* 18 (2002): 969-974.

Lamprecht, A., U. Schafer, y C.M. Lehr. «Influences of Process Parameters on Preparation of Microparticle Used as a Carrier System for Ω -3 Unsaturated Fatty Acid Ethyl Esters Used in Supplementary Nutrition.» *Journal of Microencapsulation*, 2001: 347-357.

Laneuville, S.I., P. Paquin, y S.L. Turgeon. «Effect of Preparation conditions on the Characteristics of Whey Protein-Xanthan Gum Complexes.» *Food Hydrocolloids* 14 (2000): 305-314.

Laugel N, C. Betscha, M. Winterhalter, J.C. Voegel, P. Schaaf, y V. Ball. «Relationship between the Growth Regime of Polyelectrolyte Multilayers and the Polyanion/Polycation Complexation Enthalpy.» *Journal of Physical Chemistry B* 110 (2006): 19443-19449.

Li, S., C. Kowarki, K. Feld, y W. Grim. «Recent Advances in Microencapsulation Technology and Equipment.» *Drug Development and Industrial Pharmacy* 14, 2 y 3 (1988): 353-376.

Lobato-Calleros, C., E. Rodríguez, O. Sandoval-Castilla, E.J. Vernon-Carter, y J. Alvarez Ramirez. «Reduced-fat White Fresh Cheese-like Products Obtained from W1/O/W2 Multiple Emulsions: Viscoelastic and High-Resolution Image Analyses.» *Food Research International* 39 (2006): 678-685.

Madene, A., M. Jacquot, J. Scher, y S. Desobry. «Flavour Encapsulation and Controlled Release – A Review.» *International Journal of Food Science and Technology* 41 (2006): 1–21.

Malvern Instruments. «A Rapid Method to Predict Particle Sedimentation in Liquid Dispersions.» En *Dispersion Rheology. Rheometry Application*, de Malvern Instruments, Note. MRK919-01.

Mathieu, F., S. Ugazio, G. Carnelle, Y. Duciní, y J. Legrand. «Complex Coacervation of the Gelatin-Poly(acrylic acid) System.» *Journal of Applied Polymer Science*, 2006: 708-714.

McClements, D.J. «Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability.» *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47 (2007): 611–649

McClements, D.J. *Food Emulsions. Principles, Practice and Techniques*. Boca Raton, Londres, Nueva York, Washinton, D.C.: CRC Press, 1999.

McClements, D.J., F.J. Monahan, y J.E. Kinsella. «Effect of Emulsion Droplets on the Rheology of Whey-Protein Isolate Gels.» *Journal of Texture Studies* 24 (1993): 411.

McNamee, B., E. O’Riordan, y M. O’Sullivan. «Effect of Partial Replacement of Gum Arabic with Carbohydrates on Its Microencapsulation Properties.» *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 7 (2001): 3385-3388.

McNamee, B.F., E.D. O’Riordan, y M. O’Sullivan. «Emulsification and Microencapsulation Properties of Gum Arabic.» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46 (1998): 4551-4555.

Mekhloufi, G., C. Sanchez, D Renard, S. Guillemin, y J. Hardy. «pH-Induced Structural Transitions during Complexation and Coacervation of β -Lactoglobulin and Acacia Gum.» *Langmuir* 21, 1 (2005): 386-394.

Menger, F.M., y B.M. Sykes. «Anatomy of a Coacervate.» *Langmuir* 14 (1998): 4131-4137.

Moreau, D.L., y M. Rosenber. «Microstructure and Fat Extractability in Microcapsules Based on Whey Proteins or Mixtures of Whey Proteins and Lactose.» *Food Structure* 12 (1993): 457-468.

Moreau, L., H.J. Kim, E.A. Decker, y D.J. McClements. «Production and Characterization of Oil in Water Emulsions Containing Droplets Stabilized by β -Lactoglobulin-Pectin Membranes.» *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (2003): 6612-6617.

Moros, J.E., J.M. Franco, y C. Gallegos. «Rheology of Spray-Dried Egg Yolk-Stabilized Emulsions.» *International Journal of Food Science and Technology* 37 (2002): 297-307.

Muñoz, J., M.I. Alfaro, y I. Zapata. «Avances en la Formulación de Emulsiones.» *Grasas y Aceites* 58, 1 (2007): 64-73.

Nakano, M. «Places of Emulsions in Drug Delivery.» *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2000: 1-4.

Nakai, S. *Proteins: Structure And Functionality En Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, N.J., 2001; pp 2014-2021.

Nordby, M.H., A.L. Kjoniksen, B. Nystrom, y J. Roots. «Thermoreversible Gelation of Aqueous Mixtures of Pectin and Chitosan. Rheology.» *Biomacromolecules* 4 (2003): 337-343.

Novikov, V.Y. «Acid Hydrolysis of Chitin and Chitosan.» *Russian Journal of Applied Chemistry* 77, 3 (2004): 484-487.

Ogawa, S., E.A. Decker, y D.J. McClements. «Production and Characterization of O/W Emulsions Containing Cationic Droplets Stabilized by Lecithin-Chitosan Membranes.» *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 9 (2003): 2806-2812.

Ogawa, S., E.A. Decker, y D.J. McClements. «Production and Characterization of O/W Emulsions Containing Droplets Stabilized by Lecithin-Chitosan-Pectin Multilayered Membranes.» *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (2004): 3595-3600.

Onishi, N., H. Furukawa, y K. Kataoka. «Coacervate-Forming Thermoresponsive Polymers and Their Application to Drug Delivery Systems, etc.» *Japan Kokai Tokkyo Koho*, 2002: 9.

Osman, M.O., P.A. Williams, A.R. Menzies, y G.O. Phillips. «Characterization of Commercial Samples of Gum Arabic.» *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41, 1 (1993): 71-77.

Ould, M.M., y S.L. Turgeon. «The Effects of pH on the Rheology of β -lactoglobulin/k-carrageenan Mixed Gels.» *Food Hydrocolloids* 14 (2000): 245-251.

Overbeek, J. T. G., y M. J. Voorn. «Phase Separation in Polyelectrolyte Solutions. Theory of Complex Coacervation.» *Journal of Cellular Composition Physiology* 49, 1 (1957): 7-26.

Pal, R. «Rheology of High Internal Phase Ratio Emulsions.» *Food Hydrocolloids* 20, 7 (2006): 997-1005.

Pasika, W.M. *Extracellular Microbial Polysaccharides*. Editado por P.A., Laskin, A.I., Sanford. Washington, D.C.: ACS Symposium Series Vol. 45, 1977.

Pedroza-Islas, R., J. Alvarez-Ramírez, y E.J. Vernon-Carter. «Using Biopolymer Blends for Shrimp Feedstuff Microencapsulation-II. Disolution and Floatability Kinetics as Selection Criteria.» *Food Research International* 33 (2000): 119-124.

Pérez-Alonso, C., J.G. Báez-González, C.I. Beristain, E.J. Vernon-Carter, y M.G. Vizcarra-Mendoza. «Estimation of the Activation Energy of Carbohydrate Polymers Blends as

Selection Criteria for Their Use as Wall Material for Spray-Dried Microcapsules.» *Carbohydrate Polymers* 53 (2003): 197-203.

Pérez-Orozco, J.P., C.I. Beristain, G. Espinosa-Paredes, C. Lobato-Calleros, y E.J. Vernon-Carter. «Interfacial Shear Rheology of Interacting Carbohydrate Polyelectrolytes at the Water-Oil Interface Using an Adapted Conventional Rheometer.» *Carbohydrate Polymers* 57 (2004): 45-54.

Pinotti, A., García, M.A. Martino, M.N. y Zaritzky, N.E. «Study on Microstructure and Physical Properties of Composite Films Based on Chitosan and Methylcellulose.» *Food Hydrocolloids* 21 (2007): 66-72.

Rabea, E.I., M.E.T. Badawy, C.V. Stevens, G. Smagghe, y W. Steurbaut. «Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action.» *Biomacromolecules* 4 (2003): 1457-1465.

Randall, R.C., G.O. Phillips, y P.A. Williams. «Fractionation and Characterization of Gum from Acacia Senegal.» *Food Hydrocolloids* 3, 1 (1989): 65-75.

Ré, M.I. «Encapsulation by Spray Drying.» *Drying Technology* 16 (1998): 1195-236.

Reineccius, G.A. «The Spray Drying of Food Flavors.» *Drying Technology* 22, 6 (2004): 1289 - 1324.

Risch, S.J. «Encapsulation: Overview of Uses and Techniques.» En *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*, editado por S.J. Risch y G.A. Reineccius, S.S. 590. p 2-7. Washington, D.C.: American Chemical Society, 1995.

Rodríguez, M.E. *Microencapsulación por Secado por Aspersión de Emulsiones Múltiples W/O/W Conteniendo Carotenoides*. México: Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana, 2005.

Rodríguez, M.S., L.A. Albertengo, y E. Angulló. «Emulsification Capacity of Chitosan.» *Carbohydrate Polymers* 48 (2002): 271-276.

Rodríguez-Huezo, M.E., R. Pedroza-Islas, L.A. Prado-Barragán, C.I. Beristain, y E.J. Vernon-Carter. «Microencapsulation by Spray Drying of Multiple Emulsions Containing Carotenoids.» *Journal of Food Science* 69, 7 (2004): 351-359.

Rohn, C.L. *Rheology: A Rapid Screening Method for Testing the Stability of Drug Suspensions* by. Malvern.

Rosano, H.L., F.G. Gandolfo, y J.D.P. Hidrot. «Stability of W1/O/W2: Multiple Emulsions: Influence of Ripening and Interfacial Interactions.» *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 138 (1998): 109-121.

Ruíz-Ramos, J.O., J.P. Pérez-Orozco, J.G. Báez-González, E. Bósquez-Molina, C. Pérez-Alonso, y E.J. Vernon-Carter. «Interrelationship Between the Viscoelastic Properties and Effective Moisture Diffusivity of Emulsions with the Water Vapor Permeability of Edible Films Stabilized by Mesquite Gum–Chitosan Complexes.» *Carbohydrate Polymers* 64, 2 (2006): 355-363.

Sanchez, C., G. Mekhloufi, y D. Renard. «Complex Coacervation Between β -lactoglobulin and Acacia Gum: A Nucleation and Growth Mechanism.» *Journal of Colloid and Interface Science* 299 (2006): 867–873.

Sanchez, C., y D. Renard. «Stability and Structure of Protein-Polysaccharide Coacervates in the Presence of Protein Aggregates.» *International Journal of Pharmaceutics* 242 (2002a): 319–324.

Sanchez, C., G. Mekhloufi, C. Schmitt, D. Renard, P. Robert, C.M. Lehr, A. Lamprecht, y J. Hardy. «Self-Assembly of β -Lactoglobulin and Acacia Gum in Aqueous Solvent: Structure and Phase Ordering Kinetics.» *Langmuir*, 18 (2002): 10323-10333.

Santinath S., V.K. Aswal, y H.B. Bohidar. «Structural Studies of Agar–Gelatin Complex Coacervates by Small Angle Neutron Scattering, Rheology and Differential Scanning Calorimetry.» *International Journal of Biological Macromolecules* 41 (2007):301–307.

Schmitt, C., T.P. da Silva, C. Bovay, S. Rami-Shojaei, P. Frossard, E. Kolodziejczyk, y M.E. Leser. «Effect of Time on the Interfacial and Foaming Properties of β -lactoglobulin/Acacia Gum electrostatic Complexes and Coacervates at pH 4.2.» *Langmuir* 21 (2005): 7786-7795.

Schmitt, C., C. Sanchez, A. Lamprecht, D. Renard, C.M. Lehr, C.G. de Kruif, y J. Hardy. «Study of β -lactoglobulin/Acacia Gum Complex Coacervation by Diffusing-Wave Spectroscopy and Confocal Scanning Laser Microscopy.» *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 20 (2001): 267-280.

Schulz, P.C., M.S. Rodríguez, L.F. Del-blanco, M. Pistonesi, y E. Angulló. «Emulsification Properties of Chitosan.» *Colloid and Polymer Science* 61 (1998): 1159-1165.

Shahidi, F., y X. Han. «Encapsulation of Food Ingredients.» *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 33, 6 (1993): 501-547.

Sherman, P. *Emulsion Science*. Editado por P. Sherman. Londres y Nueva York: Academic Press, 1968.

Shumilina, E.V., y Y.A. Shchipunov. «Chitosan-Carrageenan Gels.» *Journal of Colloid* 64, 3 (2002): 413-420.

Silvestre, M. P. C., E. A. Decker, y D.J. McClements, «Influence of Copper on the Stability of Whey Protein Stabilized Emulsions.» *Food Hydrocolloids*, 13 (1999), 419-424.

Sparks, R.E. *Microencapsulation*. Vol. 15, de *Encyclopedia of Chemical Technology*, de R.E. Kirk y D.F. Othmer, 470. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1981.

Steffe, J.F. *Rheological Methods in Food Process Engineering*. 2a. Edición. Michigan: Freeman Press, 1996.

Strauss, G., y S.M. Gibson. «Plant Phenolics as Cross-linkers of Gelatin Gels and Gelatin-Based Coacervates for Use as Food Ingredients.» *Food Hydrocolloids* 18, 1 (2003): 81-89.

Sugiura, S., M. Nakajima, K. Yamamoto, S. Iwamoto, M. Satake, M. Seki; y T. Oda. «Preparation Characteristics of Water-in-Oil-in-Water Multiple Emulsions Using Microchannel Emulsification.» *Journal of Colloid and Interface Science* 270 (2004): 221–228.

Synowiecki, J., y N.A. Al-Khateeb. «Production, Properties, and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives.» *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43, 2 (2003): 145–171.

Tapia, C., Z. Escobar, E. Costa, J. Sapag-Hagar, F. Valenzuela, C. Basualto, M. Gai, y M. Yazdani-Pedram. «Comparative Studies on Polyelectrolyte Complexes and Mixtures of Chitosan–Alginate and Chitosan–Carrageenan as Prolonged Diltiazem Clorhydrate Release System» *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57 (2004): 65–75.

Tesch, S., y H. Schubert. «Influence of Increasing Viscosity of the Aqueous Phase on the Short-term Stability of Protein Stabilized Emulsions.» *Journal of Food Engineering* 52 (2002): 315-312.

Tharanathan, R.N., y F.S. Kittur. «Chitin — The Undisputed Biomolecule of Great Potential.» *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 1 (2003): 61–87

Thimma, R. T., y S. Tammishetti. «Study of Complex Coacervation of Gelatin with Sodium Carboxymethyl Guar Gum: Microencapsulation of Clove Oil and Sulphamethoxazole.» *Journal of Microencapsulation*, 2003: 203-210.

Thomasin, C., H. Nam-Tran, H.P. Merkle, y B. Gander. «Drug Microencapsulation by PLA/PLGA Coacervation in the Light of Thermodynamics. 1. Overview and Theoretical Considerations.» *Journal of Pharmaceutical Sciences.*, 1998: 259-268.

Tolstoguzov, V.B. «Some Thermodynamic Considerations in Food Formulation.» *Food Hydrocolloids*, 2003: 1-23.

Tolstoguzov V.B. «Thermodynamic Aspects of Biopolymer Functionality in Biological Systems, Foods, and Beverages.» *Critical Reviews in Biotechnology* 22, 2 (2002): 89-174.

Tolstoguzov, V.B. «Why Were Polysaccharides Necessary?» *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* 34 (2004): 571-597.

Tricia L. Psota, T.L., S.K. Gebauer, y P. Kris-Etherton. «Dietary Omega-3 Fatty Acid Intake and Cardiovascular Risk.» *The American Journal of Cardiology* 98, 4, (2006) 3-18.

Turgeon, S.L., C. Schmitt, y C. Sanchez. «Protein-Polysaccharide Complexes and Coacervates.» *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 12 (2007) 166-178.

Valdez, M.A., J.I. Acedo-Carrillo, A. Rosas-Durazo, J. Lizardi, M. Rinaudo, y F.M. Goycoolea. «Small-Deformation Rheology of Mezquite Gum Stabilized Oil in Water Emulsions.» *Carbohydrate Polymers* 64 (2006): 205-211.

Vernon-Carter, E.J., y P. Sherman. «Rheological Properties and Applications of Mesquite Tree (*Prosopis Juliflora*) Gum 4. Rheological Properties of Mesquite Gum Films at the Oil-Water Interface.» *Journal of Dispersion Science and Thechnology*, 1981: 399-413.

Walstra, P. *Food Emulsions and Foams*. Editado por E. Dickinson. Whitstale, Kent: Royal Society of Chemistry, 1986.

Walstra, P. *Physical Chemitry of Foods*. New York-Basel: Maecel Dekker, Inc., 2003.

Wang, L., E. Khor, y L. Lim. «Chitosan-Alginate-CaCl₂ System for Membrane Coat Application.» *Journal of Pharmaceutical Sciences* 90, 8 (2001): 1134-1142.

Wang, X., J. Lee, Y.M. Wang, y Q. Huang. «Composition and Rheological Properties of β -lactoglobulin/Pectin Coacervates: Effects of Salt Concentration and Initial Protein/Polysaccharide Ratio.» *Biomacromolecules* 8 (2007): 992-997.

Wang, Y., J.Y. Gao, y P.L. Dubin. «Protein Separation via Polyelectrolyte Coacervation: Selectivity and Efficiency.» *Biotechnology Progress* 12, 3 (1996): 356-362.

Wei, Y.C., y S.M. Hudson. «Binding of Sodium Dodecyl Sulfate to a Polyelectrolyte Based on Chitosan .» *Macromolecules* 26 (1993): 4151-4154.

Weinbreck, F. *Whey Protein/Gum Arabic Coacervates: Structure and Dynamics*. Holanda: Tesis de doctorado, Universidad de Utrecht, 2004.

Weinbreck, F., H. Nieuwenhuijse, G.W. Robijn, y C.G. de Kruif. «Complexation of Whey Proteins with Carrageenan.» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004: 3550-3555.

Weinbreck, F., R. de Vries, P. Schrooyen, y C.G. de Kruif. «Complex Coacervation of Whey Proteins and Gum Arabic.» *Biomacromolecules*, 4 (2003): 293-303.

Weinbreck, F., R.H. Tromp, y C.G. de Kruif. «Composition and Structure of Whey Protein Gum Arabic Coacervates.» *Biomacromolecules* 5 (2004): 1437-1445.

Whistler, R.L. *Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivatives*. 3a. Editado por R.L. and BeMiller, J.N. Whistler. San Diego, Cal.: Academia Press., 1993.

Williams, P.A., y G.O. Phillips. «Gum Arabic.» En *Handbook of Hydrocolloids*, editado por G.O. Phillips y P.A. Williams, 155-168. Nueva York: CRC, 2000.

Williams, P.A., y G.O. Phillips. Gum Arabic. En *Gums and Stabilisers for the Food Industry 10*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2000.

Xing, F., G. Cheng, y B. Ma, L. Yang. «Microencapsulation of Capsaicin by the Complex Coacervation of Gelatin, Acacia and Tannins.» *Journal of Applied Polymer Science* 91, 4 (2004): 2669-2675.

Yan, J., y J. Pal. «Osmotic Swelling Behaviour of Globules of W/O/W Emulsion Liquid Membranes.» *Journal of Membrane Science* 190 (2001): 79-91.

Yang, J.H., S.Y. Lee, Y.S. Han, K.S. Park, y J.H. Choy. «Efficient Transdermal Penetration and Improved Stability of L-Ascorbic Acid.» *Bull Korean Chememical Society* 24, 4 (2003): 499-503.

Yeo, Y., E. Bellas, W. Firestone, R. Langer, y D.S. Kohane. «Complex Coacervates for Thermally Sensitive Controlled Release of Flavor Compounds.» *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53 (2005): 7518-7525.

Yoshioka, T., R. Hirano, T. Shioya, y M. Kako. «Encapsulation of Mammalian Cell with Chitosan-CMC Capsule.» *Biotechnology and Bioengineering* 35, 1 (1990): 66-72.

Yu, H., y Y.C. Toh. Encapsulation of Cells in Biologic Compatible Scaffolds by Coacervation of Charged Polymers. Patente U.S. Pat. Appl. Publ. 24. 2006.

Yu, S., J. Hu, X. Pan, P. Yao, y M. Jiang. «Stable and pH-Sensitive Nanogels Prepared by Self-Assembly of Chitosan and Ovalbumin.» *Langmuir* 22 (2006): 2754-2759.

Zhao, H., C. Sun, R.J. Stewart, y H.J. Waite. «Cement Proteins of the Tube-Building Polychaete *Phragmatopoma Californica*.» *The Journal of Biological Chemistry* 280, 52 (2005): 42938-42944.