

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



**“MICROENCAPSULACIÓN POR SECADO POR ASPERSIÓN DE  
EMULSIONES MÚLTIPLES W/O/W CONTENIENDO CAROTENOIDES”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

**MARÍA EVA RODRÍGUEZ HUEZO**

DIRECTOR DE TESIS:

DR. E. JAIME VERNON CARTER

Julio 2005

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioprocesos del Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está inscrito en el PIFOP, en el marco del PFPN-SEP-CONACYT”.

Iztapalapa, D. F. a 30 junio de 2005.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad  
Iztapalapa aprobó la tesis

**“MICROENCAPSULACIÓN POR SECADO POR ASPERSIÓN DE  
EMULSIONES MÚLTIPLES W/O/W CONTENIENDO CAROTENOIDES”**

Que presentó

**MARÍA EVA RODRÍGUEZ HUEZO**

Comité Tutorial

Director: Dr. E. Jaime Vernon Carter

Asesores: Dra. Lilia Arely Prado Barragán  
Dr. César Ignacio Beristain Guevara

Jurado:

Presidente: Dr. Francisco Cruz Sosa

Secretario: Dra. Lilia Arely Prado Barragán

Vocal: Dra. Ruth Pedroza Islas

Vocal: Dr. César Ignacio Beristain Guevara

## *Agradecimientos*

A CONACYT, por financiar parcialmente este proyecto a través del convenio G-33565B “Estabilidad y propiedades funcionales de microencapsulados sencillos y múltiples de colorantes naturales hidro y lipo dispersables incorporando biopolímeros de baja viscosidad”

A mis padres Eulalio y Timotea por haberme traído a éste bello mundo y educarme con amor.

A mis hermanos Chuy, Severo, Pillo, Petra, Andrés, Lupe, Pancho, Jorge y Carmen por todo su apoyo.

A mi esposo, director, amigo y gendarme Jaime por su apoyo comprensión y motivación para seguir en el camino de la superación.

A mis hijos Regina y Oscar por todas las horas de espera.

A Rosy quien atiende a mis hijos con amor y gracias a su apoyo he podido concluir ésta etapa.

A mis amigos y compañeros Juan Gabriel, Juan Pablo, Juan Manuel y Juan Cesar por todo su tiempo dedicado a mí, por su paciencia y amabilidad con la que resuelven mis dudas.

A mis asesores por su apoyo y paciencia.

A mis sinodales por su tiempo dedicado en la crítica constructiva al presente trabajo.

## ÍNDICE GENERAL

Resumen	ix
Abstract	x
1 Introducción	1
1.1 Definición y clasificación de los colorantes naturales	2
1.2 Importancia de los colorantes naturales en la industria de alimentos	4
1.3 Algunos aspectos de regulación sobre el color como aditivo	6
1.4 Carotenoides: definición, clasificación y distribución	8
1.5 Funciones y efectos farmacológicos de los carotenoides	10
1.6 Estabilización de los carotenoides	13
1.7 Emulsiones múltiples: estabilización y desestabilización	15
1.8 Hidrocoloides en sistemas alimenticios	19
1.9 Microencapsulación: definición y clasificación de los métodos	25
1.10 Materiales de pared más utilizados en la microencapsulación por secado por aspersión	29
2 Justificación	32
3 Hipótesis	34

4	Objetivos	36
5	Metodología experimental	38
5.1	Materiales	39
5.2	Formulación y preparación de las emulsiones múltiples $W_1/O/W_2$	40
5.3	Determinación de viscosidad de las emulsiones múltiples	42
5.4	Obtención de las microcápsulas	42
5.5	Análisis de tamaño de las emulsiones múltiples y de las microcápsulas	43
5.6	Contenido de humedad y $a_w$ de las microcápsulas	43
5.7	Almacenamiento de las microcápsulas	44
5.8	Concentración de carotenoides	45
5.9	Redispersión de los polvos encapsulados	46
5.10	Microscopía electrónica de barrido (MEB)	47
5.11	Análisis estadístico	47
6	Resultados y discusión	49
6.1	Efecto del contenido de sólidos y la relación de material de pared a emulsión interna sobre la morfología de las microcápsulas	50
6.2	Efecto del contenido de sólidos y la relación de material de pared a emulsión interna sobre la viscosidad y tamaño de las emulsiones y microcápsulas	53
6.3	Eficiencia de encapsulación y retención de los carotenoides	56
6.4	Cinética de degradación de los carotenoides en las distintas	57

microcápsulas $M_{x,y}$		
6.5	Vida media de los carotenoides en las distintas microcápsulas $M_{x,y}$	58
6.6	Contenido de humedad y $a_w$ de las microcápsulas $M_{35\%,3.9}$ almacenadas a diferentes ambientes de $a_w$	59
6.7	Cinética de degradación carotenoides en las microcápsulas $M_{35\%,3.9}$ como una función de la $a_w$	60
6.8	Comportamiento de redispersión de las microcápsulas $M_{35\%,3.9}$ como una función de la $a_w$	64
7	Conclusiones	69
8	Reconocimientos	71
9	Bibliografía	72
10	Anexos	78
	Anexo A Estructura química de carotenoides más comunes	79
	Anexo B Representación esquemática de la estructura química de las gomas: mezquite, arábica y gelana	85
	Anexo C Cálculo de $a_w$ de las distintas soluciones salinas	89
	Anexo D Barrido espectral de una mezcla de carotenoides	91
	Anexo E Micrografías de las microcápsulas $M_{x,y}$ mostrando estructura interna y externa	93
	Anexo F Micrografías de las microcápsulas $M_{35\%,3.9}$ a distintas $a_w$	100
	Anexo G Ajustes de recta de las constantes de cinética de degradación	106

de carotenoides totales en las microcápsulas $M_{x,y}$	
Anexo H Fotografías de las microcápsulas $M_{35\%,3.9}$ redispersadas a distintas $a_w$	110
Anexo I Determinación de distribución y tamaño de gota de las emulsiones múltiples	114
Anexo J Determinación de distribución y tamaño de partícula de las microcápsulas	121

## **Resumen**

Emulsiones múltiples agua-aceite-agua ( $W_1/O/W_2$ ) con un contenido 25 y 35% de sólidos fueron secadas por aspersion produciendo microcápsulas con relaciones de mezcla de material de pared a emulsión primaria de 3.9:1, 2.6:1 y 1.4:1. Las microcápsulas tuvieron un contenido total de carotenoides de 0.25% (peso/peso). Los carotenoides utilizados consistieron de oleorresina de chiles rojos (50.49 g carotenoides.kg<sup>-1</sup>oleorresina) y de una oleorresina saponificada de pétalos de flor de cempasúchil (41.23 g carotenoides.kg<sup>-1</sup> oleorresina) en una relación 3:1. Las microcápsulas hechas a partir de emulsiones con una mayor relación de material de pared a emulsión y de contenido de sólidos mostraron una mejor morfología y eficiencia de encapsulación de carotenoides, un mayor tamaño de partícula (34.01  $\mu\text{m}$ ), pero también una mayor cinética (0.0235 d<sup>-1</sup>) de degradación de carotenoides, que las microcápsulas obtenidas de menor relaciones de material de pared a emulsión primaria y contenido de sólidos. La mayor degradación (0.158 d<sup>-1</sup>) de carotenoides ocurrió en microcápsulas almacenadas a una actividad de agua de 0.628, observándose menor degradación a actividades de agua menores y mayores.

## **Abstract**

Water-in-oil-in-water ( $W_1/O/W_2$ ) multiple emulsions with 25 and 35% solids contents were spray-dried producing microcapsules with 3.9:1, 2.6:1 and 1.4:1 biopolymer wall material to primary emulsion ratios and 0.25% (w/w) theoretical carotenoids content. The pigments used in this study were the oleoresin from red chillies (50.49 g carotenoids.kg<sup>-1</sup>oleoresin) and a saponified oleoresin from Aztec marigold petals (41.23 g carotenoids.kg<sup>-1</sup>oleoresin), in a 3:1 ratio. Microcapsules with better morphology, encapsulation efficiency and larger particle size (34.01  $\mu\text{m}$ ) were those obtained from higher wall to primary emulsion ratios and solids content, but showed relatively higher carotenoids degradation kinetics (0.0235 d<sup>-1</sup>) than microcapsules made with lower wall to primary emulsion ratios and solids content, which exhibited poorer morphology, encapsulation efficiency and smaller particle size. Microcapsules stored at different water activities showed maximum carotenoids degradation (0.158 d<sup>-1</sup>) at a water activity ( $a_w$ ) of 0.628, with the lower carotenoids degradation occurring at lower or higher  $a_w$ .

# *1. INTRODUCCIÓN*

## **1.1 Definición y clasificación de los colorantes naturales**

Los pigmentos pueden ser clasificados por su origen como naturales, sintéticos u orgánicos. Los naturales, son producidos por organismos vivos tales como plantas, animales, hongos y bacterias. Los pigmentos sintéticos son obtenidos en laboratorios.

Por su función como aditivos en alimentos, la Food and Drug Administration (FDA) los clasifica en: certificable, que corresponde a los colorantes artificiales y subdivididos como pigmentos sintéticos y lacas y exentos de certificación. Este grupo incluye pigmentos derivados de origen natural tales como vegetales, minerales, o animales y artificiales homólogos de derivados naturales.

Específicamente, los isoprenoides, también llamados terpenoides, representan una gran familia de compuestos naturales; se encuentran en todo el reino donde pueden llevar a cabo múltiples funciones (hormonas, pigmentos, etc.). Alrededor de 23,000 compuestos isoprenoides individuales han sido identificados y muchas nuevas estructuras se reportan cada año.

En términos generales, los pigmentos relacionados con los alimentos se pueden dividir en ocho categorías: carotenoides, clorofilas, antocianinas, flavonoides, betalaínas, taninos, mioglobina y hemoglobina (Badui-Dergal, 1999).

Algunos de los pigmentos son hidrosolubles y su separación y aislamiento se facilita considerablemente, pero existen otros que solo se solubilizan en disolventes orgánicos o no polares. Su identificación se basa en la propiedad que tiene cada pigmento de absorber una cierta longitud de onda del espectro visible.

La industria alimentaria utiliza los colorantes por muy diversas razones, entre las que destaca el restaurar la apariencia original del alimento, debido a los cambios ocurridos durante el procesamiento y almacenamiento; para asegurar la uniformidad del color; para intensificar colores que son normalmente encontrados en los alimentos y para dar a un alimento una apariencia atractiva (Delgado-Vargas y col. 2000, 2003).

## **1.2 Importancia de los colorantes naturales en la industria de alimentos**

Desde civilizaciones tempranas, los productos naturales fueron usados para dar una presentación atractiva a productos hechos por el hombre. El azafrán y otras especies eran usados frecuentemente para dar color amarillo a una variedad de alimentos y existen evidencias que la mantequilla era pigmentada con estos productos. Los primeros reportes que consideraron el uso de colores derivados de minerales datan del siglo XIX; sin embargo algunos de ellos causaron serios problemas de salud. Cromato de plomo y sulfato de cobre fueron usados para pigmentar dulces, pero en el proceso de pigmentación, el arsénico y otras impurezas venenosas eran adicionados frecuentemente. También en esa época, se llegaron a usar colorantes de alquitrán y otros derivados del petróleo en el procesamiento de alimentos, medicinas y cosméticos.

Por muchos años se han usado los colorantes sintéticos, en 1938 fue reconocido el uso de aproximadamente 200 y hoy en día sólo 7 pueden ser usados en la pigmentación de alimentos. No obstante, en los pasados 30 años los aditivos sintéticos han sido severamente criticados y los consumidores muestran algún rechazo hacia esos productos y como consecuencia, el consumidor ha ido prefiriendo los colorantes naturales (Delgado-Vargas y cols, 2000).

En el periodo de 1960 a 1970 en los Estados Unidos, movimientos activistas atacaron los aditivos para alimentos y esto fue convertido en un fenómeno mundial. Los colorantes fueron un blanco perfecto, ya que se argumentaba que los pigmentos solo tenían un valor cosmético y que podían causar daño. Ante estas circunstancias, las

compañías productoras de alimentos, comenzaron a desarrollar alimentos más saludables, considerando a las características nutricionales, como una herramienta de venta. Así, una tendencia mundial al uso de los colorantes naturales fue generalizada.

Actualmente, la mayoría de las personas interpretan el contenido de productos químicos como un contaminante y esta creencia ha sido reforzada, y todo parece indicar que continuará en el futuro. Para enfatizar esta situación, debe puntualizarse que más de 1 986 356 de patentes en colorantes naturales han sido registradas y para colorantes sintéticos sólo 71. El número de ventajas de los colorantes naturales sobre los sintéticos ha ido incrementado debido a las propiedades farmacológicas de los pigmentos naturales. Se estima que el mercado de colorantes naturales tiene actualmente un valor aproximado de 500 millones de dólares con una tasa de crecimiento anual del 10% (Agriculture and Agri-Food Canadá, 2004).

No obstante, es necesario mencionar que los colorantes sintéticos tienen ventajas conocidas sobre los colorantes naturales, entre estas ventajas está el mayor poder de pigmentación, mayor estabilidad durante el almacenamiento, facilidad en el procesamiento, además de ser más baratos y encuentran disponibles en cantidades ilimitadas. Por otro lado, algunos productos tienen un buen valor de mercado sólo si son coloreados con productos naturales (Delgado-Vargas y cols,2000).

### **1.3 Algunos aspectos de regulación sobre el color como aditivo**

El color como aditivo, así como los preservativos, fueron la materia de una legislación especial en los Estados Unidos. En 1900 en una reunión sobre colores y preservativos, se puntualizó que el gobierno tenía la responsabilidad de investigar la seguridad de esos productos antes de emitir alguna regulación. En 1938 la FDA publicó una lista de colorantes de alquitrán que podrían ser usados como aditivos en alimentos; también, se decretó que la FDA tenía la autoridad para certificar los lotes de colorantes. Con esto, los aditivos de color fueron las primeras sustancias que debían ser revisadas antes de su comercialización. En los primeros años, los colorantes sintéticos fueron prohibidos por considerarse productos dañinos a la salud. El siguiente cambio importante vino en 1958; los aditivos fueron redefinidos y apareció una nueva clasificación:

- (1) Substancias aprobadas por la FDA o la USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos) sustancias sancionadas anteriormente (1938-1958).
- (2) Substancias que son reconocidas generalmente como seguras (denominadas GRAS por sus siglas en inglés), las cuales no requieren de una previa evaluación por la FDA para ser comercializadas y
- (3) Todas las sustancias adicionales suministradas como aditivos alimentarios, las cuales deben ser evaluadas por la FDA antes de su comercialización.

Los aditivos de color fueron incluidos en la última categoría. Además, en 1958 fue incluida la cláusula Delaney “ningún aditivo debe ser juzgado como seguro si se encuentra que induce cáncer cuando es ingerido por el hombre o por un animal o si esto

se comprueba después de ensayos apropiados, para la evaluación de la seguridad de aditivos para alimentos”.

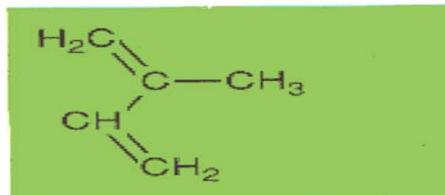
En 1960 y con la enmienda de la FD&C, el congreso estableció que todos los aditivos de color requerían la aprobación por la FDA para su comercialización. Puede parecer que no existió diferencia entre ésta y la regulación anterior a 1958. Sin embargo la nueva regulación también incluye los colores antes sancionados (antes de 1958). Cabe mencionar que todos los aditivos de color deben ser considerados como aditivos y no como sustancias GRAS, así la regulación para aditivos de color es más fuerte que para otros aditivos.

El 9 de noviembre de 1990, se aprobó la obligación de los productores a etiquetar todos los productos bajo cierta regulación. Con respecto al color, se estableció que todos los colores certificados usados en alimentos deben estar indicados en la etiqueta, pero los exentos de certificación (estos incluyen los pigmentos naturales aceptados) deben ser genéricamente agrupados como colorantes. Este acto dio una clara ventaja al uso de los colorantes naturales sobre los sintéticos ya que los consumidores tienen desconfianza de estos últimos. Por otro lado, los aditivos exentos de certificación provienen de productos naturales comunes: Betabel, zanahoria, frutas, chile, entre otros y se debe esperar que la regulación sea menos severa para estos productos (Delgado-Vargas y col. 2000 ,2003).

## 1.4 Carotenoides: definición clasificación y distribución

### 1.4.1 Carotenoides

Son compuestos que comprenden ocho unidades isoprenoídes (ip) cuyo orden es invertido al centro de la molécula y pueden ser de cadena lineal o tener ciclizaciones en los extremos. El nombre genérico deriva de la zanahoria, *Daucus carota* ya que fue de esta hortaliza de donde se aislaron por primera vez. En la Fig. 1.1 se esquematiza la molécula del isopreno. Todos los carotenoides pueden ser considerados como derivados del licopeno (C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>) por reacciones que involucran: (1) hidrogenación, (2) deshidrogenación, (3) ciclización, (4) inserción de oxígeno, (5) migración de dobles enlaces, (6) migración del metilo, (7) alargamiento de la cadena, (8) acortamiento de la cadena (anexo A).



ISOPRENO

Fig. 1.1. Unidad de isopreno.

Los carotenoides son lípidos y por lo tanto son solubles en otros lípidos o en solventes no polares.

El color de los carotenoides es impartido por los dobles enlaces conjugados que están principalmente en configuración *trans* (en su forma natural) en forma extendida, ya que

ellos son moléculas lineales y rígidas. Las propiedades de los carotenoides *cis* muestran diferencias sustanciales con respecto a los *trans*; ellos son más fácilmente solubilizados, absorbidos y transportados. Los factores que generan la isomerización son halógenos libres, ácidos, luz excesiva y altas temperaturas (Badui-Dergal, 1999)

Los enlaces dobles conjugados en los carotenoides, están altamente delocalizados y consecuentemente los carotenoides tienen una baja energía en el estado excitado. Por lo tanto, la energía de transición es en la región visible (400 a 500 nm); así ellos son de coloraciones intensas amarilla, naranja o roja (Badui-Dergal, 1999)

La estructura poliénica de los carotenoides los hace altamente reactivos. La estructura es rica en electrones y susceptible a ser atacada por agentes electrofílicos responsables de la inestabilidad de los carotenoides contra la oxidación y dándoles la característica de radical. Los carotenoides después de su aislamiento son susceptibles a la oxidación y su degradación es muy rápida si son almacenados en presencia de trazas de oxígeno (Britton, 1996; Klaui y Bauernfeind, 1981).

#### ***1.4.2 Clasificación***

Los carotenoides están clasificados por su estructura química como: (1) carotenos, constituidos por carbono e hidrógeno; (2) oxicarotenoides o xantofilas que tienen carbono, hidrógeno y adicionalmente oxígeno.

#### ***1.4.3 Distribución***

Los carotenoides son un grupo de pigmentos ampliamente distribuidos, han sido identificados en organismos fotosintéticos y no fotosintéticos, en plantas mayores, algas, hongos, bacterias y levaduras. Los carotenoides son los responsables de los colores rojo

brillante, anaranjado y amarillo de las frutas, vegetales, hongos, flores y también de pájaros, insectos, crustáceos y peces como el salmón. Más de 300 carotenoides fueron identificados para 1972, y alrededor de 600 para 1992. La producción total de carotenoides en la naturaleza ha sido estimada en 100 000 000 ton/año.

Los carotenoides están acumulados en los cloroplastos de todas las plantas verdes como una mezcla de  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, luteína, zeaxantina, violaxantina y neoxantina. Estos pigmentos se encuentran formando complejos por un enlace no covalente con proteínas. En las hojas verdes, los carotenoides están libres, no esterificados, y la composición es dependiente de la planta y de las condiciones de desarrollo (Britton, 1996 ; Delgado Vargas y col. 2002)

## **1.5 Funciones y efectos farmacológicos de los carotenoides**

### **1.5.1 Funciones**

#### a) Antioxidantes.

Estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado que el papel fotoprotector de los carotenoides está relacionado a su actividad antioxidante. También se ha establecido que la estructura de los carotenoides tiene una gran influencia en su actividad antioxidante; por ejemplo la cantaxantina y la astaxantina muestran mejor actividad antioxidante que el  $\beta$ -caroteno y la zeaxantina. No obstante, la actividad antioxidante depende también del sistema en el que se utilicen o se encuentren (Delgado-Vargas y col. 2003).

La actividad antioxidante de la luteína, el licopeno, la bixina, el  $\beta$ -caroteno y el  $\gamma$ -tocoferol fue evaluada en triglicéridos en presencia de aire y luz. Se reportó que la luteína, el licopeno y el  $\beta$ -caroteno actúan como prooxidantes, favoreciendo la formación de hidroperóxidos; no obstante si se adiciona una pequeña cantidad de  $\gamma$ -tocoferol a estos pigmentos, el fenómeno es revertido y entonces actúan como antioxidantes con una actividad mayor que la que podría proporcionar el  $\gamma$ -tocoferol por sí mismo (Haila y col. 1996). La actividad antioxidante también está influenciada por el número de dobles enlaces y la presencia de grupos cetónicos, y se ha comprobado que los anillos ciclopentano en la estructura del carotenoide incrementan su actividad (Chen y col. 1996).

Halliwell (1996), evaluó la actividad antioxidante de los carotenoides contra radicales y estableció el siguiente orden de actividad decreciente: licopeno >  $\beta$ -criptoxantina > luteína=zeaxantina >  $\alpha$ -caroteno > cantaxantina=astaxantina. El licopeno mostró tres veces más actividad que  $\gamma$ -tocoferol y se concluyó que la actividad antioxidante es influida por la polaridad que se incrementan con la presencia de grupos funcionales en el anillo terminal.

### ***1.5.2 Efectos farmacológicos***

Muchas enfermedades como el cáncer, involucran procesos oxidativos mediados por radicales libres. Los carotenoides, por su efecto antioxidante, pueden proporcionar beneficios en tales enfermedades; sin embargo, su función no está completamente demostrada (Woodall y col. 1997; Giovannucci, 1999). En ensayos con animales, se ha encontrado evidencia de la efectividad del  $\beta$ -caroteno en el tratamiento de cierto tipo de

cáncer. Abraham y col. (2003) demostraron que el  $\beta$ -caroteno afectó la respuesta inmune en niños, inhibiendo el crecimiento de tumores.

Adicionalmente se ha sugerido que los carotenoides influyen la fuerza y fluidez de las membranas celulares, afectando su permeabilidad al oxígeno y a otras moléculas. También se ha determinado que los carotenoides tienen un efecto remarcable en la respuesta inmune y en la comunicación intercelular (Britton, 1995).

Se conocen más de 600 carotenoides, de los cuales 50 son consumidos en los alimentos para ser transformados en vitamina A requerida en el proceso de visión, mantenimiento epitelial, secreción de mucosas y reproducción. Después de su absorción, estos carotenoides son metabolizados por una ruptura oxidativa a retinal, ácido retinoico y pequeñas cantidades de productos fragmentados. Los carotenoides son transportados por las lipoproteínas del plasma. Los carotenos están asociados principalmente con lipoproteínas de baja densidad, mientras las xantofilas muestran una distribución uniforme entre las lipoproteínas de baja y alta densidad (Tyssandier y col. 2002).

Sies (1997), indicó que los carotenoides, radicales  $\alpha$ -tocoferol y ácido ascórbico desarrollan su función disminuyendo el contenido de compuestos nitrogenados dañinos. También, fue observado un efecto sinérgico entre el  $\beta$ -caroteno y las vitaminas E y C, en la protección celular. Esto fue explicado en función de que el  $\beta$ -caroteno no solo destruye oxirradicales, sino que también repara radicales tocoferoles producidos cuando el  $\alpha$ -tocoferol destruye oxirradicales.

Se han realizado numerosos estudios en los que se relaciona la ingesta de carotenoides con la disminución de riesgo de tener varios tipos de cáncer. Por ejemplo, se ha

observado una relación inversa entre el consumo de tomate y el riesgo de cáncer gástrico. Esta consistente relación, advertida en diversas poblaciones de Europa, Asia y Estados Unidos, sugiere un efecto protector del consumo de tomate o licopeno contra el cáncer gástrico. Cabe mencionar que el cáncer de estómago es una de las mayores causas de muerte por cáncer en el mundo. También se ha sugerido que el licopeno tiene efectos benéficos en cáncer de próstata, pulmón, páncreas, colon-rectal, esófago, seno y cérvico-uterino (Giovannucci, 1999).

Otros estudios evaluaron el efecto anticarcinogénico de  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, luteína,  $\beta$ -criptoxantina, zeaxantina, que son carotenoides encontrados en frutas y vegetales de consumo general. Encontraron que  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -caroteno previnieron la formación de tumores cancerígenos de piel, pulmón, hígado y colon. La luteína disminuyó la tendencia a formar tumores pulmonares; la zeaxantina evita la tumorigénesis espontánea en hígado de ratones en concentración de 0.005% suministrada como emulsión en el agua de beber. La  $\beta$ -criptoxantina, encontrada en naranjas, tiene un gran potencial, ya que en estudios *in vitro*, ha mostrado la actividad más fuerte de inhibición de formación de tumores cancerígenos, entre los carotenoides (Nishino y col., 1999).

## **1.6 Estabilidad de los carotenoides**

Los carotenoides, son sustancias muy inestables y sensibles a la luz, al oxígeno y al calor. En su forma natural, son insolubles en agua y ligeramente solubles en aceite a

temperatura ambiente. Un incremento en la temperatura del aceite, incrementa también la solubilidad de los carotenoides (Bauernfeind y col., 1958) aunque pueden obtenerse formas solubles en agua por saponificación de las oleorresinas (Walford, 1984; Britton, 1996; Delgado-Vargas y col., 2000).

La aplicación de los carotenoides en los alimentos para dar color, no se realiza a partir de los pigmentos purificados (Britton, 1996). El mercado potencial para las preparaciones de carotenoides naturales solubles en agua, es amplio e incluye su uso en bebidas, helados, postres, dulces, sopas, productos cárnicos y alimentos para mascotas y para acuicultura (Britton, 1996; Vernon-Carter y col., 1996, 1998; Delgado-Vargas y col., 2000; Delgado-Vargas y col., 2003; Arredondo-Figueroa y col., 2003).

Estas preparaciones deben tener buena estabilidad contra la oxidación, la isomerización, poseer propiedades adecuadas de solubilidad y ser capaces de dar un amplio rango de coloraciones que puedan alcanzar las tonalidades deseables en los alimentos procesados.

Los carotenoides solubles en aceite producen tonalidades diferentes a los solubles en agua (Kläui y Bauernfeind, 1981). El lograr combinar tanto los carotenoides solubles en agua como en aceite en un solo sistema, permitiría lograr un mayor rango de tonalidades que el que se pudiera obtener tan solo utilizando los carotenoides hidro o lipo solubles de manera individual. Una manera de lograr esto, es combinando ambos tipos de carotenoides en un sistema único, por ejemplo en una emulsión múltiple agua-aceite-agua (W/O/W).

## 1.7 Emulsiones múltiples

Las emulsiones múltiples también denominadas “emulsiones de emulsiones”, se caracterizan porque los glóbulos de la fase dispersa contienen dentro de ellos gotas dispersas más pequeñas. En emulsiones dobles de agua-aceite-agua, cada gota dispersa forma una estructura vesicular con compartimentos acuosos sencillos o múltiples que se encuentran separados de la fase acuosa continua por una capa de fase oleosa (Garti, 1997). En la Fig. 1.2 se presenta una representación esquemática de posibles morfologías de emulsiones dobles W/O/W, comúnmente denominadas tipo A, B y C.

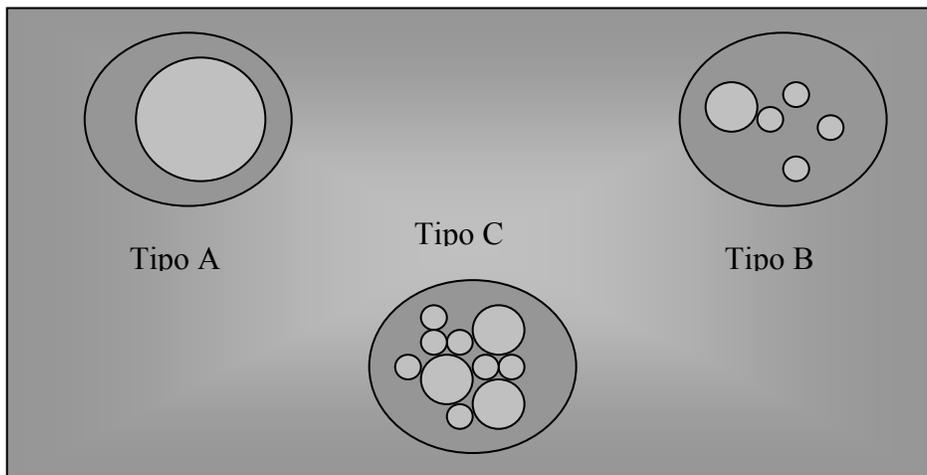


Fig. 1.2. Morfología de emulsiones múltiple.

El tipo A es un sistema compuesto predominantemente de gotas de emulsión múltiple conteniendo tan solo una gota interna. En el tipo B, hay una gran proporción de gotas de emulsión múltiple conteniendo más de una gota interna. En el sistema tipo C, la mayoría de las gotas de emulsión múltiple contienen un elevado número de gotas internas flocladas y densamente empacadas. El tipo de morfología resultante depende del método de preparación de la emulsión W/O/W y del tipo de agentes emulsificantes empleados (Dickinson y McClements, 1996). En la práctica el método de las dos etapas de emulsificación es el que se ha empleado para lograr emulsiones de tamaño de gota reproducibles e involucra el formar una fina emulsión agua-en-aceite (W/O) usando una alta proporción de emulsificante lipofílico, y luego dispersando la emulsión primaria en agua utilizando un nivel bajo de un emulsificante hidrofílico. Hasta hace pocos años la mayoría de los estudios relacionados a emulsiones múltiples reportaban el uso de agentes emulsificantes de bajo peso molecular (como los Spans, Tweens y Brijs), lo cual permitió establecer una serie de recomendaciones empíricas para lograr una preparación exitosa de las emulsiones múltiples. Así pues, por ejemplo, el emulsificante lipofílico (emulsificante primario) puede desestabilizar la emulsión múltiple si migra de la interfase agua-aceite interna a la interfase aceite-agua externa. Además, el emulsificante hidrofílico presente durante la segunda etapa de emulsificación puede desestabilizar a la emulsión primaria original. Por ello se ha buscado optimizar el balance hidrofílico-lipofílico (BHL) de la mezcla de emulsificantes, definido como un BHL ponderado, que la experiencia indica que, cuando éste es menor a 10 se obtiene un sistema W/O/W resistente a una “inversión” a una emulsión O/W (Dickinson y McClements, 1996). Otro efecto detrimental es cuando se usa una concentración alta de emulsificante hidrofílico

(emulsificante secundario) en la fase acuosa externa, ya que las gotas externas de la emulsión W/O/W se vuelven tan pequeñas, que durante el proceso de la segunda etapa de emulsificación las gotas acuosas internas son alteradas o rotas. Por esta razón se emplean por lo general muy bajas concentraciones de emulsificante hidrofílico en la formulación de emulsiones múltiples (W/O/W) (Dickinson y McClements, 1996).

La fracción volumen de la fase acuosa de la emulsión primaria (W/O) que se retiene como la fase acuosa interna en la emulsión múltiple final W/O/W, denominada rendimiento, es una medida para establecer el éxito de la emulsión múltiple. Este rendimiento se ve severamente afectado por muchos factores. Cualquier proceso que promueva la desestabilización de la emulsión múltiple afecta el rendimiento. El proceso de desestabilización en sistemas de emulsiones múltiples son necesariamente mucho más variado que en las emulsiones sencillas (Fig. 1.3).

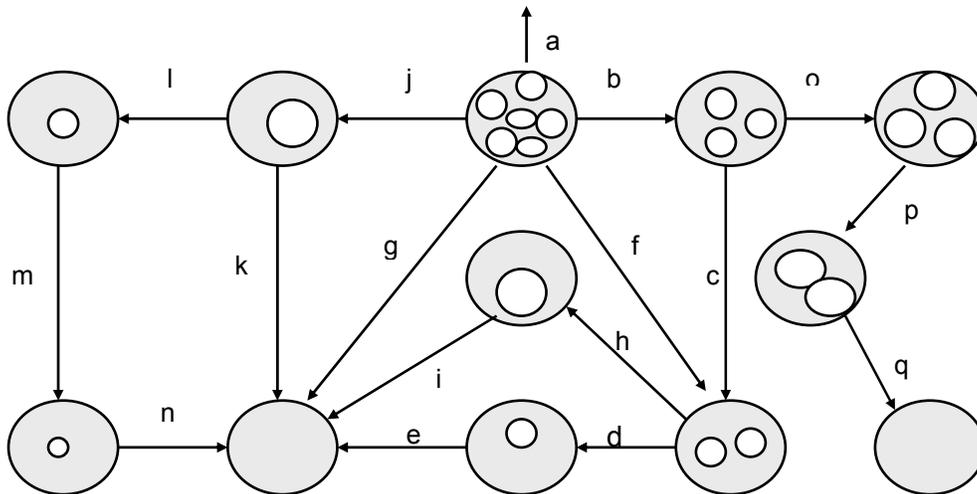


Fig. 1.3. Algunas rutas de desestabilización en emulsiones múltiples.

Por ejemplo, el proceso (b)-(c)-(d)-(e) representa un mecanismo mediante el cual las gotas acuosas internas son expulsadas de los glóbulos en forma individual y secuencial. También puede haber expulsiones simultáneas como los procesos (g) y (f). Cada uno de estos eventos involucra la ruptura de la película oleosa entre ambas fases acuosas.

Pueden presentarse procesos donde dos o más gotas internas coalescen, como por ejemplo en (h), (j) y (p). Por otro lado, debido a la diferencia de presión osmótica entre la fase acuosa interna y externa, puede haber migración de agua de la fase interna a la externa, proceso (l)-(m)-(n), o viceversa, proceso (b)-(o), dependiendo la dirección del gradiente de presión. Además, pueden presentarse combinaciones de los mecanismos ya descritos (Dickinson y McClements, 1996).

El uso de emulsiones múltiples formuladas con emulsificantes de bajo peso molecular no ha resultado exitoso en la práctica, ya que estos sistemas por lo general no pueden ser usados en procesos donde ocurren perturbaciones hidrodinámicas que causan rompimiento de la emulsión interna y de la emulsión múltiple. Se han realizado muchos esfuerzos para “sellar mejor” las interfases interna y externa (Garti, 1997). Para ello, en tiempos recientes, se ha recurrido al uso de emulsificantes poliméricos con buenas propiedades superficiales (Dickinson y McClements, 1996), que proporcionen emulsiones termodinámicamente metaestables contra procesos agregativos debido principalmente a contribuciones repulsivas estéricas (Garti, 1997), y a estabilidad contra la coalescencia debido a las propiedades mecánicas de las películas poliméricas adsorbidas (Dickinson, 2003). Para mejorar la estabilidad de las emulsiones múltiples, también se ha propuesto la incorporación de un espesante o un polímero gelificante en la

fase acuosa interna de la emulsión primaria. La idea es que la presencia de este polisacárido conduzca a una estructura viscoelástica tipo gel en todas las gotas acuosas internas o a la interfase entre la fase acuosa interna y la fase oleosa intermedia. La formación de una membrana gelatinosa en la interfase agua-aceite actúa como una barrera física para evitar la coalescencia de las gotas de la emulsión interna (Dickinson y McClements, 1996).

### **1.8 Hidrocoloides en sistemas alimenticios**

Los hidrocoloides alimenticios son biopolímeros hidrofílicos de alto peso molecular que se emplean como ingredientes funcionales en la industria alimentaria para controlar la microestructura, textura, sabor y vida de anaquel. Las propiedades funcionales y moleculares generales de las proteínas y los polisacáridos se comparan en la Tabla 1.1 (Dickinson 2003).

En la formulación de sistemas de emulsiones, uno distingue por lo general entre dos tipos de ingredientes: el “agente emulsificante” y el “estabilizante” (Dickinson 1992; Garti y Reichman, 1993). El agente emulsificante es la especie química única (o mezcla de especies) que promueve la formación de la emulsión y estabilización a corto plazo por acción interfacial. Hay dos grandes grupos de emulsificantes utilizados en la industria alimentaria -los surfactantes de bajo peso molecular (monoglicéridos, polisorbatos, ésteres de sacarosa, lecitina, etc.) y emulsificantes macromoleculares (generalmente proteínas, especialmente de leche y huevo).

Tabla 1.1. Características comunes y diferencias entre proteínas y polisacáridos como biopolímeros funcionales en sistemas alimenticios.

<b>Similitudes</b>	
Polímeros naturales	
Ampliamente distribuidos en alimentos	
Usados en farmacéuticos, cosméticos y productos personales	
Polímeros amigables al medio ambiente	
Estructura complicada	
Comportamiento de agregación compleja	
Agentes gelantes/estabilizantes	
<b>Diferencias</b>	
<i>Proteínas</i>	<i>Polisacáridos</i>
Estructuras muy diversas	Estructuras similares
Reactivas	No reactivas
Monodispersas	Polidispersos
Muchos tipos de segmentos	Pocos tipos de segmentos
Cadena lineal	Cadena lineal o ramificada
Cadena flexible	Cadena rígida
Peso molecular medio	Alto peso molecular
Volumen molecular pequeño	Alto volumen molecular
Amfifílicas	Hidrofílicos
Superficialmente activas	Sin actividad superficial
Polielectrolitos	No iónicos o cargados
Emulsificante/espumante	Espesante/retención de agua
Sensible a la temperatura	Insensible a temperatura
Fuerte interacción con surfactantes	Baja interacción con surfactantes

Un surfactante de bajo peso molecular es una molécula amfifílica que tiene tanto partes polares como no polares. Para conferir una vida de anaquel sustancial se requiere

de la presencia de un estabilizador, que puede ser definido como un compuesto químico solo (o mezclado) que confiere estabilidad a una emulsión a largo plazo, posiblemente debido a un mecanismo de adsorción, más no necesariamente por tal. Los estabilizantes son generalmente biopolímeros- proteínas o polisacáridos, ya que los surfactantes de bajo peso molecular no son efectivos para conferir estabilidad a largo plazo. El principal mecanismo de estabilización de los polisacáridos es vía la modificación de la viscosidad o gelación de la fase continua acuosa. Por el otro lado, las proteínas, tienen una fuerte tendencia a adsorberse en interfases aceite-agua formando capas estabilizantes alrededor de las gotas de aceite, de manera que son capaces de desempeñar un papel emulsificante y estabilizador. Un polímero debe ser superficialmente activo para ser un eficaz agente emulsificante. Es decir, debe tener la capacidad de disminuir sustancial y rápidamente la tensión en la interfase aceite-agua. Para mantener las gotas pequeñas durante la emulsificación, el tiempo entre las colisiones entre gotas debería ser largo en comparación al tiempo que le lleva al emulsificante a adsorberse en la nueva interfase aceite-agua y crear una capa estabilizante transitoria.

Para que un biopolímero sea superficialmente activo debe tener un carácter anfifílico. Si es un hidrocoloide, debe contener grupos hidrofóbicos que sean suficientes en número y suficientemente accesibles de tal manera que permitan en una escala de tiempo corto que las moléculas se adhieran y desparramen en la interfase, protegiendo a las nuevas gotas formadas. Una vez que una emulsión de gotas pequeñas ha sido preparada, lo importante para la estabilidad a largo plazo, es que el biopolímero adsorbido produzca una barrera macromolecular robusta en la interfase.

Los procesos fisicoquímicos involucrados en la prevención de la agregación o coalescencia de las gotas son los clásicos mecanismos de estabilidad coloidal de estabilización estérica y electrostática. Para que un biopolímero sea más efectivo para estabilizar las gotas de una emulsión, debería exhibir las siguientes características:

- (i) *Fuerte adsorción.* Esto implica que el polímero anfifílico tiene un grado sustancial de carácter hidrofóbico (es decir, cadenas laterales no polares o una porción péptida/proteica) que lo mantenga permanentemente anclado en la interfase.
- (ii) *Cobertura superficial completa.* Esto implica que haya suficiente presencia de polímero para saturar la interfase.
- (iii) *Formación de una gruesa capa estabilizante estérica.* Esto implica que el estabilizante sea predominantemente hidrofílico y de alto peso molecular ( $10^4$ - $10^7$  Da).
- (iv) *Formación de una capa estabilizante cargada.* Esto implica la presencia de grupos cargados en el biopolímero que contribuyan a la interacción electrostática repulsiva neta entre las superficies de las gotas, especialmente a bajas fuerzas iónicas.

Las condiciones (i)-(iii) no pueden reunirse simultáneamente para homopolímeros en donde todos los segmentos de la cadena son químicamente similares, de manera que polímeros uniformes no son buenos estabilizadores estéricos. Lo que se requiere para una buena estabilización estérica es un polímero compuesto de una pequeña fracción de segmentos hidrofóbicos fuertemente adsorbentes (que mantengan a la macromolécula

permanentemente sujeta a la interfase) y una gran fracción de segmentos hidrofílicos no adsorbentes (que se proyectan de la superficie hacia la fase continua y confieren una capa protectora de grosor apreciable). Tal estabilización estérica, combinada con una estabilización electrostática (condición iv) si la macromolécula posee grupos ionizables, suministra una barrera energética repulsiva que previene que un par de gotas se peguen fuertemente a separaciones pequeñas bajo la influencia de fuerzas de atracción de van der Waals.

La goma arábica y la goma de mezquite son reconocidas como excelentes agentes emulsificantes. Ambas gomas poseen la habilidad de formar películas y se ha establecido que son genuinos emulsificantes que forman capas estabilizantes macromoleculares alrededor de gotas de aceite. Vernon-Carter y col., (1996) reportaron que emulsiones de oleorresina de flor de cempasúchil en agua, fueron mucho más estables en cuanto a la degradación del pigmento cuando fueron formuladas con goma de mezquite que con goma arábica o mezclas de ambas. La goma de mezquite también proporcionó mayor protección a las emulsiones de oleorresina de chile en agua, contra la degradación del pigmento, que la goma arábica en un amplio intervalo de valores de pH (Vernon-Carter y col., 1998).

El nivel de actividad superficial de estas gomas es comparativamente menor al de las proteínas, por lo que se deben emplear al menos una relación de goma-aceite de alrededor de 1:1, y es justamente esta propiedad la que hace que estas dos gomas puedan ser usadas exitosamente en la elaboración de emulsiones múltiples (Vernon-Carter y col., 2001). Además, la alta viscosidad superficial que exhiben ambas gomas cuando se adsorben en interfases aceite-agua no se ve afectada con la dilución de la fase acuosa.

La viscoelasticidad de las películas se mantiene aún cuando la mayor parte de estos hidrocoloides se retira de la fase acuosa en contacto con la capa adsorbida. Esto es consistente con la observación que tan solo una pequeña porción de las gomas usadas en la preparación de emulsiones se ve involucrada en el proceso de estabilización. La goma arábica (*Acacia senegal*) y la goma de mezquite (*Prosopis laevigata*) son químicamente similares (anexo B). Ambas gomas son heteropolielectrolitos ramificados complejos consistentes de una cadena central de unidades de 1,3  $\beta$ -galactopiranosas y cadenas laterales de 1,6 galactopiranosas terminando en residuos de ácido glucurónico o ácido 4-O-metilglucurónico. Ambos hidrocoloides contienen una pequeña porción de proteína (entre 2-7%) unida covalentemente al carbohidrato resultando en una mezcla de complejos arabinogalactanos-proteína, cada uno conteniendo varias unidades polisacáridas unidas a un centro proteínico común (Connolly y col., 1988; Orozco-Villafuerte y col., 2003). A esta estructura se le ha denominado como el modelo “wattle blossom”. Se ha demostrado que ambas gomas son una mezcla compleja de tres o cuatro fracciones con estructuras químicas distintas (Williams y col., 1990; Orozco-Villafuerte y col., 2003) con un componente principal que no contiene o contiene muy poca proteína. La proteína parece estar asociada a una fracción de alta masa molecular que representa menos del 30 % de la goma total. Esta fracción parece ser la responsable de las propiedades emulsificantes y estabilizantes de ambas gomas. En la Fig. 1.4 se puede observar como la cadena proteínica más hidrofóbica ancla firmemente al híbrido proteína-polisacárido en la interfase, y proyecta a los bloques carbohidratos hidrofílicos unidos a esta cadena proporcionando una fuerte barrera estérica contra la floculación y la coalescencia.

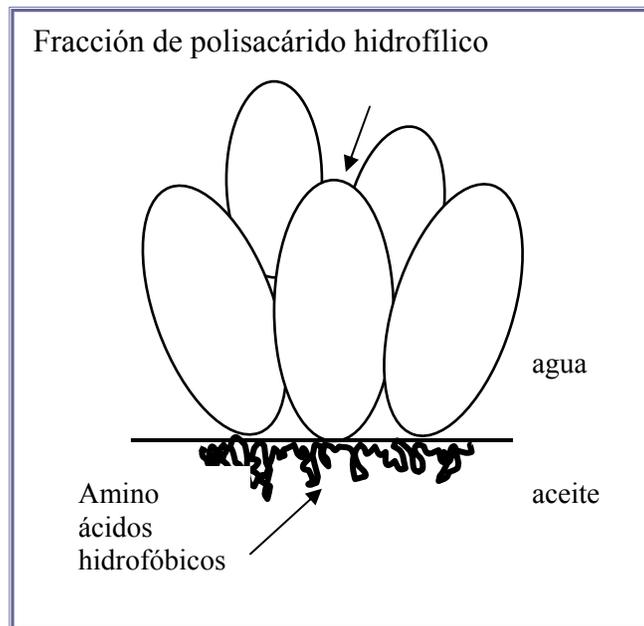


Fig. 1.4. Modelo “Wattle Blossom” que esquematiza como la pequeña fracción proteica de la goma arábiga se adsorbe en la fase oleosa y la fracción carbohidrato se proyecta en la fase acuosa continua.

### **1.9 Microencapsulación: definición y clasificación de los métodos**

La microencapsulación puede ser considerada como una forma especial de empaquetar, en la que un material en particular puede ser cubierto de manera individual para protegerlo del medio ambiente. En un sentido amplio, la microencapsulación provee un medio de envasar, separar y almacenar materiales en escala microscópica para su liberación posterior bajo condiciones controladas (Ré, 1998). La microencapsulación hoy en día se aplica para preservar y/o proteger numerosos ingredientes comerciales entre ellos colorantes naturales (Giese, 1993).

La oleorresina de pprika secada por aspersión fue mejor protegida contra la oxidación al encapsularla con maltodextrina de 15 DE (Beatus y col., 1985) Wagner y Warthesen (1995) encontraron que la estabilidad oxidativa de los carotenos de zanahoria encapsulados con almidón hidrolizado fue afectada por el equivalente de dextrosa; el almidón hidrolizado de 36.5 DE impartió una mayor vida útil que los almidones hidrolizados de menor DE. Desobry y col. (1999) afirmaron que la adición de mono y disacáridos a maltodextrinas, podría mejorar la retención de  $\beta$ -caroteno. La oxidación del  $\beta$ -caroteno superficial siguió una cinética de primer orden, mientras que el  $\beta$ -caroteno encapsulado, mostró una cinética de oxidación menor y también de primer orden. No obstante, después de 17 semanas de almacenamiento, el mejor tratamiento sólo logró la retención del 50% de  $\beta$ -caroteno. La estabilidad fue evaluada en almacenamiento en aire en humedades relativas de 11 y 33%, sin diferencias significativas. Vernon-Carter y col. (2001) obtuvieron microcápsulas conteniendo una mezcla de carotenoides solubles en aceite a partir de flor de cempasúchil, oleorresina de chile y carmín soluble en agua, por secado por aspersión de una emulsión múltiple W/O/W usando goma de mezquite o goma arábiga como el emulsificante polimérico en la fase acuosa externa. La mayor protección de los pigmentos fue proporcionada por la goma de mezquite.

Báez-González y col. (2004) reportaron que la goma de mezquite proporcionó una barrera potencialmente mejor contra la oxidación de lípidos comparada con la maltodextrina 10DE y la goma arábiga. Pérez-Alonso y col. (2003), encontraron que una mezcla de 17% de goma arábiga, 66% de goma de mezquite y 17% de maltodextrina 10 DE, dio mejor protección a lípidos contra la oxidación que cualquiera de los polímeros antes mencionados por sí mismos. Se ha demostrado que existe un intervalo de humedad

óptimo, que corresponde a un amplio rango de actividad de agua ( $a_w$ ), donde los productos naturales tienen una estabilidad máxima. Los cambios específicos en color, aroma, sabor, textura y estabilidad de productos alimenticios crudos y procesados, han sido asociados con diversos rangos de  $a_w$  (Rockland y Nishi, 1980). Beristain y col., (2002) reportaron que la goma de mezquite da una buena protección contra la oxidación al aceite esencial de naranja, siempre y cuando las microcápsulas se almacenen en ambientes con  $a_w$  adecuados. El proceso de oxidación del aceite esencial de naranja ocurrió con diferentes intensidades en función de la  $a_w$ ; la mayor estabilidad fue exhibida en el rango de  $a_w$  de 0.515 y 0.628.

En la obtención de microcápsulas, el material que es cubierto se refiere como fase interna y el material que recubre es llamado pared y generalmente no reacciona con el material a encapsular (Brazel, 1999).

Las microcápsulas presentan una variedad amplia de estructuras, algunas son de geometría esférica con una fase interna continua rodeada por una pared también continua (estructura de partícula simple), mientras que otras pueden tener una geometría irregular y pueden tener la fase interna distribuida en una matriz de material de pared (estructuras agregadas) (Shahidi y Han, 1993), y aunque hay diversas opiniones del intervalo de tamaño al que pertenecen, puede decirse que van desde 0.2 a 5000  $\mu\text{m}$  (Ré, 1998).

Para preparar las microcápsulas hay numerosas técnicas, y se ha sugerido que se podrían identificarse más de 200 métodos en la literatura de patentes (Brazel, 1999). No obstante algunos autores clasifican a los métodos de encapsulación en: físicos o mecánicos y químicos.

Como métodos químicos pueden citarse: Coacervación compleja, polimerización interfacial, gelificación iónica, incompatibilidad polimérica y atrapamiento en liposomas.

Entre los métodos físicos se encuentran el secado por aspersión y la encapsulación por lecho fluidizado como los más comunes (Shahidi y Han, 1993).

La selección del método estará en función del presupuesto, los costos, las propiedades del material a encapsular, el tamaño deseado de las microcápsulas, la aplicación y de los mecanismos de liberación (Ré, 1998; Brazel, 1999).

El secado por aspersión es el método más ampliamente usado para microencapsular ingredientes alimenticios y es el más económico (Ré, 1998). Este proceso es en sí uno de deshidratación pero se considera también de encapsulación ya que puede producir partículas que atrapan el material a cubrir. Por definición corresponde a la transformación de un fluido en un material sólido, atomizándolo en forma de gotas minúsculas en un medio de secado en caliente. La distribución del tamaño de las partículas obtenidas por este método es en general menor a 100  $\mu\text{m}$ , aunque hay que destacar que ello depende de las condiciones del proceso.

El proceso consiste de la preparación de la emulsión o suspensión del material a encapsular en una solución de encapsulante (generalmente en relaciones mínimas de 1:1, pero que pueden ser tan altas como 1:20), la atomización y la deshidratación de las partículas atomizadas. La adecuada selección del atomizador y el agente encapsulante, son factores críticos. Una de las grandes ventajas de este proceso, además de su simplicidad es que es apropiado para materiales sensibles al calor, ya que el tiempo de exposición a temperaturas elevadas es muy corto (5 a 30 s) (Deasy, 1983).

## **1.10 Materiales de pared más utilizados en microencapsulación por secado por aspersión y mecanismos de estabilización**

Los encapsulantes o materiales formadores de pared más utilizados cuando se seca una emulsión sencilla por secado por aspersión han sido: Polisacáridos (almidón y derivados, maltodextrinas, jarabes de maíz, ciclodextrinas, carboximetilcelulosa y derivados); gomas (arábiga, mezquite y alginato de sodio); lípidos (ceras, parafinas, grasas) y proteínas (gelatina, proteína de soya, caseinatos, suero de leche, zeína). Desde luego que el tipo de material encapsulante tendrá influencia en la estabilidad de la emulsión antes de secar, 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). Sin embargo cuando se trata de secar una emulsión múltiple, no todos estos materiales pueden emplearse, ya que como hemos visto con anterioridad, un factor que promueve la inestabilidad de emulsiones múltiples es el uso de altas concentraciones de un emulsificante hidrofílico eficiente, v.gr. suero de leche (Young y col., 1992; Espinoza-Herrera, 2002), que promueve un tamaño pequeño de gota de la emulsión W/O/W. Entonces para formar una microcápsula a partir de una emulsión múltiple el agente encapsulante debe poseer una relativamente baja actividad superficial, pero ser un magnífico estabilizante (como las gomas arábica y de mezquite), poseer baja viscosidad a altas concentraciones (porque para que el secado por aspersión sea económico, la dispersión debe alimentarse a altas concentraciones al secador por aspersión), y debe de ser altamente soluble en agua (de manera que la mayor parte de la molécula adsorbida en la interfase se proyecte hacia la fase acuosa, de tal forma que al secarse se forme una gruesa capa protectora alrededor del lípido encapsulado (Pérez-Alonso y col., 2003). Es por ello

que a pesar de que las maltodextrinas ofrecen una magnífica protección contra la oxidación de lípidos, no poseen actividad superficial y su eficiencia de encapsulación es baja, por lo que se busca usar estos materiales con otros como la goma arábiga y/o de mezquite para subsanar esta deficiencia y lograr propiedades funcionales de los microencapsulados que no se pueden lograr cuando se usa un solo material de pared (Beristain y col., 1999; Vernon-Carter y col., 2000). Recientemente se ha demostrado que por la interacción existente entre la goma arábiga y los lípidos se previene su oxidación. El mecanismo propuesto está relacionado con las propiedades de la goma arábiga de adsorberse en la interfase aceite/agua formando una película viscoelástica, donde los lípidos contribuyen con la coherencia de la estructura a través de la formación de empalmes o uniones por medio de gotitas de aceite en los anclajes de las cadenas de la goma arábiga (Matsumara y col., 2000).

El pH es un factor que puede afectar a los polisacáridos que se comportan como polielectrolitos (goma arábiga, goma de mezquite) alterando su conformación debido a las cargas intramoleculares, lo que da como resultado diferentes tamaños de partícula de las microcápsulas, modificaciones en la permeabilidad de las películas que forman y en la eficiencia de encapsulación y de retención de los aceites (Pedroza-Islas y col., 1999).

Resulta evidente que las propiedades de las películas encapsulantes formadas dependen en gran medida de la naturaleza del polímero. Una propiedad importante a considerar en un polímero, es su temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) ya que determinará la cohesividad que puede lograrse al formar la película. Calentando por encima de la  $T_g$  las capas de la película se vuelven más cohesivas debido a una mayor movilidad molecular por efecto de la temperatura, lo cual ayuda a la adhesión de la película en el material a cubrir (Deasy,

1983). Debajo de esta temperatura el polímero tiene un comportamiento como de un cristal. La  $T_g$  puede disminuirse con la adición de un plastificante, que además reducirá la fragilidad de la película y modificará su permeabilidad.

Las emulsiones múltiples W/O/W, que contienen los carotenoides solubles en agua y los solubles en aceite, pueden ser deshidratadas, formando microcápsulas dispersables en agua. Sin embargo, la información existente acerca de estos sistemas es escasa.

## *2. JUSTIFICACIÓN*

## JUSTIFICACIÓN

El mercado de los productos naturales ha experimentado un crecimiento sin precedentes a nivel mundial durante los últimos años, siendo un mercado altamente competitivo, de manera que para lograr introducir productos hay que ofrecer ventajas que no ofrecen productos ya existentes en el mercado.

México cuenta con una biodiversidad de plantas de las cuales se pueden obtener diversos productos como lo son colorantes naturales y agentes emulsificantes, los cuales tienen un gran valor agregado en el mercado nacional e internacional. La adecuada explotación de las plantas regionales pueden contribuir en el desarrollo económico de la zona en donde se producen.

En este trabajo se presenta una metodología en la cual se incorporan carotenoides hidro y lipo dispersables de flor de cempasúchil y chiles en una emulsión múltiple, proporcionando mayor gama de tonalidades que las logradas por cualquiera de los dos colorantes por sí solos. Además de proporcionar mayor estabilidad contra la degradación oxidativa utilizando una mezcla de biopolímeros basados en la goma de mezquite como elemento central de la mezcla, para lograr productos de mayor competitividad.

Para que un desarrollo de producto sea útil, no es tan solo el obtener un producto funcional, sino entender los mecanismos por los que ésta mejora funcional se da. En este trabajo se ha tratado de explicar la importancia y función de los biopolímeros en la estabilización de los colorantes naturales.

### *3. HIPÓTESIS*

## HIPÓTESIS

La microestructura de la matriz polimérica de microcápsulas secadas por aspersión se verá afectada por la relación de material de pared a emulsión primaria y concentración de sólidos, afectando el tamaño y distribución de glóbulos de la emulsión primaria en la matriz polimérica de la microcápsula, lo que afectará la retención y estabilidad de los carotenoides.

## 4. OBJETIVOS

# OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL

Obtención de microcápsulas de carotenoides solubles en agua y en aceite por secado por aspersión de emulsiones múltiples estabilizadas por una mezcla de carbohidratos poliméricos con y sin actividad superficial.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la influencia del contenido de sólidos y relaciones de la mezcla de biopolímeros a emulsión primaria en la emulsión múltiple para la obtención de dichas microcápsulas.
- Evaluar las microcápsulas con respecto a su morfología, eficiencia de microencapsulación de los carotenoides, retención de los carotenoides totales y cinética de degradación de los carotenoides totales.
- Evaluar las características de redispersión de una formulación seleccionada de microcápsulas, almacenadas a distintas condiciones de  $a_w$ .

# *5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL*

# METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

## 5.1 Materiales

La composición y concentración de los carotenoides totales (CCT) de los pigmentos usados en este estudio fueron proporcionados por Bioquimex-Reka, S.A de C.V (Querétaro, México). Los pigmentos usados fueron una oleoresina de chiles rojos (OCR) (Rodofila; lote número 00012419; con una concentración de carotenoides totales de 59.49 g/Kg; y una composición de :  $\beta$ -caroteno 7.47%; criptoxantina 8.17%; como-luteína 9.34%; *trans*-luteína 3.03%; *trans*-zeaxantina 4.23%; *trans*-capsantina 42.41%; violaxantina 1.23%; *cis*-capsantina 17.66%; *cis-trans*-capsantina 2.87%), y una oleoresina saponificada de pétalos de flor de cempasúchil (OSC) (Cromophyl L-30; número del lote 25050-1; con una concentración de carotenoides totales de 41.23g/Kg; composición:  $\beta$ -caroteno 0.60%; criptoxantina 0.97%; *cis*-luteína 0.20%; *trans*-luteína 76.74%; *trans*-zeaxantina 5.53%; epóxidos 15.95%). Una mezcla comercial de aceites de girasol-canola-cártamo (GCC) (Aceites, Grasas y Derivados, S.A. de C.V., México) fue usada en la fase oleosa de las emulsiones múltiples  $W_1/O/W_2$ . El emulsificador hidrofílico (EH) (Panodan SDK, ésteres de monoglicéridos y diglicéridos del ácido diacetil tartárico) y el emulsificador lipofílico (EL) (Grindsted PGPR 90, ésteres de ácidos grasos de poliglicerol y poliricinoleato) fueron proporcionados por Danisco México, S.A. de C.V. Los biopolímeros usados fueron goma gelana (GG) (K3B408) proporcionado por Merck & Co. (Kelco Div., Rahway, N.J., E.U.A), goma arábiga (GA) (*Acacia senegal*) proporcionado por Industrias Ragar, S.A. de C.V. (Ciudad de México, México), goma de mezquite (MG) (*Prosopis leavigata*) fue recolectada manualmente en el Estado Mexicano de San Luis Potosí (Orozco-Villafuente y

cols., 2003). Ambas GA y MG estuvieron en forma de lágrima y fueron purificadas como está descrito por Vernon-Carter y col. (1996). Maltodextrina DE 10 (MD) (Maltadex 10) fue obtenida de Complementos Alimenticios, S.A. de C.V. (Naucalpan, Estado de México, México). Toda agua usada en el experimento fue doblemente destilada y desionizada.

## **5.2 Formulación y preparación de las emulsiones múltiples**

Las emulsiones múltiples  $W_1/O/W_2$  fueron formuladas para tener un contenido de sólidos de 35% o 25%, para después producir por secado por aspersión microcápsulas con 0.25% de concentración teórica de carotenoides totales (CCT), y relaciones de material de pared a emulsión interna de 3.9:1, 2.6:1 y 1.4:1 (Tabla 2.1).

Las emulsiones múltiples fueron preparadas a temperatura ambiente usando un procedimiento de emulsificación de dos etapas (Dickinson y McClements, 1996). En la primera etapa se elaboraron 3 emulsiones  $W_1/O$  teniendo todas un 20% (w/w) de fase acuosa dispersa, una concentración de goma gelana de 0.5% (w/w) y una concentración de emulsificador de bajo peso molecular total del 8% (w/w) (1 parte de EH a 4 partes de EL), pero a las que se añadieron diferentes CCT como sigue: 1% (w/w) en  $(W_1/O)_{1\%}$ , 0.75% (w/w) en  $(W_1/O)_{0.75\%}$ , y 0.5% en  $(W_1/O)_{0.5\%}$  con una relación de carotenoides de OSC a carotenoides de OCR de 1:3. En todos los casos la fase acuosa interna ( $W_1$ ) (agua destilada + GG + EH + OSC) fue adicionado gota a gota a la fase oleosa (O) (GCC + OCR + EL) usando un homogenizador de corte alto Silverson L4R (Silverson Machines Ltd., Waterside, Chesham, Buckinghamshire, Inglaterra) a 5800 rpm por 5 min.

Tabla 2.1. Composición de las emulsiones múltiples.

Ingrediente/Formulación⇒ ↓	$F_{35\%,3.9}$	$F_{25\%,3.9}$	$F_{35\%,2.6}$	$F_{25\%,2.6}$	$F_{35\%,1.4}$	$F_{25\%,1.4}$
Fase acuosa interna ( $W_1$ )	<u>Cantidad (g)</u>					
Goma gelana	0.08	0.06	0.11	0.08	0.16	0.11
Emulsificador hidrofílico	1.26	0.90	1.68	1.20	2.52	1.80
Carotenoides saponificados de pétalos de cempasuchil	4.77	3.40	4.76	3.40	4.77	3.41
Agua	9.64	6.88	14.44	10.32	24.05	17.18
Fase oleosa intermedia (O)						
Emulsificador lipofílico	5.04	3.60	6.72	4.80	10.08	7.20
Aceite comestible comercial	47.79	34.30	67.34	48.10	105.99	75.71
Carotenoides esterificados de chiles rojos	9.93	7.09	9.93	7.09	9.92	7.08
Fase acuosa externa ( $W_2$ )						
Mezcla de carbohidratos poliméricos	250.65	179.02	229.19	163.71	186.31	133.07
Agua	570.58	664.70	565.78	661.27	556.17	654.41
Contenido de sólidos de la emulsión	35	25	35	25	35	25
$W_1/O/W_2$ (%)						
Concentración teórica de carotenoides totales en las microcápsulas (%)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Relación del material de pared a emulsión interna en las microcápsulas	3.9:1	3.9:1	2.6:1	2.6:1	1.4:1	1.4:1

En la segunda etapa las emulsiones primarias  $(W_1/O)_{1\%}$ ,  $(W_1/O)_{0.75\%}$  y  $(W_1/O)_{0.5\%}$  fueron re-emulsificadas en una solución acuosa de la mezcla de los biopolímeros (17% GA- 66% MG -17% MD) (Pérez-Alonso y col., 2003) a diferentes concentraciones (entre 16.9 a 30.5% en peso) produciendo emulsiones múltiples  $(W_1/O/W_2)_{x,y}$  donde el subíndice  $x$  denota 35% o 25% de contenido de sólidos totales y el subíndice  $y$  denota la relación de la mezcla de biopolímeros a emulsión primaria de 3.9:1, 2.6:1 o 1.4:1 en

base seca dando las siguientes 6 formulaciones:  $(W_1/O/W_2)_{35\%,3.9}$ ,  $(W_1/O/W_2)_{25\%,3.9}$ ,  $(W_1/O/W_2)_{35\%,2.6}$ ,  $(W_1/O/W_2)_{25\%,2.6}$ ,  $(W_1/O/W_2)_{35\%,1.4}$  y  $(W_1/O/W_2)_{25\%,1.4}$ . El secado de las emulsiones  $(W_1/O/W_2)_{x,y}$  produjeron microcápsulas  $M_{x,y}$  con una CCT teórica de 0.25% (w/w) como se indicó anteriormente. La dispersión de las emulsiones  $(W_1/O)$  en las soluciones acuosas de la mezcla de los biopolímeros fue hecha usando un homogenizador Silverson a 5200 rpm por 10 min.

### **5.3 Determinación de viscosidad de las emulsiones múltiples**

La viscosidad de las emulsiones múltiples  $W_1/O/W_2$  fue determinada como una función de la tasa de corte (cuyo rango varió de 1 a 300/s) usando un Reómetro Dinámico de Corte Physica DSR 4000 (Physica Messtechnik, Stuttgart, Alemania), con una geometría de cono-plato, de 75 mm de diámetro, el ángulo del cono fue de 2°. La temperatura fue mantenida a 25°C mediante un sistema Peltier.

### **5.4 Obtención de las microcápsulas.**

Las emulsiones múltiples se alimentaron a un secador por aspersión Mobile Minor Niro-Atomizer (Copenhague, Dinamarca) a un flujo volumétrico de 20 mL/min, una presión del aire de 2.8 bares, temperatura del aire de entrada  $170 \pm 5^\circ\text{C}$ , y una temperatura del aire de salida de  $80 \pm 3^\circ\text{C}$ , y produciéndose microcápsulas ( $M_{x,y}$ ) donde

los subíndices  $x$  y  $y$  son los mismos que aquellos para las emulsiones  $W_1/O/W_2$  a partir de las cuales se originaron.

### **5.5 Análisis del tamaño de las emulsiones múltiples y de las microcápsulas**

El tamaño de gota volumétrico promedio  $(d_{4,3})_{Gota}$  de las emulsiones múltiples  $(W_1/O/W_2)_{x,y}$  y el tamaño de partícula volumétrico promedio  $(d_{4,3})_{Part}$  de las microcápsulas  $M_{x,y}$  fue determinado con un Analizador de Tamaño de Partícula y Gota Malvern serie 2600 (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, Reino Unido). Las emulsiones fueron dispersadas en agua y las microcápsulas en 2-propanol.

### **5.6 Contenido de humedad y $a_w$ de las microcápsulas**

El contenido de humedad y la  $a_w$  de las microcápsulas fué determinado después de 20 días de almacenamiento a diferentes  $a_w$  en un ambiente de  $35^\circ\text{C}$ . La determinación del contenido de humedad fue hecha con un analizador termogravimétrico TA modelo TGA 2950 (New Castle, Del., E.U.A). Se colocaron de 15 a 20 mg de los polvos en el horno termogravimétrico y se secaron isotérmicamente a  $60^\circ\text{C}$  durante 90 min usando aire como gas de purga con una humedad absoluta de  $0.008 \text{ kg H}_2\text{O/kg}$  de aire seco y una velocidad de flujo de  $100 \text{ cm}^3/\text{min}$ .

La actividad de agua fue medida con un medidor de actividad de agua Aqua Lab serie 3TE (Decagon Devices Inc., Pullman, Wash., E.U.A). Las mediciones fueron realizadas por duplicado.

## **5.7 Almacenamiento**

Las distintas microcápsulas  $M_{x,y}$  fueron colocadas en desecadores conteniendo una solución saturada de  $MgCl_2$  durante 30 días. Los desecadores fueron colocados en un incubador con temperatura controlada a  $35^{\circ}C$ . La actividad de agua ( $a_w$ ) a esta temperatura fue de 0.318. Las muestras fueron retiradas periódicamente para análisis posteriores.

Adicionalmente, 15 g de muestra de las microcápsulas  $M_{35\%,3.9}$  fueron colocadas inmediatamente después de haber sido secadas por aspersión en desecadores conteniendo soluciones saturadas de  $LiCl$ ,  $KC_2H_3O_2$ ,  $MgCl_2$ ,  $K_2CO_3$ ,  $Mg(NO_3)_2$ ,  $NaNO_2$ ,  $NaCl$  y  $KCl$  durante 20 días a  $35^{\circ}C$  (anexo C). Este fue tomado como tiempo cero. Las actividades de agua de los desecantes fueron: 0.108, 0.215, 0.318, 0.436, 0.515, 0.628, 0.742 y 0.821 respectivamente. La actividad de agua cercana a cero fue lograda colocando  $P_2O_5$  en un desecador.

## **5.8 Concentración de carotenoides**

Debido a la amplia composición de los carotenoides combinados de OCR y OSC, un espectro de absorción (Britton, 1995) de una mezcla de 3 partes de carotenoides totales de OCR a 1 parte de carotenoides totales de OSC en una mezcla 1:1 (v/v) de hexano:acetona fue realizado con un espectrofotómetro Genesis 2 UV/Vis (Spectronic Unicam, Rochester, N.Y., E.U.A.). Se observó una meseta en un espectro de absorción máximo en el intervalo de longitud de onda de 440 a 480 nm y la longitud de onda del punto medio fue tomada para medir la absorbancia de los carotenoides (anexo D).

La concentración de carotenoides totales inicial y los cambios durante su tiempo de almacenamiento fueron seguidos solubilizando aproximadamente 0.05 g de polvo en 6 mL de una mezcla de NaCl 10%:metanol 1:1 (v/v) contenidos en un tubo de prueba. El tubo de prueba fue sellado y agitado en un vortex durante 5 min, posteriormente 30 mL de una mezcla de hexano:acetona 1:1 (v/v) fue adicionada. El contenido de los tubos fueron centrifugados a 3000 g durante 10 min a 10°C en una centrífuga refrigerada Hermle Z 323 K (Hermle Labortechnik GMBH, Wehingen, Alemania). La densidad óptica de la fracción orgánica superior fue medida a 460 nm.

Los carotenoides superficiales iniciales y los cambios durante el tiempo de almacenamiento fueron seguidos por lavado de 0.1 g del polvo en 10 mL de una mezcla de hexano:acetona 1:1 (v/v) contenidos en un tubo de prueba. Posteriormente los tubos de prueba fueron agitados en un vortex durante 2 min y luego centrifugados a 1000 g durante 3 min a 10°C. La densidad óptica de la fracción orgánica superior fue medida a 460 nm.

La cantidad de carotenoides presentes en las microcápsulas o extractos de plantas fue calculado por la ecuación (Britton, 1996).

$$x = \frac{A y}{(A_{1cm}^{1\%} \cdot 100)} \dots\dots\dots(5.1)$$

donde  $x$  es la masa de carotenoides (g),  $y$  el volumen de la solución,  $A$  la absorbancia medida, y  $A_{1cm}^{1\%}$  es el coeficiente de absorción específica de una solución de 1 g de esos carotenoides en 100 mL de solución. Un valor arbitrario de 2500 es frecuentemente tomado para dar un estimado de un contenido de carotenoides totales de un extracto (Britton, 1996).

La eficiencia de microencapsulación (EM) fue calculada como sigue (McNamee y col., 1998):

$$EM = \left[ \frac{(\text{carotenoides totales} - \text{carotenoides superficiales})}{\text{carotenoides totales}} \right] \times 100 \dots\dots\dots(5.2)$$

Todas las determinaciones fueron hechas en triplicado.

### **5.9 Redispersión de los polvos encapsulados**

Un gramo de muestra de las microcápsulas de  $M_{35\%,3.9}$  almacenadas a distintos valores de actividad de agua y  $35^\circ\text{C}$  fueron colocadas en 40 g de agua destilada. Se tomó como tiempo inicial el contacto del polvo con el agua hasta que no hubo evidencia visual de partículas de polvo, se usó un cronómetro. Las dispersiones fueron después observadas

en un microscopio óptico BX 45 series Olympus (Olympus Optical Co. Ltd., Tokio, Japón) acoplado a una cámara de película digital Olympus C-3030 E imagen Pro Plus software versión 4.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, Md., E.U.A.). Algunas micrografías seleccionadas se presentan en la sección de resultados y discusiones, y en el anexo E. Todas las determinaciones fueron realizadas en triplicado.

### **5.10 Microscopía electrónica de barrido (MEB)**

Las microcápsulas fueron pegadas a un portamuestras de MEB usando una cinta adhesiva por ambos lados (Ted Pella, Redding, Calif., E.U.A.) para examinar su estructura externa. Unas microcápsulas fueron fracturadas con una navaja de rasurar para examinar su estructura interna. En ambos casos las muestras fueron subsecuentemente cubiertas con oro (Rosenberg y Young, 1993) en un Fine Coat Ion Sputter JFC 1100 (Jeol Ltd., Akishima, Japón). La morfología de las microcápsulas fue vista con un microscopio electrónico de alto vacío Jeol a 25 kV. Algunas micrografías son presentadas en la sección de resultados y discusiones. En el anexo E y F se encuentra una serie completa de micrografías para los distintos tratamientos.

### **5.11 Análisis estadístico**

Análisis de variancia (ANDEVA) y pruebas de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) fueron realizadas para los resultados de tamaño de partícula y carotenoides usando el sistema de análisis

estadístico Statgraphics 7 (Statistical Graphics Corp. Manugistics Inc., Cambridge, Mass., E.U.A.).

El orden de la cinética de degradación de los carotenoides totales fue determinado por la función que mejor se ajustó a los datos normalizados de CCT en el tiempo de la experimentación (anexo G).

## *6. RESULTADOS*

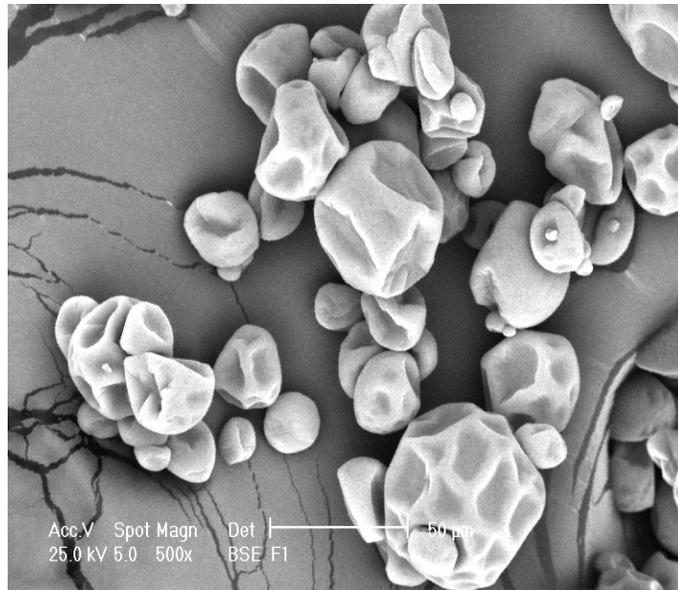
*y*

*DISCUSIÓN*

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **6.1. Efecto del contenido de sólidos y la relación del material de pared a emulsión interna sobre la morfología de las microcápsulas.**

La morfología, tamaño de partícula, eficiencia de microencapsulación, retención y la cinética de degradación de los carotenoides totales de las microcápsulas almacenadas a  $a_w$  de 0.318 y 35°C fueron afectadas por el contenido de sólidos y la relación de la mezcla de biopolímeros a emulsión primaria de las emulsiones múltiples  $W_1/O/W_2$ . Todas las microcápsulas exhibieron una topografía externa caracterizada por más o menos formas esféricas, con superficies abolladas y un alto grado de integridad, es decir, no se observaron grietas o poros en la superficie externa. Imágenes típicas de las microcápsulas obtenidas a partir del mayor contenido de sólidos y relación de mezcla de biopolímeros a emulsión primaria ( $M_{35\%,3.9}$ ) se muestran en la Fig. 6.1a y a partir del menor contenido de sólidos y relación de mezcla de biopolímeros a emulsión primaria ( $M_{25\%,1.4}$ ) en la Fig. 6.1b.



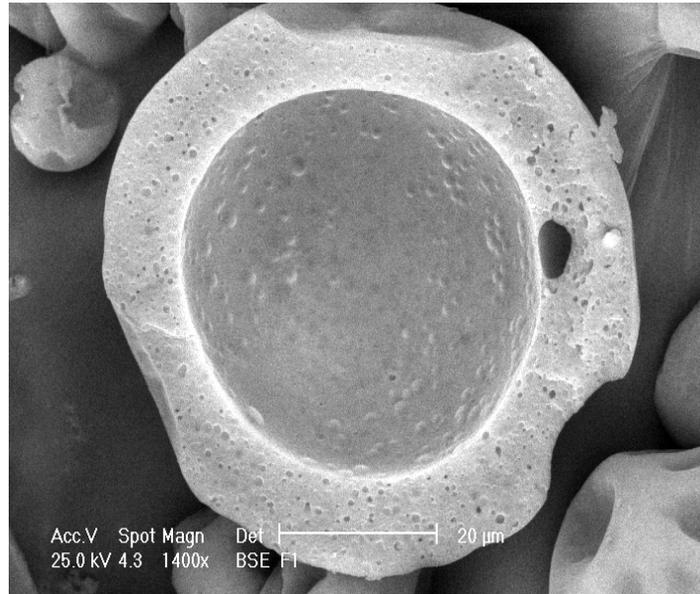
(a)



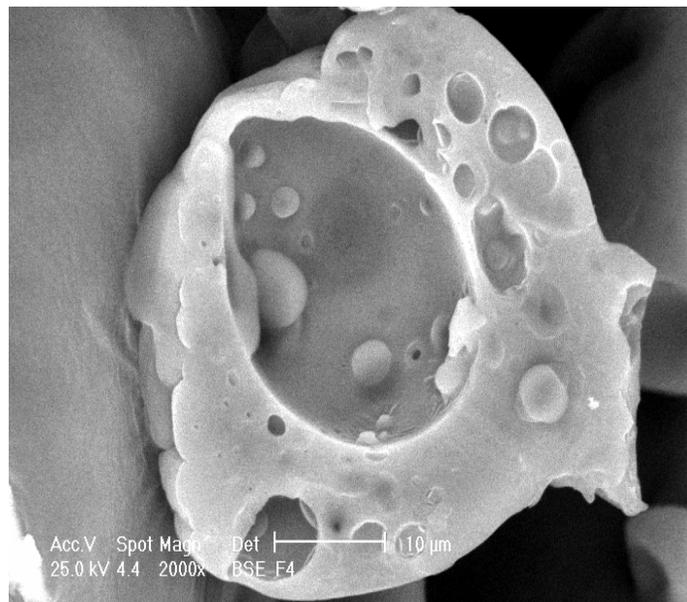
(b)

Fig. 6.1. Micrografías de la estructura externa de las microcápsulas: **(a)**  $M_{35\%,3.9}$ ; y **(b)**  $M_{25\%,1.4}$ .

Todas las microcápsulas formadas fueron del tipo matriz (Ré, 1998), exhibiendo un hueco central (Fig. 6.2a), y donde la emulsión primaria está embebida como micropartículas o microgotas dentro de la matriz de pared sólida (Fig. 6.2b).



(a)



(b)

Fig. 6.2. Micrografías de la estructura interna de las microcápsulas: **(a)** M<sub>35%,3.9</sub>; y **(b)** M<sub>25%,2.6</sub>.

La formación del hueco central está relacionada a la expansión de las partículas durante las etapas posteriores al proceso de secado (Verhey, 1973). Al llegar o exceder la temperatura de ebullición del agua, se desarrollan grandes presiones parciales y fracciones de moles de vapor de agua con el incremento de la temperatura de la gota, juntándose las burbujas de aire atrapado. Una fuerza motriz de gases disueltos provenientes de la alimentación durante el secado ocurre cuando el agua es evaporada y de esta forma la temperatura de la gota incrementa, disminuyendo la solubilidad del aire (Ré, 1998). En este estudio, las emulsiones múltiples  $W_1/O/W_2$  con alto contenido de sólidos (35%) produjeron microcápsulas con huecos centrales (Fig. 6.2a) y tamaños de partículas grandes (Tabla 6.1), mientras que las emulsiones múltiples con bajo contenido de sólidos proporcionaron microcápsulas con huecos centrales (Fig. 6.2b) y tamaños de partículas menores (Tabla 6.1). El tamaño del hueco central parece depender de la viscosidad exhibida por las emulsiones múltiples (Fig. 6.3). La dependencia de la viscosidad con la tasa de corte fue ligera para todas las emulsiones, algunas veces incrementando y otras disminuyendo. Por simplicidad se asumió que las emulsiones se comportaron como fluidos newtonianos ya que de acuerdo a la ley de la potencia, los valores de índice de flujo fueron muy cercanos a 1.

## **6.2. Efecto del contenido de sólidos y la relación de material de pared a emulsión interna sobre la viscosidad y tamaño de las emulsiones y microcápsulas.**

Las emulsiones múltiples con alto contenido de sólidos exhibieron viscosidades aparentes mayores que las emulsiones con bajo contenido de sólidos, independientemente de la relación de la mezcla de biopolímeros a emulsión interna (Figura 6.3). Dado el contenido de sólidos, las emulsiones con mayor relación de la

mezcla de biopolímeros a emulsión primaria mostraron mayor viscosidad aparente (Figura 6.3). Las viscosidades aparente mayores limitan la difusión de gases a través de la red viscosa. La presión parcial de los gases disueltos aumenta con el incremento de la temperatura, y la formación del hueco central comienza. La expansión tipo globo de las gotas continúa hasta alcanzar y exceder el umbral de presión parcial de los gases.

Tabla 6.1. Tamaño de gota volumétrico promedio  $(d_{4,3})_{Gota}$ , viscosidad aparente  $(\eta_{app})$  de las emulsiones múltiples  $(W_1/O/W_2)_{x,y}$ , y tamaño de partícula volumétrico promedio  $(d_{4,3})_{Part}$  de las microcápsulas  $M_{x,y}$ .

Valores de subíndice x, y en las microcápsulas $M_{x,y}$ o en las emulsiones múltiples $(W_1/O/W_2)_{x,y}$	$(d_{4,3})_{gota}$ ( $\mu m$ )	$\eta_{app}$ (Pa.s)	$(d_{4,3})_{Part}$ ( $\mu m$ )
x = 35%, y = 3.9	$1.48 \pm 0.01^f$	0.180	$34.01 \pm 0.82^a$
x = 25%, y = 3.9	$3.53 \pm 0.01^c$	0.030	$27.91 \pm 0.00^c$
x = 35%, y = 2.6	$1.77 \pm 0.01^e$	0.130	$30.31 \pm 0.58^b$
x = 25%, y = 2.6	$3.93 \pm 0.01^b$	0.028	$25.13 \pm 0.22^d$
x = 35%, y = 1.4	$2.76 \pm 0.01^d$	0.089	$30.54 \pm 0.52^b$
x = 25%, y = 1.4	$5.31 \pm 0.02^a$	0.023	$25.05 \pm 0.34^d$

Valores en la misma columna con distintas letras son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ )

En este punto, la difusión selectiva de los gases atrapados puede tomar lugar a través de la red viscosa. Las matrices en el estado gomoso son más sensibles a la difusión de los solutos. Las difusiones violentas de gases a través de la matriz viscosa pudiera resultar en la formación de grietas y cráteres en la piel seca (Ré, 1998). En este trabajo todas las microcápsulas  $M_{x,y}$  estuvieron libres de grietas y cráteres, así que no existieron difusiones violentas de gases a través de la matriz polimérica evidenciado por la topología de la superficie (Fig. 6.1a, 6.1b). Por lo tanto la superficie de las partículas secas fueron encogidas y dentadas, característica asociada con las microcápsulas en las

cuales pocas burbujas de aire están atrapadas en el líquido de alimentación al secador (Verhey, 1973).

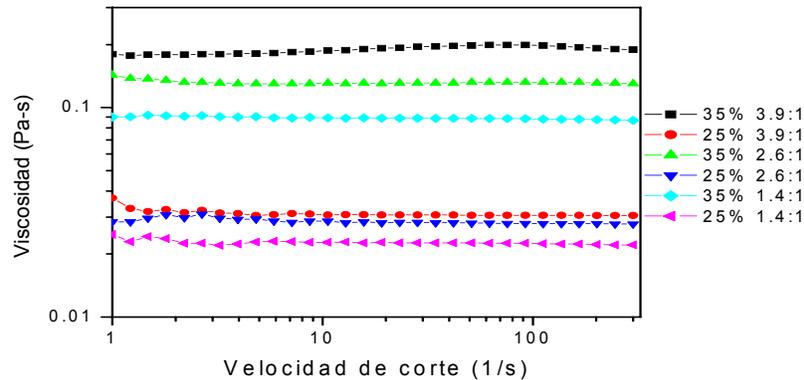


Fig. 6.3. Curvas de viscosidad-tasa de corte de las emulsiones múltiples  $(W_1/O/W_2)_{x,y}$ .

Por otro lado, el tamaño promedio de gota de las emulsiones  $(W_1/O/W_2)_{x,y}$  parece ser responsable del tamaño y distribución de las vacuolas en la matriz seca. Tamaños de gota pequeños de las emulsiones  $(W_1/O/W_2)_{x,y}$  resultan en tamaños de vacuolas pequeñas y distribución homogénea de las vacuolas (Figura 6.2a), mientras que tamaños de gotas grandes produjeron tamaños grandes de vacuolas y una distribución heterogénea de vacuolas (Figura 6.2b). Igualmente, el tamaño de gota de la emulsión múltiple depende de la concentración de la mezcla de biopolímeros en la fase acuosa externa ( $W_2$ ). A mayor concentración de la mezcla de biopolímeros en  $W_2$  más pequeña fue la gota de la emulsión múltiple (Tabla 6.1), mayor fue el hueco central, más pequeñas fueron las vacuolas y de menor espesor fue el grosor de la matriz seca (Figura 6.2a).

### **6.3. Eficiencia de encapsulación y retención de los carotenoides**

La eficiencia de encapsulación de los carotenoides y la retención de los carotenoides fue mayor en las microcápsulas que mostraron tamaños pequeños de vacuolas y distribución homogénea (Tabla 6.2). Es bien sabido que el factor primario determinante en la retención de volátiles durante el secado es el contenido de sólidos disueltos en la alimentación. El incremento en la concentración de sólidos totales resulta en un incremento en la viscosidad de la emulsión (Ré, 1998) y en una disminución del tamaño de las vacuolas. Sottitantawat y col. (2003) reportaron que una emulsión fina es estable durante la atomización y durante el secado por aspersion, ya que las gotas grandes de emulsión pueden ser cortadas en gotas más pequeñas debido al enorme gradiente de velocidad y a la turbulencia en la película líquida delgada de la superficie en un atomizador rotatorio. Algunas de las gotas cortadas se rompen y se evaporan durante la atomización, y esto también explica las grandes pérdidas de sabor a partir de gotas de emulsión grandes durante el secado por aspersion así pues; el tamaño de gota de la emulsión es un factor significativo para la retención del sabor, ya que se observó que al incrementar el tamaño de gota de la emulsión O/W la retención de sabores disminuyó en las microcápsulas obtenidas por secado por aspersion.

También indicaron que la cantidad de aceite superficial incrementó con el aumento en el tamaño promedio de la gota de la emulsión para la mayoría de los materiales de pared.

#### **6.4. Cinética de degradación de los carotenoides en las distintas microcápsulas $M_{x,y}$**

La concentración de carotenoides totales (CCT) siguió una reacción de degradación de orden cero para todas las microcápsulas  $M_{x,y}$  con valores de  $R^2 > 0.91$  (sobre la de 1er orden) en todos los casos. Cuando la concentración de oxígeno no es limitante, los carotenoides siguen una reacción de degradación de 1er orden (von Elbe, 1987). La mayoría de los trabajos reportan que los carotenoides sufren una reacción de degradación de 1er orden (Desobry y col., 1997, 1999; Wagner y Warthesen, 1995), ocurriendo la degradación generalmente en 2 periodos distintos: un periodo con una tasa de degradación inicial rápida alrededor de 4 a 6 semanas, y un periodo con tasa de degradación más lenta a tiempos mayores. En este trabajo la degradación de los pigmentos fue seguida por un periodo máximo de 30 días, así que probablemente la degradación de la CCT caería en este primer periodo rápido de degradación. La cinética de degradación de la CCT (Tabla 6.2) ocurrió a una velocidad significativamente más rápida ( $P < 0.05$ ) en las microcápsulas que exhibieron tamaños más pequeños y las vacuolas distribuidas uniformemente en la matriz de la pared que en las microcápsulas con tamaños mayores y distribución de vacuolas más heterogéneas. Estos resultados sugieren que a tamaños de gota más pequeños distribuidos de la emulsión primaria  $W_1/O$  en la matriz de la pared de la microcápsula, mayor será el área superficial expuesta de la emulsión  $W_1/O$  en la matriz de la pared de la microcápsula favoreciendo la oxidación de los carotenoides. Las microcápsulas obtenidas por secado por aspersión favorecieron la oxidación del  $\beta$ -caroteno sobre los polvos obtenidos por liofilización y secado en tambor (Desobry y col., 1997). Las cápsulas secadas por aspersión fueron esféricas y mostraron una alta relación de superficie/volumen para una

esfera y un gran número de esferas pequeñas pudieron favorecer la oxidación del  $\beta$ -caroteno. Los polvos liofilizados y secados en tambor mostraron formas complejas porque ellos fueron molidos después de la deshidratación. Aunque ellos tuvieron la misma relación de material de pared/caroteno, las partículas mayores proporcionaron una mayor barrera contra la difusión del oxígeno hacia los carotenos internos y también tuvieron menos carotenos superficiales por volumen.

### **6.5. Vida media de los carotenoides en las distintas microcápsulas $M_{x,y}$**

Definiendo la vida media de la CCT,  $t_{1/2}$ , como el tiempo necesario para que la concentración de carotenoides totales iniciales ( $C_0CT$ ), disminuya a la mitad de su valor inicial, obtenemos (Levenspiel, 1972):

$$t_{1/2} = \frac{2^{n-1} - 1}{k(n-1)} C_0CT^{1-n} \quad (6.1)$$

Donde  $n$  es el orden de la reacción y  $k$  la velocidad constante de la cinética de degradación. Cuando  $n=0$  la vida media está dada por:

$$t_{1/2} = \frac{0.5}{k} C_0CT \quad (6.2)$$

Y en este estudio como  $C_0CT$  fue normalizada, este adquiere un valor de 1, así que

$$t_{1/2} = \frac{0.5}{k} \quad (6.3)$$

La vida media para la CCT de las diferentes microcápsulas  $M_{x,y}$  a  $35^\circ\text{C}$  está reportado en la Tabla 6.2, en un rango de un valor mínimo significativamente diferente de 18.4 días para

las microcápsulas  $M_{35\%,2.6}$  a un valor máximo de 25 días para las microcápsulas  $M_{25\%,1.4}$  ( $P < 0.05$ ).

Desobry y otros (1999) reportaron que la vida media de los encapsulados de  $\beta$ -caroteno con maltodextrina DE 25 a  $35^\circ\text{C}$  en el periodo cinético de oxidación rápido fue de 3 semanas lo cual coincidió con el rango de  $t_{1/2}$  encontrado en este estudio.

Tabla 6.2. Eficiencia de encapsulación, retención de carotenoides totales y vida media de los carotenoides totales de las microcápsulas  $M_{x,y}$ .

Valores de subíndices $x$ y $y$ en las microcápsulas $M_{x,y}$ o en las emulsiones múltiples $(W_1/O/W_2)_{x,y}$	Eficiencia de microencapsulación (%)	Retención de carotenoides totales (%)	Cinética de degradación de carotenoides totales (k) $(CCT/C_oCT, d^{-1})$ at $35^\circ\text{C}$	Vida media $t_{1/2}$ (d) $35^\circ\text{C}$
X = 35%, y = 3.9	87.5 <sup>a</sup>	84.8 <sup>a</sup>	0.0235 <sup>b</sup>	21.3 <sup>c</sup>
X = 25%, y = 3.9	72.8 <sup>c</sup>	78.8 <sup>b</sup>	0.0242 <sup>c</sup>	20.7 <sup>c</sup>
X = 35%, y = 2.6	76.1 <sup>b</sup>	85.6 <sup>a</sup>	0.0271 <sup>d</sup>	18.4 <sup>d</sup>
X = 25%, y = 2.6	65.1 <sup>d</sup>	80.0 <sup>b</sup>	0.0234 <sup>b</sup>	21.4 <sup>b</sup>
X = 35%, y = 1.4	27.2 <sup>e</sup>	75.6 <sup>c</sup>	0.0236 <sup>b</sup>	21.2 <sup>b</sup>
X = 25%, y = 1.4	25.6 <sup>f</sup>	72.4 <sup>d</sup>	0.0200 <sup>a</sup>	25.0 <sup>a</sup>

Valores en la misma columna mostrando diferentes letras son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ )

### 6.6. Contenido de humedad y $a_w$ de las microcápsulas $M_{35\%, 3.9}$ almacenadas a diferentes ambientes de $a_w$ .

Basado en las propiedades estructurales, la eficiencia de encapsulación y la retención de los carotenoides de las microcápsulas, la formulación  $M_{35\%,3.9}$  fue seleccionada para estudiar la influencia de la  $a_w$  durante el almacenamiento sobre los cambios microestructurales y químicos de las microcápsulas inmediatamente después de que ellas fueron obtenidas por secado por aspersión ( $\sim 7.8$  g  $\text{H}_2\text{O}$ /g sólidos secos). El contenido de humedad ( $\text{CH}_m$ ) y actividad de agua ( $a_{wm}$ ) de las microcápsulas  $M_{35\%,3.9}$  al día 20,

almacenadas a distintos ambientes de  $a_w$  a 35°C, se muestran en la Tabla 6.3 como referencia al punto.

### **6.7. Cinética de degradación de carotenoides en las microcápsulas M<sub>35%, 3,9</sub> como una función de la actividad de agua.**

La cinética de degradación de los carotenoides para las microcápsulas M<sub>35%,3,9</sub> permaneció prácticamente constante en el rango de  $a_w$  de 0 a 0.515. Sin embargo surgió un  $k$  máximo a una  $a_w$  de 0.628, cayendo a un valor mínimo prácticamente constante en un rango de  $a_w$  entre 0.742 y 0.821 (Fig. 6.4).

La degradación de carotenoides en este trabajo está muy relacionado a las interacciones entre la humedad y la matriz biopolimérica de las microcápsulas. La degradación máxima de los carotenoides a  $a_w$  de 0.628 puede deberse a efectos pro-oxidantes por (a) reducción de la viscosidad promoviendo la movilidad, (b) disolución de los metales precipitados, y/o (c) hinchazón de las matrices sólidas exponiendo nuevas superficies catalíticas (Labuza, 1975).

Tabla 6.3. Contenido de humedad y actividad de agua de las microcápsulas M<sub>35%, 3,9</sub> almacenadas en diferentes ambientes de  $a_w$  durante 20 días a 35 °C.

Actividades de agua de las soluciones saturadas de sal ( $a_w$ )	Actividad de agua de microcápsulas ( $a_{wm}$ )	Contenido de humedad de microcápsulas (MC <sub>m</sub> ) (g H <sub>2</sub> O.g <sup>-1</sup> sólidos secos)
0	0.022	2.05 ± 0.03
0.108	0.121	5.06 ± 0.03
0.215	0.230	5.97 ± 0.04
0.318	0.334	7.61 ± 0.16
0.436	0.454	8.82 ± 0.13
0.515	0.534	10.81 ± 0.04
0.628	0.649	14.20 ± 0.03
0.742	0.765	16.62 ± 0.09
0.821	0.845	18.15 ± 0.25

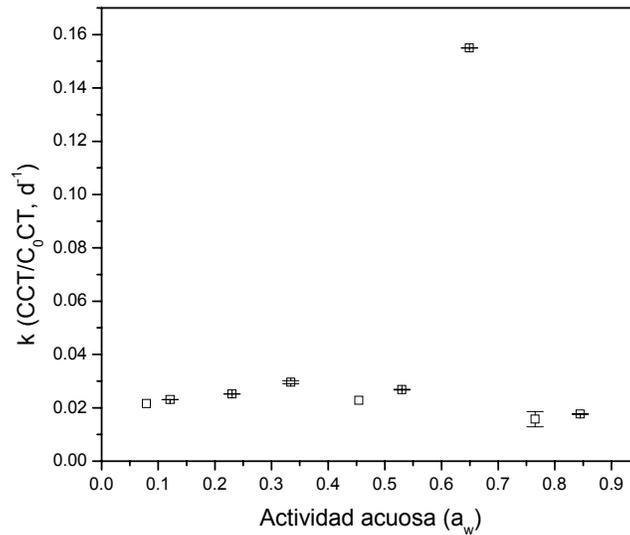
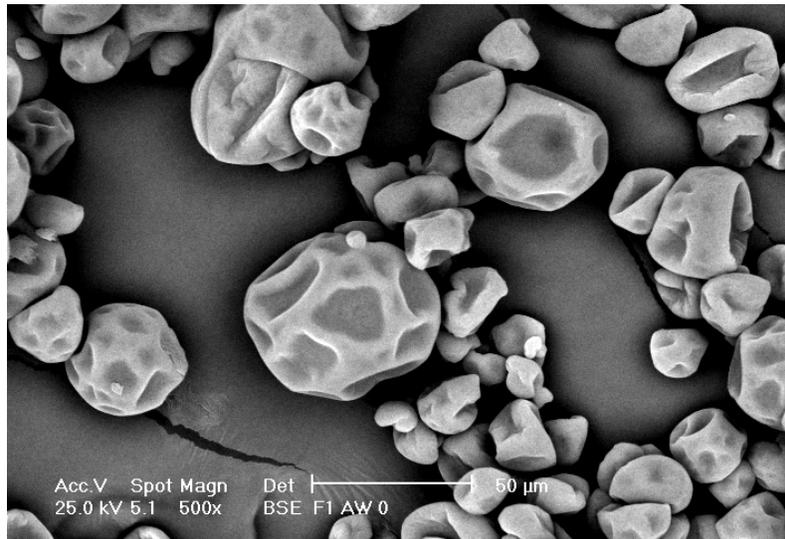


Fig. 6.4. Cinéticas de degradación de carotenoides de las microcápsulas  $M_{35\%,3,9}$  como una función de la actividad de agua.

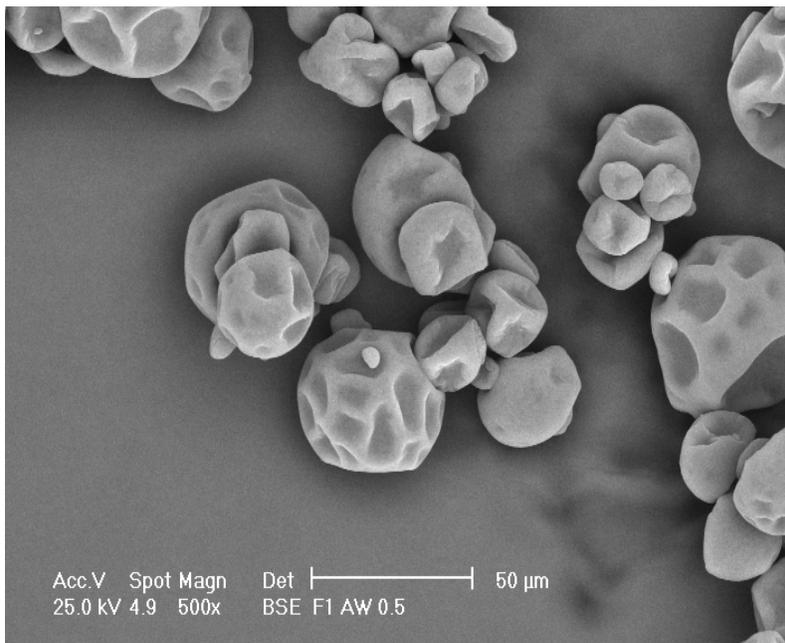
La temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) de las microcápsulas no fue medida porque el material de pared fue hecho de 3 biopolímeros. Sin embargo, la  $T_g$  de aceite de naranja encapsulado en una matriz de goma de mezquite como una función de la  $a_w$  a 35°C ha sido reportada por (Beristain y col., 2002). La  $T_g$  fue menor de 35°C a  $a_w$  de 0.515 y mayores. Esos resultados corroboran los cambios observados en la morfología de las microcápsulas almacenadas a distintas  $a_w$ . Con  $a_w$  entre 0 y 0.436 la topología superficial de las microcápsulas permanece visualmente la misma, mostrando superficies libres de grietas y poros pero caracterizadas por abolladuras profundas (Fig. 6.5a). A  $a_w$  de 0.515 agrupamientos de microcápsulas parcialmente fusionadas son visibles, y las abolladuras llegan a ser poco profundas, el comienzo del hinchamiento de la estructura es evidente (Fig.6.5b).

La estructura original de las microcápsulas se perdió completamente a  $a_w$  de 0.628 (Fig. 6.6) debido a la disolución del material de pared, que produjo una extensiva fusión de las microcápsulas. A una  $a_w$  por arriba de 0.515 el agua actúa como un plastificante de la matriz de la pared de carbohidratos conduciendo a un flujo viscoso y un eventual colapso de la estructura (Chuy y Labuza, 1994). El efecto pro-oxidante del agua a altas  $a_w$  es debido al incremento en la movilidad de los reactantes (Leung, 1987).

Minemoto y col. (1997) reportaron que la matriz de goma arábica de encapsulados de metil linolato se suavizó a HR de 75% permitiendo que los lípidos migraran hacia la superficie y oxidarse. No obstante, la menor tasa de degradación constante se encontró a  $a_w$  de 0.742 y 0.821. Las moléculas de agua se ligan a sitios hidrofílicos específicos cuando los valores de  $a_w$  son bajos, pero que a valores de  $a_w$  altos la adsorción de agua es acompañada por hinchamiento y cambios conformacionales en la estructura molecular de los polvos secos (Bertuzzi y col., 2003).



(a)



(b)

Fig. 6.5. Morfología de las microcápsulas M<sub>35%,3.9</sub> a: **(a)**  $a_w = 0.0$ ; **(b)**  $a_w = 0.515$ .

Las microcápsulas almacenadas a  $a_w$  de 0.742 y 0.821 adsorbieron una gran cantidad de vapor de agua que primero condujo a una pérdida total de la estructura debido a la

disolución de la pared, asociada a una dilución creciente de metales traza conforme el efecto de dilución excede el efecto viscoso (Leung, 1987), dando como resultado una baja cinética de degradación, y luego a la formación de una nueva estructura compacta tipo gel en la cual los carotenoides fueron probablemente reincorporados en la matriz polimérica (Fig. 6.7). Von Elbe (1987) señaló el papel protector que juega la  $a_w$  en la estabilidad de los pigmentos carotenoides, y en donde el agua afecta directamente los radicales libres producidos durante la oxidación de los pigmentos. El contenido de radicales libres puede ser disminuido por interacciones con el agua y la intensidad del efecto global es una función del material de pared conteniendo los carotenoides. Sin embargo, una vez que la estructura es destruida, el manejo adecuado de los productos es imposible. Los cambios morfológicos observados fueron establecidos lentamente, tomando varios días y fueron irreversibles. A mayores  $a_w$  los cambios morfológicos más rápido tomaron lugar.

#### **6.8. Comportamiento de redispersión de las microcápsulas M<sub>35%, 3.9</sub> como una función de la $a_w$ .**

El comportamiento de redispersión de las microcápsulas a partir de la formulación M<sub>35%,3.9</sub> como una función de la actividad de agua es mostrada en la Fig. 6.8. Es obvio que la pérdida de la estructura inicial a actividades de agua intermedias y formación de estructuras fusionadas a altas actividades de agua requirieron mayores tiempos para lograr la redispersión, probablemente debido a la cada vez menor área de contacto presentada por los polvos al agua y a el mayor grado de compactación de la superficie que inhibió la penetración de agua.

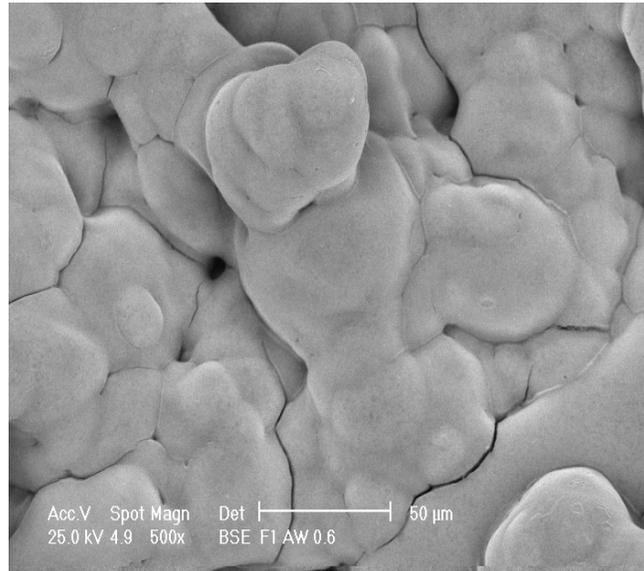
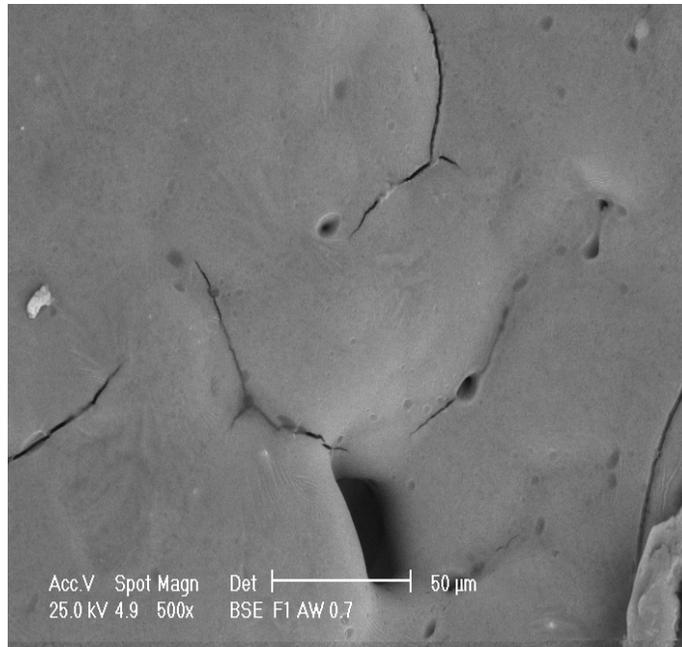
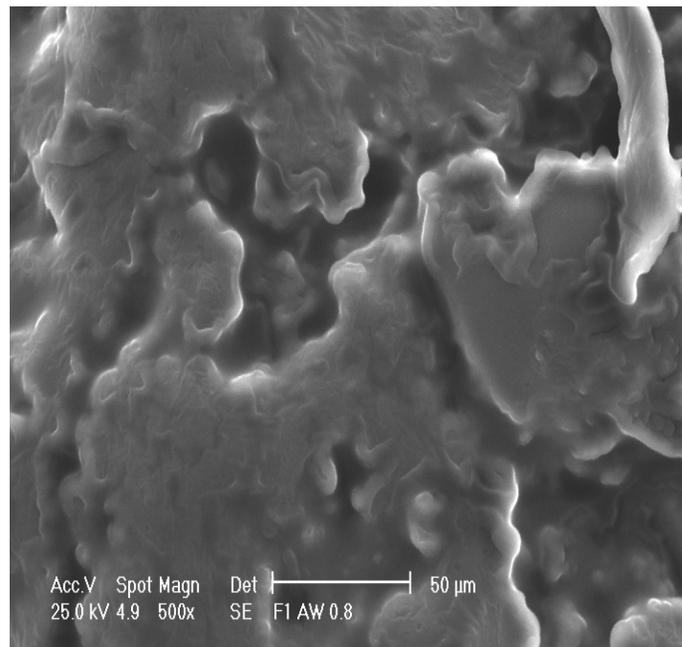


Fig. 6.6. Morfología de las microcápsulas M<sub>35%,3.9</sub> a  $a_w$  of 0.628.



(a)



(b)

Fig. 6.7. Morfología de las microcápsulas M<sub>35%,3.9</sub> a: **(a)**  $a_w = 0.742$  y **(b)**  $a_w = 0.821$ .

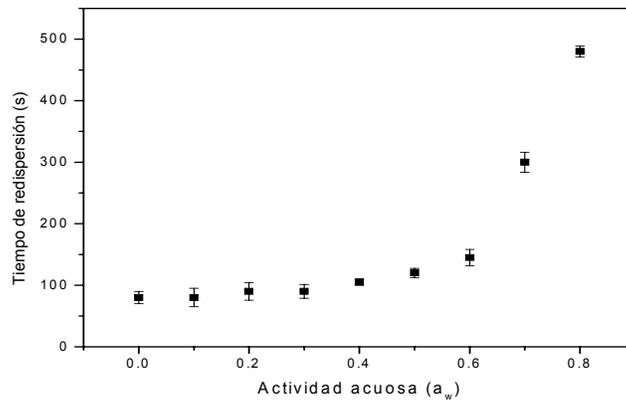


Fig. 6.8. Tiempos de re-dispersión de las microcápsulas  $M_{35\%,3.9}$  como una función de la actividad de agua.



Fig. 6.9. Emulsión múltiple  $W_1/O/W_2$  a partir de las microcápsulas  $M_{35\%,3.9}$  almacenadas a una  $a_w$  de 0.628 y redispersadas

No obstante, todos los polvos independientemente de la  $a_w$  a la cual fueron almacenados produjeron emulsiones múltiples  $W_1/O/W_2$  cuando fueron redispersadas en agua como se muestra en la Fig. 6.9 para la formulación  $M_{35\%,3.9}$  a  $a_w$  de 0.628. Este hecho indica que las emulsiones múltiples  $W_1/O/W_2$  fueron altamente estables incluso después de ser obtenidas por redispersión de las microcápsulas que habían sufrido extensa modificación de la estructura durante el almacenamiento (anexo H).

## *7. CONCLUSIONES*

## CONCLUSIONES

La formulación de las emulsiones múltiples  $W_1/O/W_2$  es de suma importancia pues influye en la determinación de la morfología, la eficiencia de microencapsulación, la retención de los carotenoides totales y la cinética de degradación de los mismos en las microcápsulas.

Las microcápsulas obtenidas por secado por aspersión de las emulsiones múltiples  $W_1/O/W_2$  con alto contenido de sólidos mostraron la mejor morfología, mayor eficiencia de microencapsulación y mayor retención de carotenoides totales.

Una alta relación de la mezcla de los biopolímeros a emulsión primaria, también produjo alta eficiencia de microencapsulación.

La cinética de degradación de los carotenoides totales fue menor y la vida media de los carotenoides mayor cuando las microcápsulas fueron obtenidas a partir de las emulsiones múltiples con el menor contenido de sólidos y con la menor relación de la mezcla de biopolímeros a emulsión primaria.

La actividad de agua potencialmente impacta la morfología de las microcápsulas y la estabilidad de los carotenoides encapsulados.

Los resultados de este estudio indican que la morfología de las microcápsulas fue fuertemente afectada por la actividad de agua en el rango de 0 a 0.436 y que el hinchamiento y eventual colapso de la estructura ocurrió en el rango de actividad de agua de 0.515 a 0.821.

La cinética de degradación de los carotenoides fue similar en el rango de actividad de agua de 0.742 a 0.821, pero exhibió un máximo a una actividad de agua de 0.628.

El tiempo de redispersión de las microcápsulas fue afectado por la actividad de agua en microcápsulas almacenadas a actividades de agua mayores que 0.515, requiriendo tiempos exponenciales para lograr la disolución.

## 8. RECONOCIMIENTOS

Esta investigación ha sido llevada a cabo con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del convenio G-33565-B.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

## BIBLIOGRAFÍA

- Abraham K, Muller C, Gruters A, Wahn U, Schweigert FJ. 2003. Minimal inflammation, acute phase response and avoidance of misclassification of vitamin A and iron status in infants - Importance of a high-sensitivity C-reactive protein (CRP) assay. *Int J Vitamin Nut Res* 73: 423-430.
- Agriculture and Agri-Food Canada (2004). Production of a natural food colorant. Food Research and Development Centre Techno-Series T2000-10. Accedido el 12/01/2005.  
[http://sci.agr.ca/crda/tech/index\\_e.htm#techno-series](http://sci.agr.ca/crda/tech/index_e.htm#techno-series).
- Arredondo-Figueroa JL, Pedroza-Islas R, Ponce –Palafox JT, Vernon-Carter EJ. 2003. Pigmentation of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931) with esterified and saponified carotenoids from red chili (*Capsicum annuum*) in comparison to astaxanthin. *Rev Mex Ing Quím* 2(2): 101-108.
- Badui-Dergal,S. 1999. Química de los Alimentos. Longman de México Editores, S.A de C.V. México.
- Báez-González JG, Pérez-Alonso C, Beristain CI, Vernon-Carter EJ, Vizcarra-Mendoza MG. 2004. Effective moisture diffusivity in biopolymer drops by regular regime theory. *Food Hydrocoll* 18: 325-333.
- Bauernfeind JC, Smith EG, Bunnell RH. 1958, Coloring fat-base foods with  $\beta$ -carotene. *Food Technol* 12(10): 527- 537.
- Beatus Y, Raziell A, Rosenberg M, Kopelman I J. 1985. Spray-drying microencapsulation of paprika oleoresin. *Lebens Wiss u Technol* 18(1): 28-34.
- Beristain CI, García HS, Vernon-Carter EJ. 1999. Mesquite gum (*Prosopis juliflora*) and maltodextrin blend as wall material for spray-dried encapsulated orange peel oil. *Fd Sci Technol Intern* 5(4): 353-356.
- Beristain CI, Azuara E, Vernon-Carter EJ. 2002. Effect of water activity on the stability to oxidation of spray-dried encapsulated orange peel oil using mesquite gum (*Prosopis juliflora*) as wall material. *J Food Sci* 67: 206-211.
- Bertuzzi MA, Armada M, Gottifredi JC. 2003. Thermodynamic analysis of water vapour sorption of edible starch based films. *Food Sci Tech Int* 9(2): 115-17. 44(6): 388-393.
- Brazel CS. 1999. Microencapsulation: Offering solutions for the food industry. *Cereals Fd World*
- Britton G. 1995. UV/Vis spectroscopy. En: Britton G, Liassen-Jensen S, Pfander H, editors.

- Carotenoids. Vol.1B: Spectroscopy. Basel: Birkhäuser Verlag. 355 p.
- Britton G. 1996. Carotenoids. En: Hendry GAF, Houghton JD, editors. Natural food colorants. London: Blackie Academic & Professional. p 109-243.
- Chen CW, Shu CK, Ho CT. 1996. Photosensitized oxidative reaction of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone. J Agric Food Chem 44: 2361-2365.
- Chuy LE, Labuza TP. 1994. Caking and stickiness of dairy-based food powders as related to glass transition. J Food Sci 59: 43-46.
- Connolly S, Fenyó JC, Vanvelde MC. 1988. Heterogeneity and homogeneity of an arabinogalactan-protein: *Acacia senegal* gum. Food hydrocoll 1: 47-53.
- Deasy P. 1983. Microencapsulation and related drug process. Nueva York: Marcel Dekker Inc. p. 21-59.
- Delgado-Vargas F, Jiménez AR, Paredes-López O. 2000. Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains- characteristics, biosynthesis, processing, and stability. Crit Rev Fd Sci Nut 40: 173-289.
- Delgado-Vargas F, Paredes-López O. 2003. Natural colorants for foods and nutraceutical uses. Boca Raton, FL: CRC Press. 327 p.
- Desobry SA, Netto FM, Labuza TP. 1997. Comparison of spray-drying, drum drying and freeze-drying for  $\beta$ -carotene encapsulation and preservation. J Food Sci 62: 1158-1162.
- Desobry SA, Netto FM, Labuza TP. 1999. Influence of maltodextrin systems at an equivalent 25DE on encapsulated  $\beta$ -carotene during storage. J Food Proc Preserv 23: 39-55.
- Dickinson E. 1992. An introduction to food colloids. Oxford: University Press. 207 p.
- Dickinson E, McClements DJ. 1996. Advances in food colloids. Londres: Blackie Academic & Professional. 333 p.
- Dickinson E. 2003. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. Food Hydrocoll 17: 25-39.
- Espinoza-Herrera N. 2002. Elaboración y caracterización de microcápsulas de pared compuesta (proteína-polisacárido) como alimento para acuicultura. Tesis de Maestría. Universidad Iberoamericana. México.
- Garti N. 1997. Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food Applications. Lebensm Wiss u Technol 30: 222-235.

- Garti N, Reichman D. 1993. Hydrocolloids as food emulsifiers and stabilizers. *Food Struct.* 12: 411-426.
- Giese J. 1993. Packaging, storage, and delivery of ingredients. *Food Technol* 47(8): 54-63.
- 1996.
- Giovannucci E. 1999. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: Review of the epidemiological literature. *J Nat Cancer Inst* 91: 317-31.
- Haila KM, Lievonen SM, Heinonen MI. 1996. Effects of lutein, lycopene, annatto, and gamma-tocopherol on autoxidation of triglycerides. *J Agric Food Chem* 44: 2096-2100.
- Kläui H, Bauernfeind JC. 1981. Carotenoids as food colors. En: Bauernfeind JC, editor. *Carotenoids as colorants and vitamin A precursors. Technological and nutritional applications.* New York: Academic Press. p 48-317.
- Labuza TP. 1975. Oxidative changes in foods at low and intermediate moisture levels. En: Duckworth R.B., editor. *Londres: Academic Press.* 340 p.
- Leung H. 1987. Influence of water activity on chemical reactivity. En: Rockland LB, Beuchat LR., editores. *Water activity: Theory and applications to food.* IFT Basic Symposium Series. Nueva York: Marcel Dekker Inc. p 27-54.
- Levenspiel O. *Chemical reaction engineering.* Nueva York: John Wiley & Sons, Inc. 578 p.
- Matsumara Y, Satake C, Egami M, Mori T. 2000. Interaction of gum arabic, maltodextrin and pullulan with lipids in emulsions. *Biosci Botechnol Biochem* 64: 1827-1835.
- McNamee BF, O'Riordan ED, O'Sullivan M. 1998. Emulsification and microencapsulation properties of gum arabic. *J Agric Food Chem* 46(11): 4551-6.
- Minemoto Y, Adachi S, Matsuno R. 1997. Comparison of oxidation of methyl linoleate encapsulated with gum arabic by hot-air-drying and freeze-drying. *J Agric Food Chem* 45: 4530-34.
- Nishino H, Tokuda H, Satomi Y, Masuda M, Bu P, Onozuka M, Yamaguchi S, Okuda Y, Takayasu J, Tsuruta J, Okuda M, Ichiisi E, Murakoshi M, Kato T, Misawa N, Narisawa T, Takasuka N, Yano M. 1999. Cancer prevention by carotenoids. *Pure Appl Chem* 71: 2273-78.
- Orozco-Villafuerte J, Cruz-Sosa F, Ponce-Alquicira E, Vernon-Carter EJ. 2003. Mesquite gum: fractionation and characterization of the gum exuded from *Prosopis laevigata* obtained from plant tissue culture and from wild trees. *Carbohydr. Polym.* 54: 327-333.

- Park SJ, Shin YS, Lee JR. 2001. Preparation and characterization of microcapsules containing lemon oil. *J Coll Int Sci* 241: 502-508.
- Pedroza-Islas R, Vernon-Carter EJ, Durán-Domínguez C, Trejo S. 1999. Using biopolymer blends for shrimp feedstuff microencapsulation. I. Microcapsule particle size, morphology and microstructure. *Food Res Int* 32: 367-374.
- Pérez-Alonso C, Báez-González JG, Beristain CI, Vernon-Carter EJ, Vizcarra-Mendoza MG. 2003. Estimation of the activation energy of carbohydrate polymers blends as selection criteria for their use as wall material for spray-dried microcapsules. *Carbohydr Polym* 53:197-203.
- Re MI. 1998. Encapsulation by spray drying. *Drying Technol* 16: 1195-236.
- Risch SJ. 1995. Encapsulation: overview of uses and techniques. Washington, D.C.: American Chemical Society S.S. 590. p 2-7.
- Rockland LB, Nishi SK. 1980. Influence of water activity on food product quality and stability. *Food Technol* 34(4): 42-51, 59.
- Shahidi F, Han X. 1993. Encapsulation of food ingredients *Crit Rev Fd Sci Nutr* 33(6): 501-547.
- Sies H. 1997. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82: 291-295.
- Sootittantawat A, Yoshii H, Furuta T, Ohkawara M, Linko P. 2003. Microencapsulation by spray drying: Influence of emulsion size on the retention of volatile compounds. *J Food Sci* 68: 2256-62.
- Tyssandier V, Choubert G, Grolier P, Borel P. 2002. Carotenoids, mostly the xanthophylls, exchange between plasma lipoproteins. *Int J Vitamin Nut Res* 72: 300-308.
- Verhey JGP. 1973. Vacuole formation in spray powder particles. 3. Atomization and droplet drying. *Neth Milk Dairy J* 27: 3-16.
- Vernon-Carter EJ, Gomez SA, Beristain CI, Mosqueira G, Pedroza-Islas R, Moreno-Terrazas RC. 1996. Color degradation and coalescence kinetics of aztec marigold oleoresin-in-water emulsions stabilized by mesquite or arabic gums and their blends. *J Texture Stud* 27: 625-41.
- Vernon-Carter EJ, Pedroza-Islas R, Beristain CI. 1998. Stability of *Capsicum annuum* oleoresin-in-water emulsions containing *Prosopis* and *Acacia* gums. *J Texture Stud* 29: 553-67.
- Vernon-Carter EJ, Beristain CI, Pedroza-Islas R. 2000. Mesquite gum (*Prosopis* gum). En: Doxastakis G,
- Vernon-Carter EJ, Ponce-Palafox JT, Arredondo-Figueroa JL, Pedroza-Islas R. 2001. Development

- of microcapsules containing water and lipid soluble natural colorants for trout pigmentation. *J Aquatic Food Product Technol* 10(2): 59-74.
- Kiosseoglou V. Editores. *Novel macromolecules in food systems..* Amsterdam: Elsevier. p 217-238.
- von Elbe JH. 1987. Influence of water activity on pigment stability in food products. En: Rockland LB, Beuchat LR. Editores. *Water activity: Theory and applications to food.* IFT Basic Symposium Series. Nueva York: Marcel Dekker Inc. p 55-73.
- Wagner LA, Warthesen JJ. 1995. Stability of spray-dried encapsulated carrot carotenes. *J Food Sci* 60: 1048-53.
- Walford G. 1984. *Developments in food colours-2.* London: Elsevier Applied Science Publishers. p 257.
- Williams PA, Phillips GO, Randall RC. 1990. Structure-function relationships of gum Arabic. En: Phillips GO, Williams PA, Wedlock DJ. Editores. *Gums and stabilisers for the food industry 5.* Oxford: IRL Press. p 25-36.
- Woodall AA, Britton G, Jackson MJ. 1997. Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: Relationship between carotenoid structure and protective ability. *Biochim Biophys Acta* 1336: 575-586.
- Young L, Sarda X, Rosenberg M. 1992. Microencapsulating properties of whey proteins. 2. Combination of Whey proteins with carbohydrates. *J Dairy Sci* 76: 2878-2885.

## *10. ANEXOS*

## ANEXO A

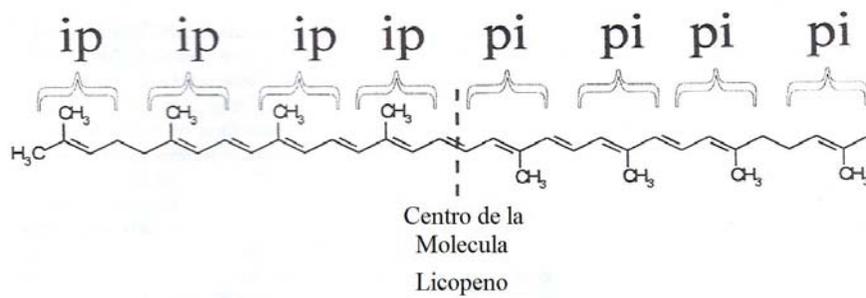
### Estructura química de los carotenoides más comunes

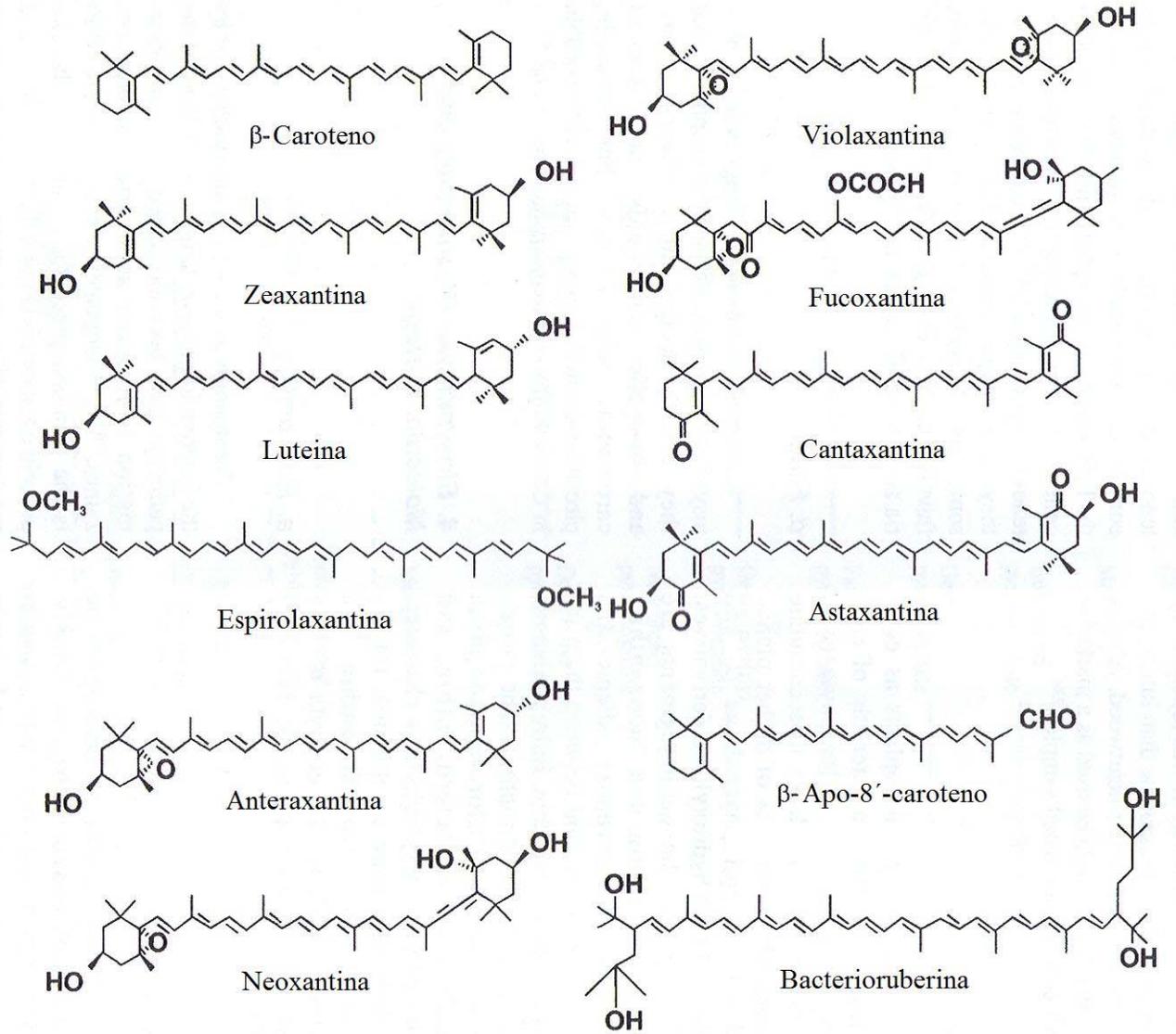


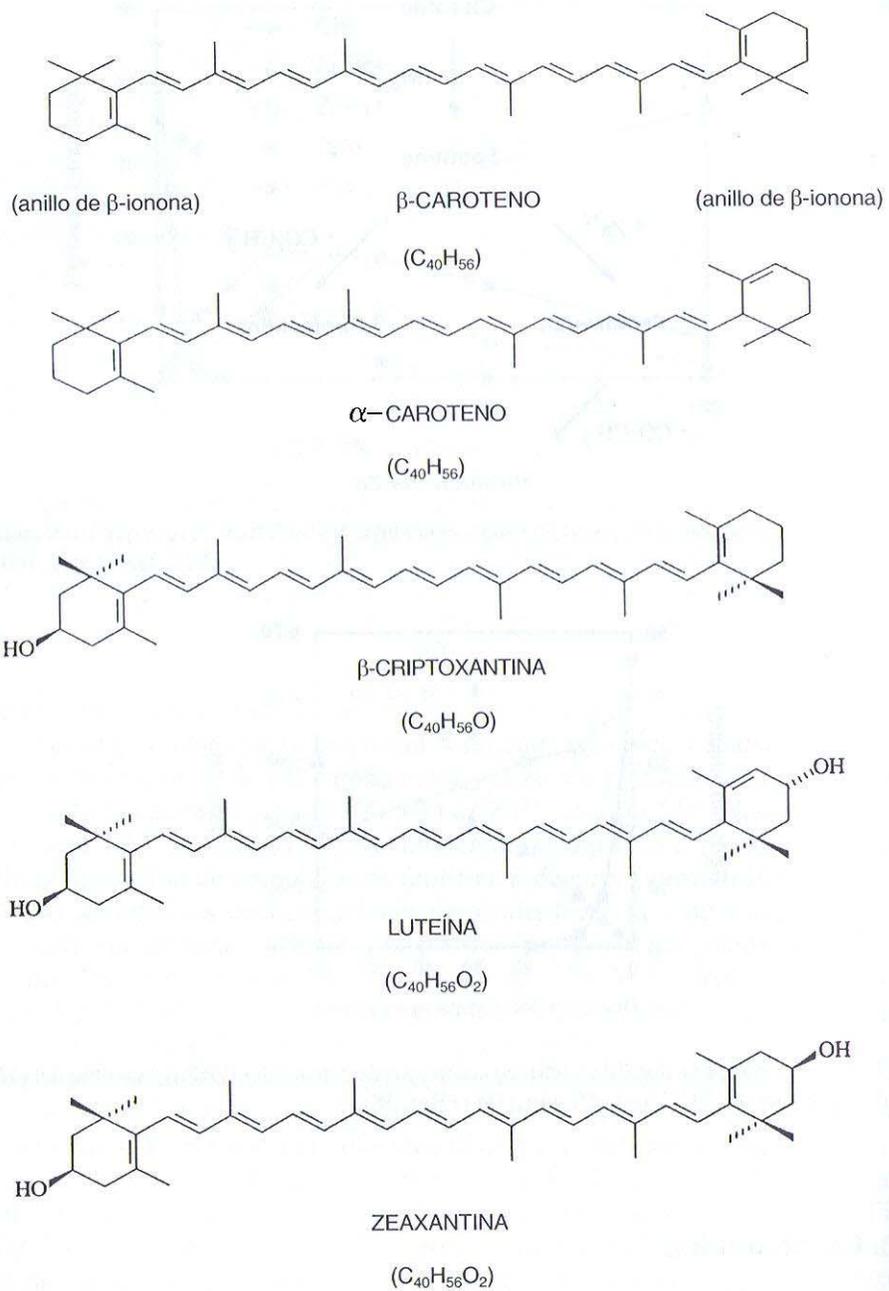
ip= grupo isopreno

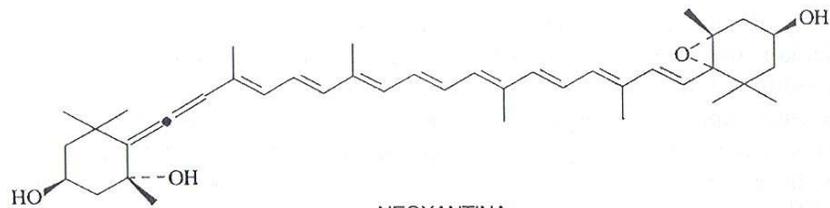


C<sub>40</sub> Carotenoides=8 unidades isopreno



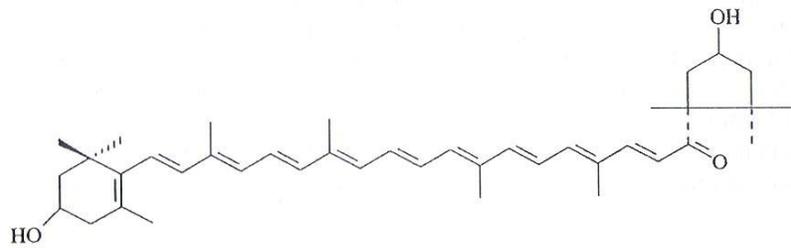






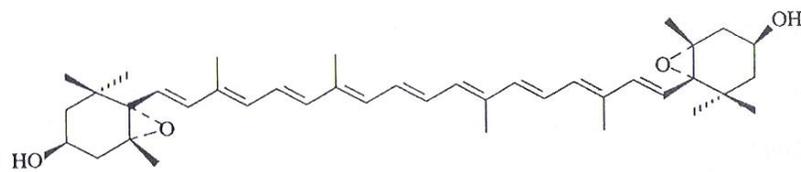
NEOXANTINA

(C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>O<sub>4</sub>)



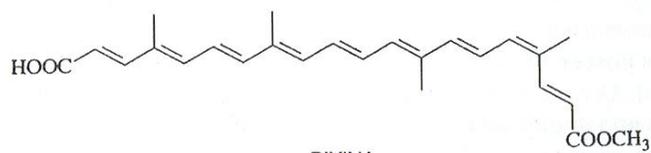
CAPSANTINA

(C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>O<sub>3</sub>)



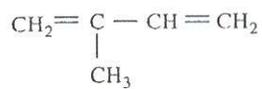
VIOLAXANTINA

(C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>O<sub>4</sub>)

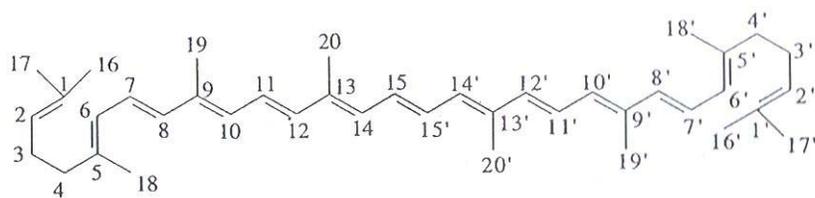
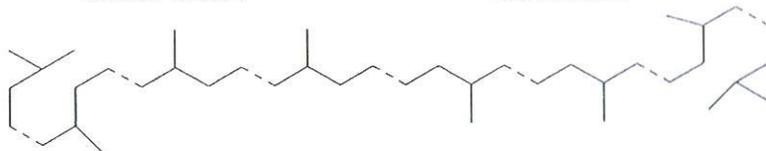
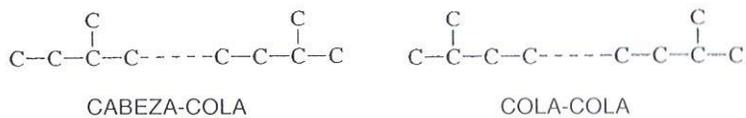


BIXINA

(C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>)



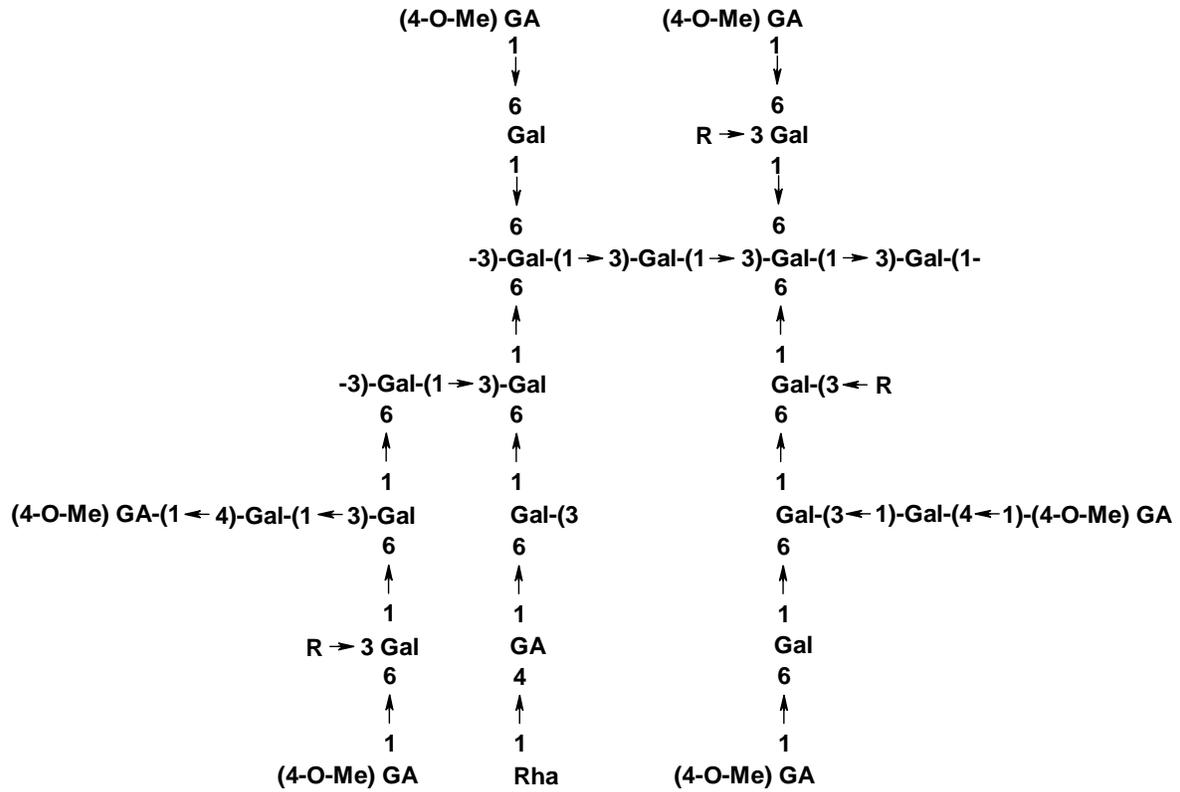
ISOPRENO



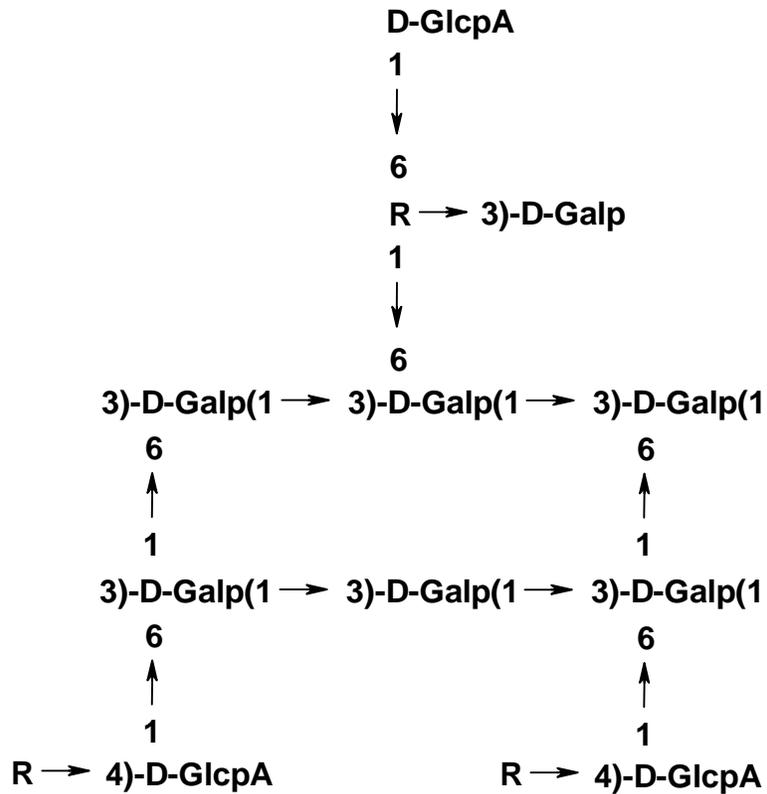
LICOPENO

## ANEXO B

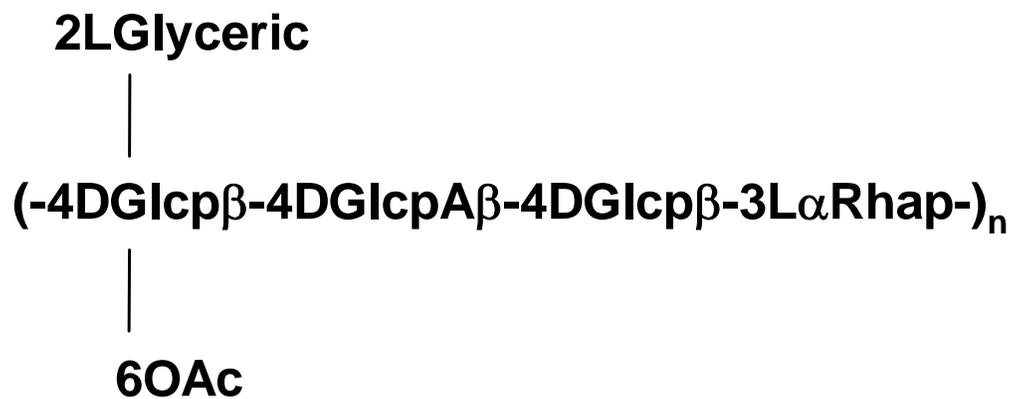
### Estructura química de las gomas: mezquite, arábica y gelana



**Representación esquemática de la estructura química de la goma de mezquite**



**Representación esquemática de la estructura química de la goma arábiga**



**Representación esquemática de la estructura química de la goma gelana**

## ANEXO C

### Cálculos de las distintas soluciones para la $a_w$

Para  $T = 35\text{ }^{\circ}\text{C} = 308.15\text{ K}$

PO<sub>5</sub>

$$a_w \approx 0$$

LiCl

$$\text{Ln}(a_w) = (500.95/T) - 3.85$$

$$\text{Ln}(a_w) = -2.2243$$

$$a_w = 0.10813$$

KC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

$$\text{Ln}(a_w) = (861.39/T) - 4.33$$

$$\text{Ln}(a_w) = -0.5359$$

$$a_w = 0.2152$$

MgCl<sub>2</sub>

$$\text{Ln}(a_w) = (303.35/T) - 2.13$$

$$\text{Ln}(a_w) = -1.1455$$

$$a_w = 0.3180$$

K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

$$\text{Ln}(a_w) = (145.0/T) - 1.3$$

$$\text{Ln}(a_w) = -0.8294$$

$$a_w = 0.4362$$

Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

$$\text{Ln}(a_w) = (356.6/T) - 1.82$$

$$\text{Ln}(a_w) = -0.6627$$

$$a_w = 0.5154$$

NaNO<sub>2</sub>

$$\text{Ln}(a_w) = (435.96/T) - 1.88$$

$$\text{Ln}(a_w) = -0.4652$$

$$a_w = 0.6279$$

NaCl

$$\text{Ln}(a_w) = (228.92/T) - 1.04$$

$$\text{Ln}(a_w) = -0.2971$$

$$a_w = 0.7429$$

KCl

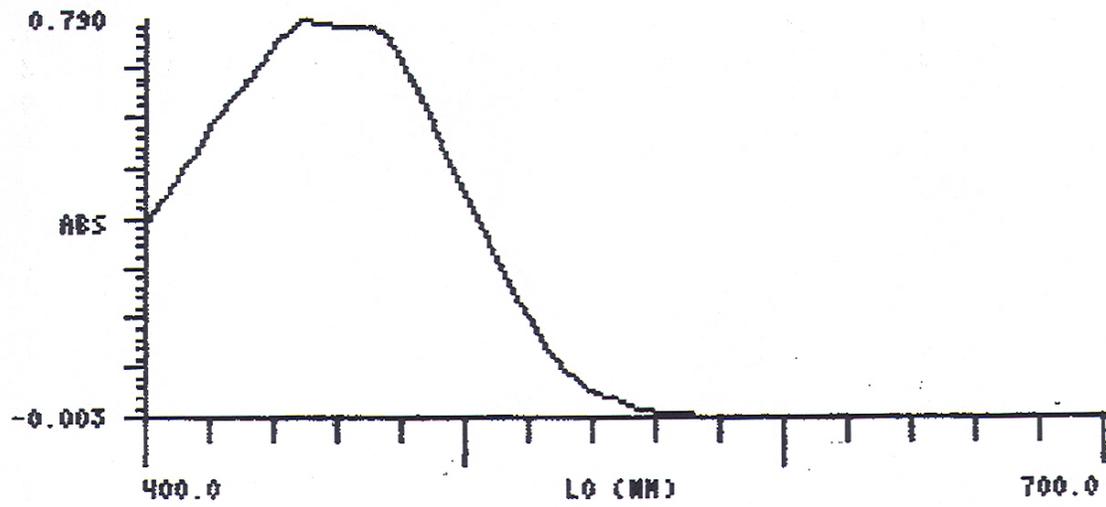
$$\text{Ln}(a_w) = (367.58/T) - 1.39$$

$$\text{Ln}(a_w) = -0.1971$$

$$a_w = 0.8210$$

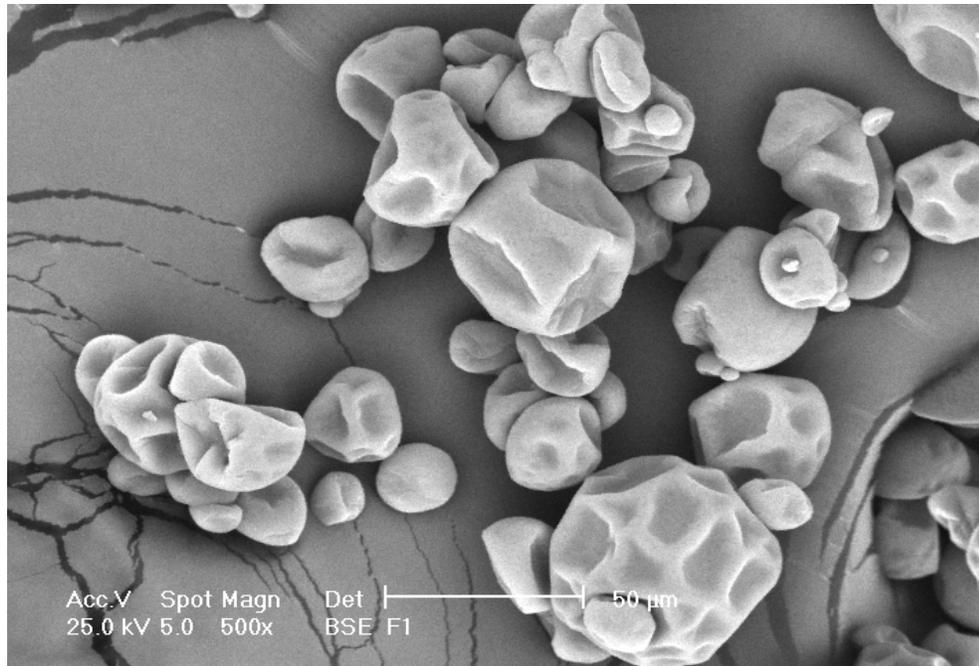
## ANEXO D

### Barrido espectral de una mezcla de carotenoides

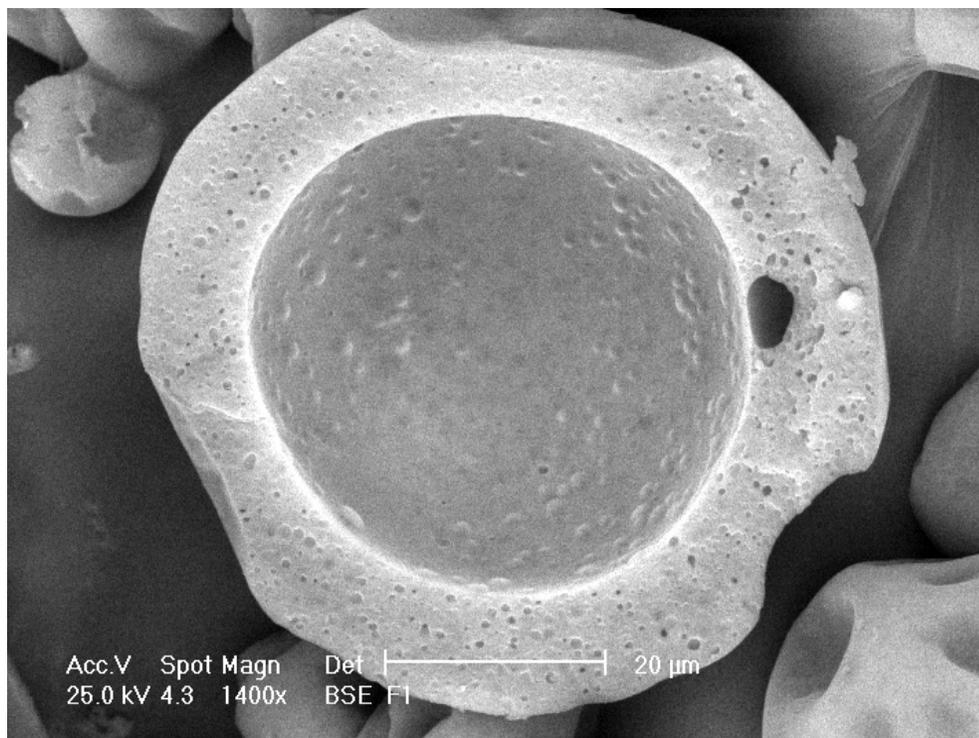


## ANEXO E

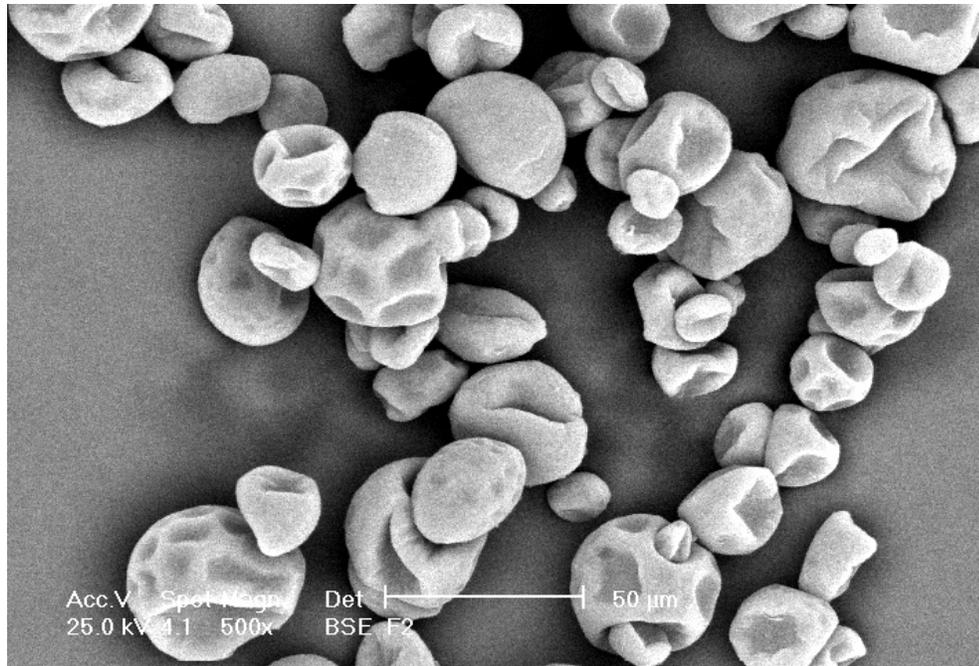
Micrografías de las microcápsulas  $M_{x,y}$  mostrando la  
microestructura interna y externa



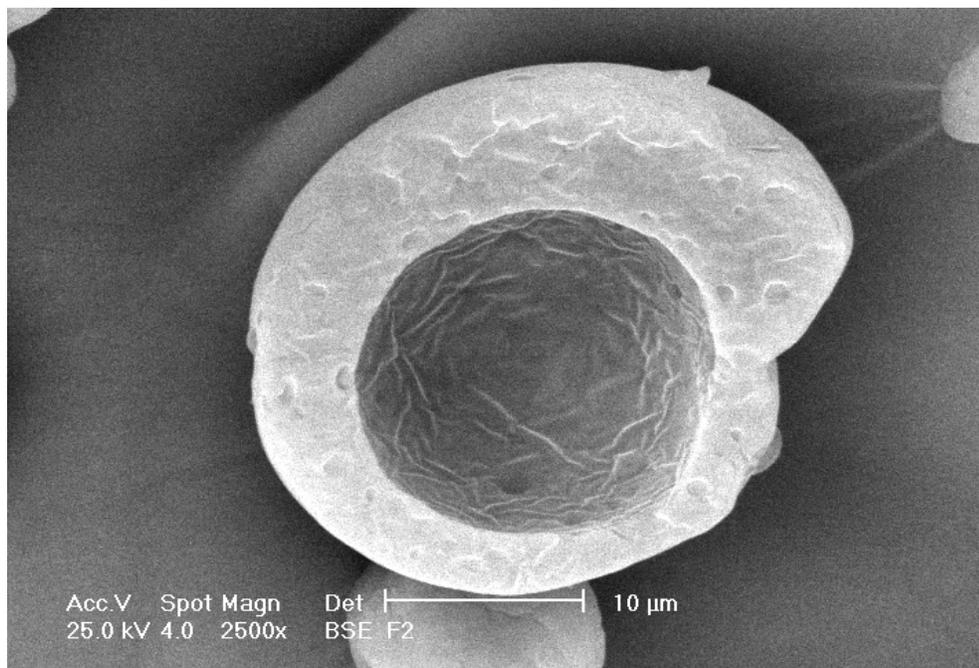
M<sub>35%, 3.9</sub>



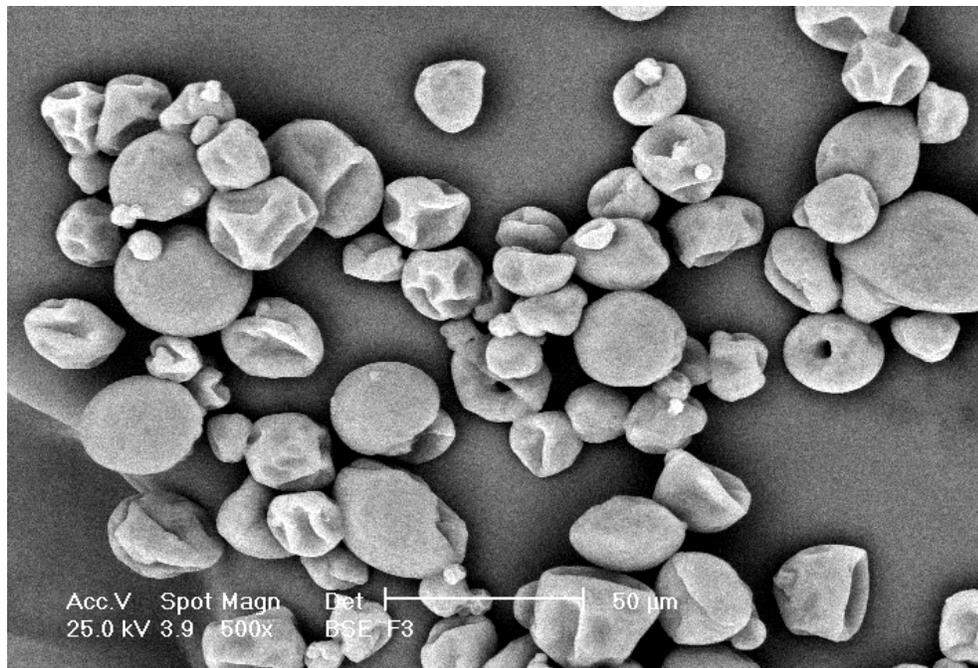
M<sub>35%, 3.9</sub>



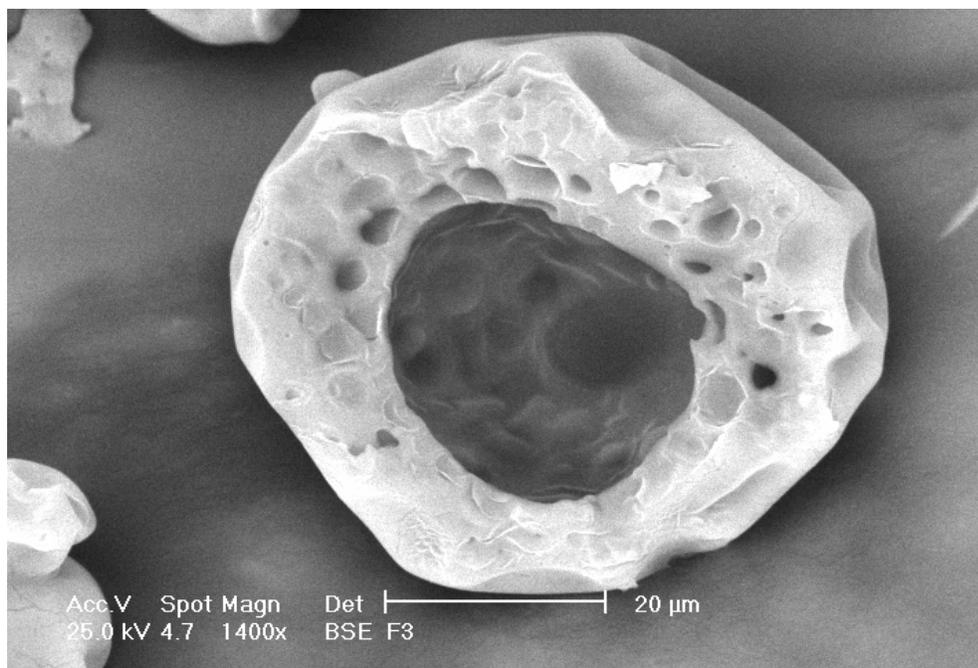
M<sub>25%</sub>, 3.9



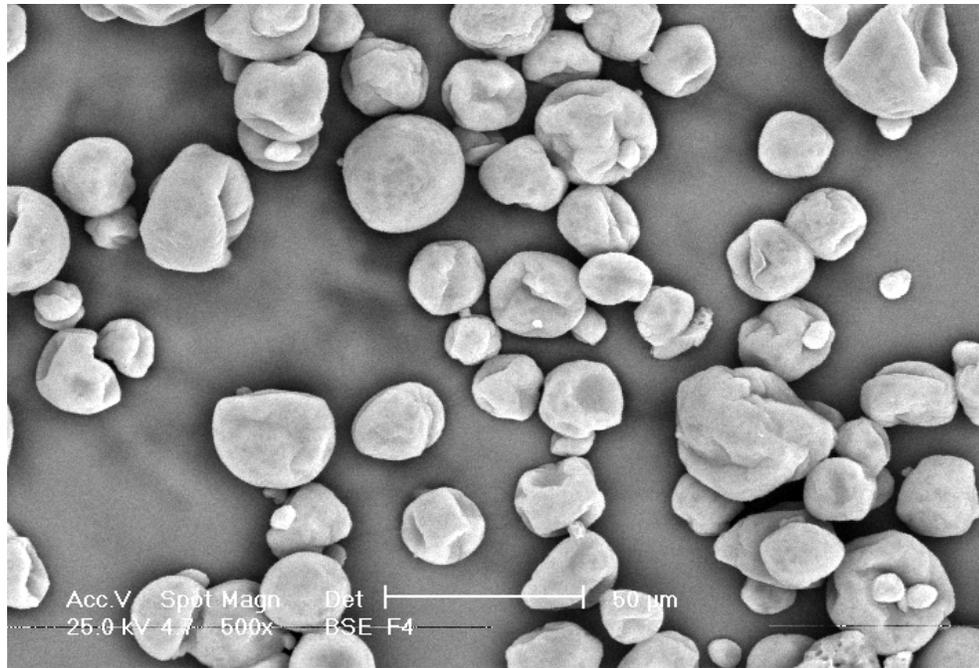
M<sub>25%</sub>, 3.9



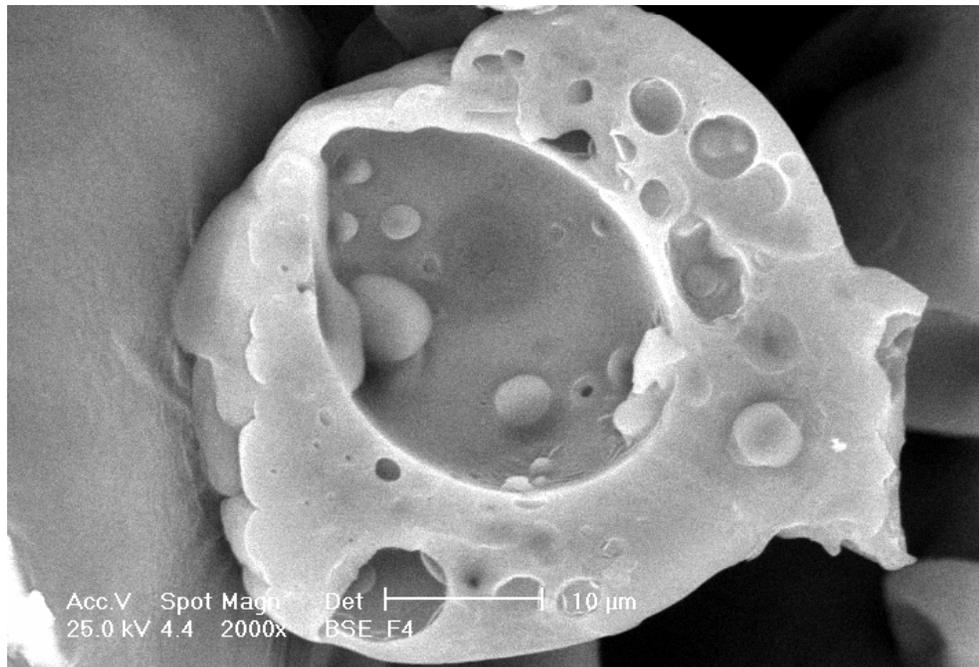
$M_{35\%, 2.6}$



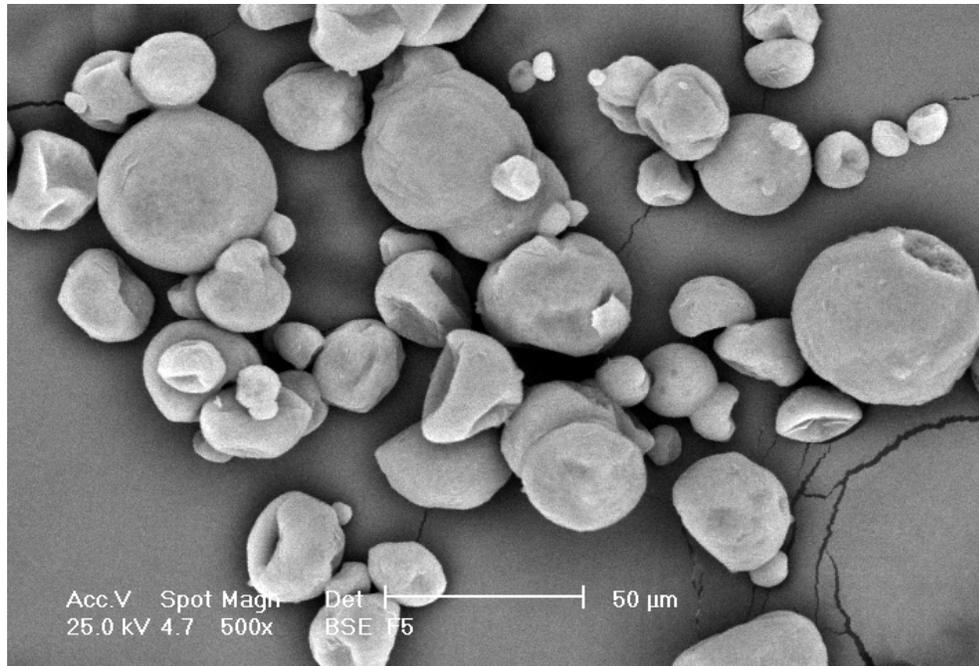
$M_{35\%, 2.6}$



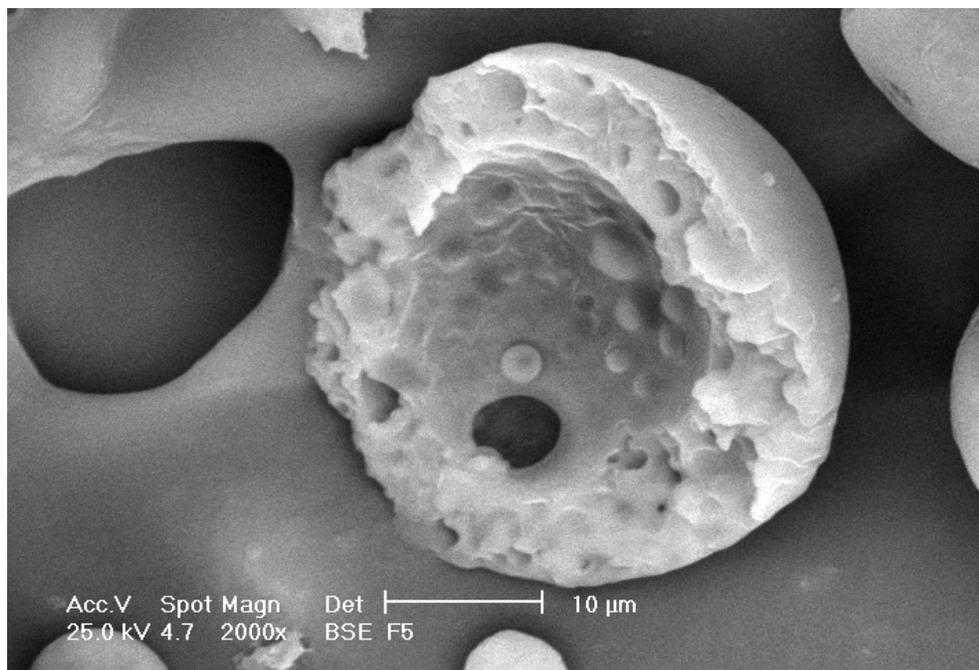
M<sub>25%, 2.6</sub>



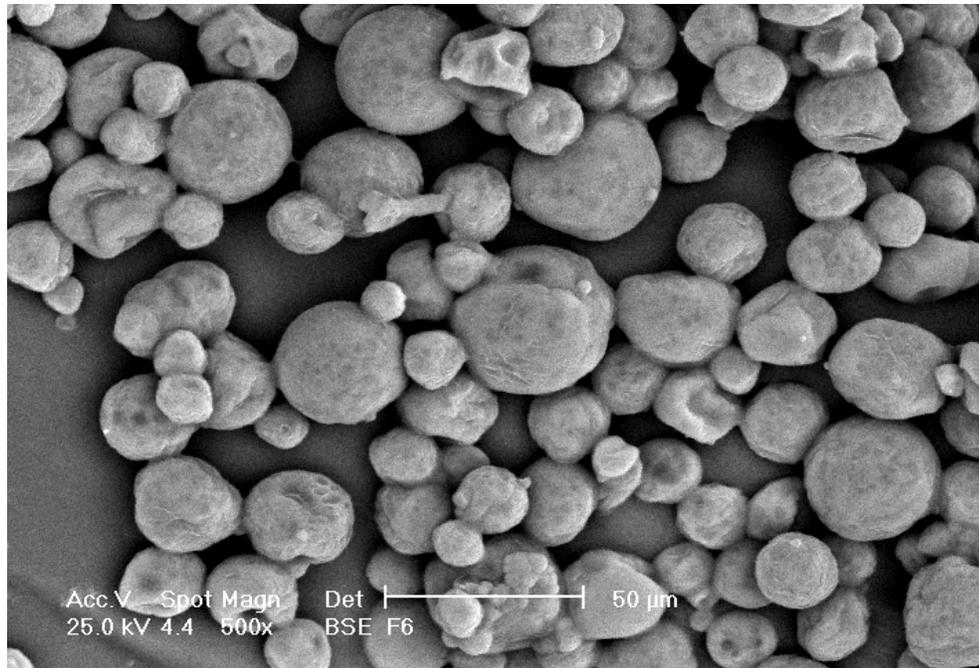
M<sub>25%, 2.6</sub>



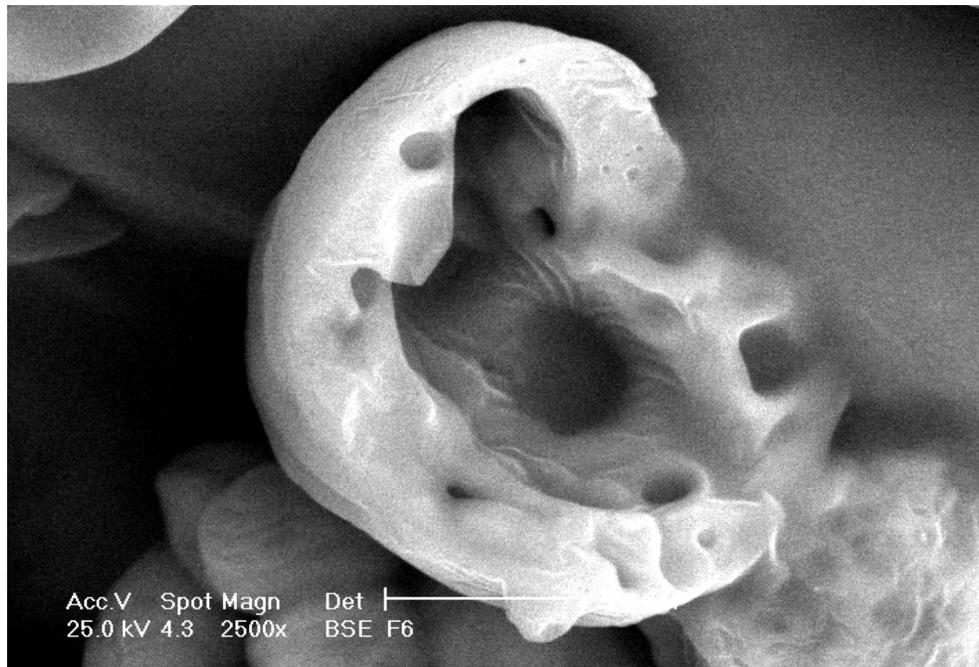
$M_{35\%, 1.4}$



$M_{35\%, 1.4}$



M<sub>25%, 1.4</sub>

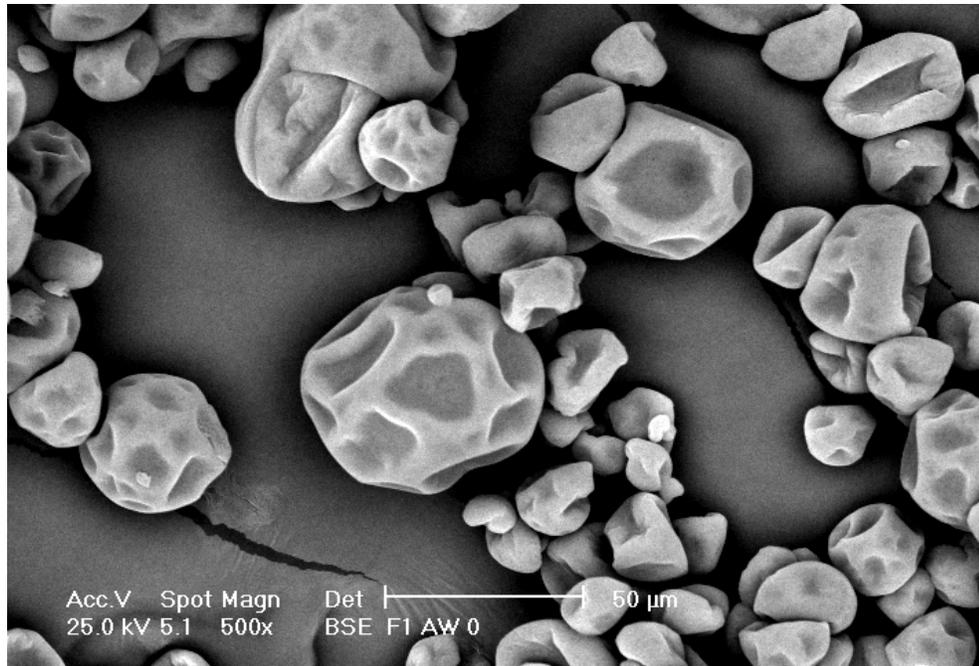


M<sub>25%, 1.4</sub>

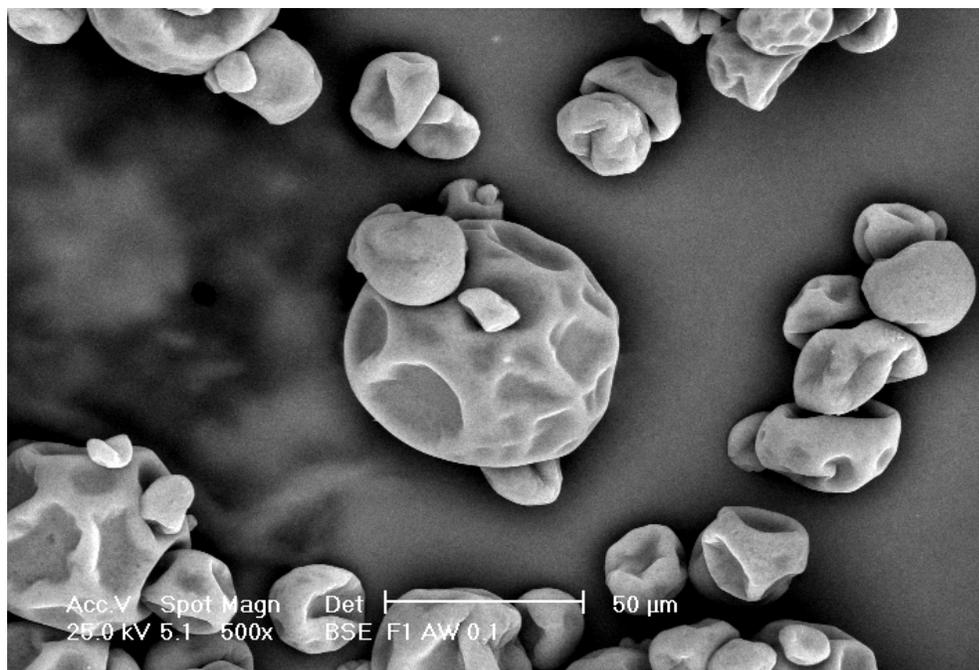
## ANEXO F

### Micrografías de las microcápsulas M<sub>35%</sub>, 3.9 a distintas

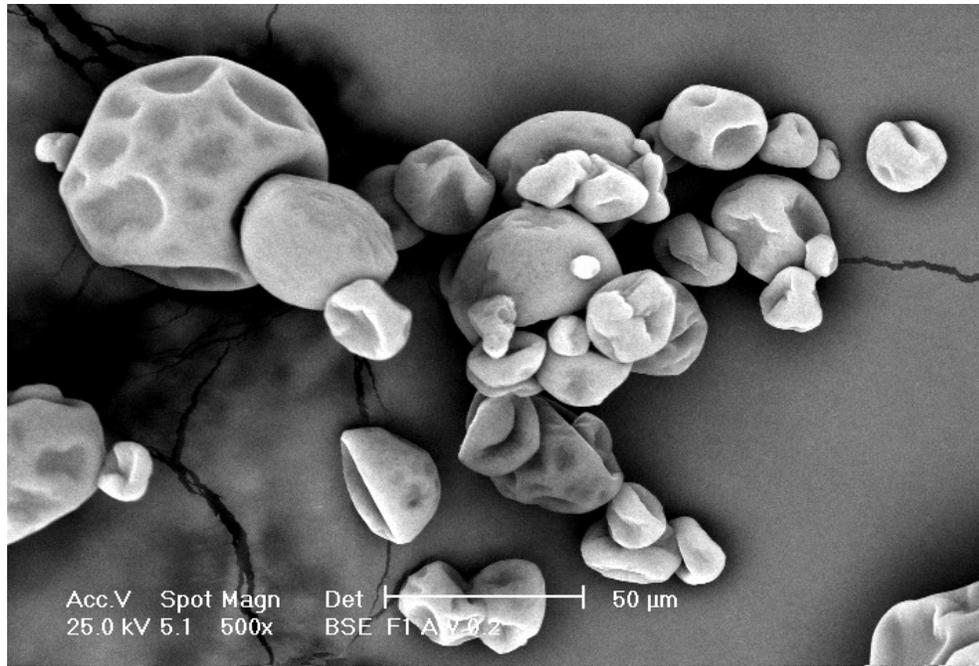
$a_w$



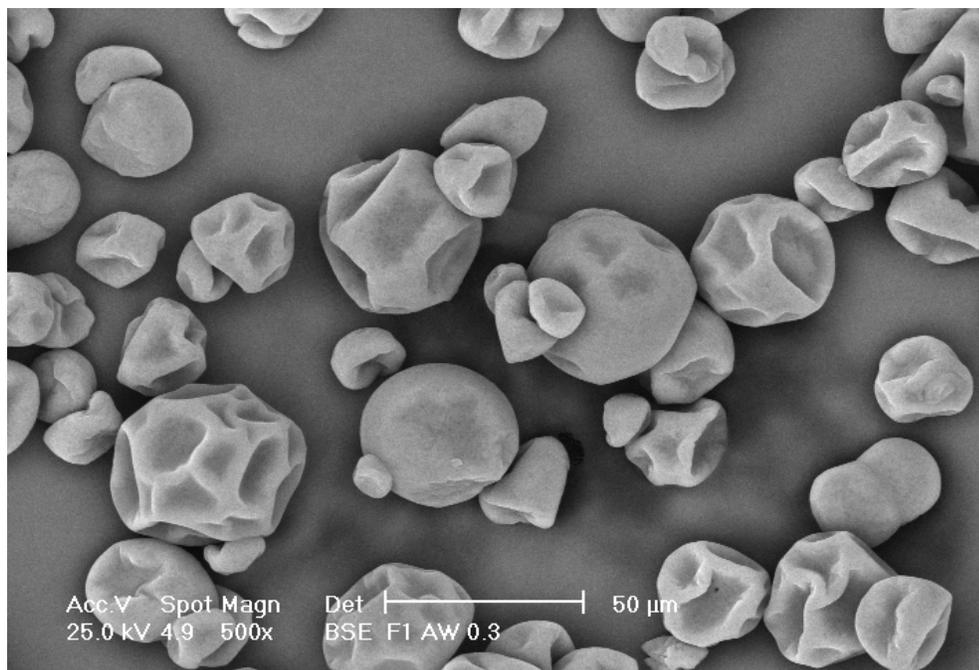
$M_{35\%, 3.9, a_w = 0.0}$



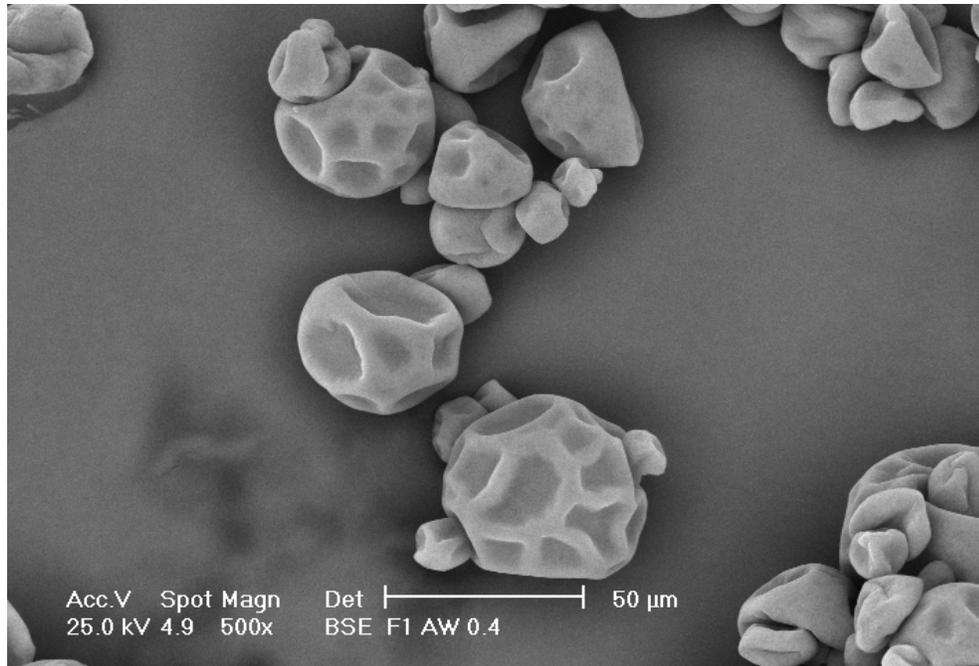
$M_{35\%, 3.9, a_w = 0.108}$



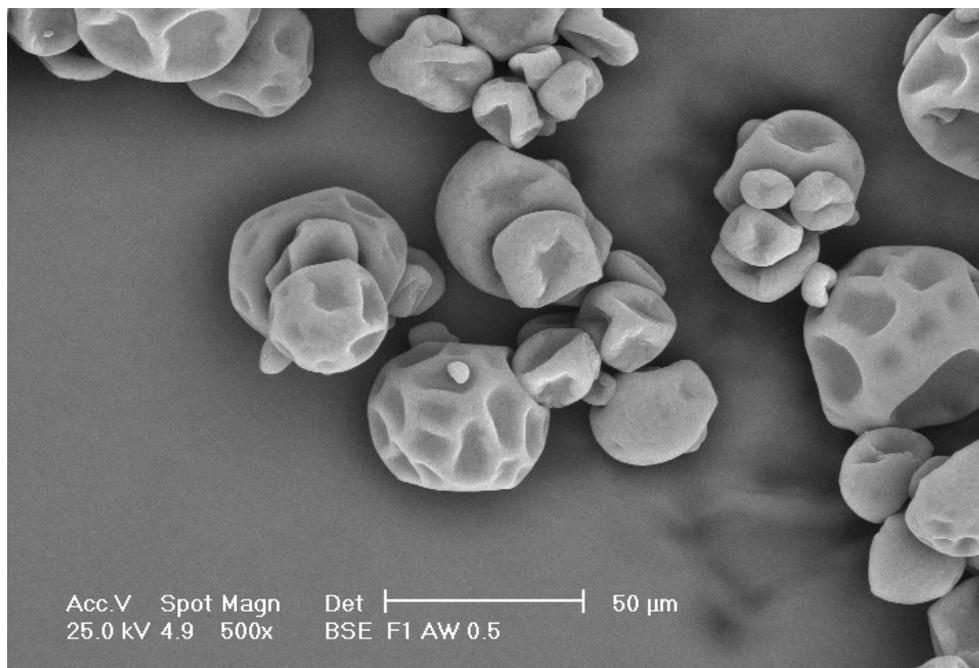
$M_{35\%, 3.9}, a_w = 0.215$



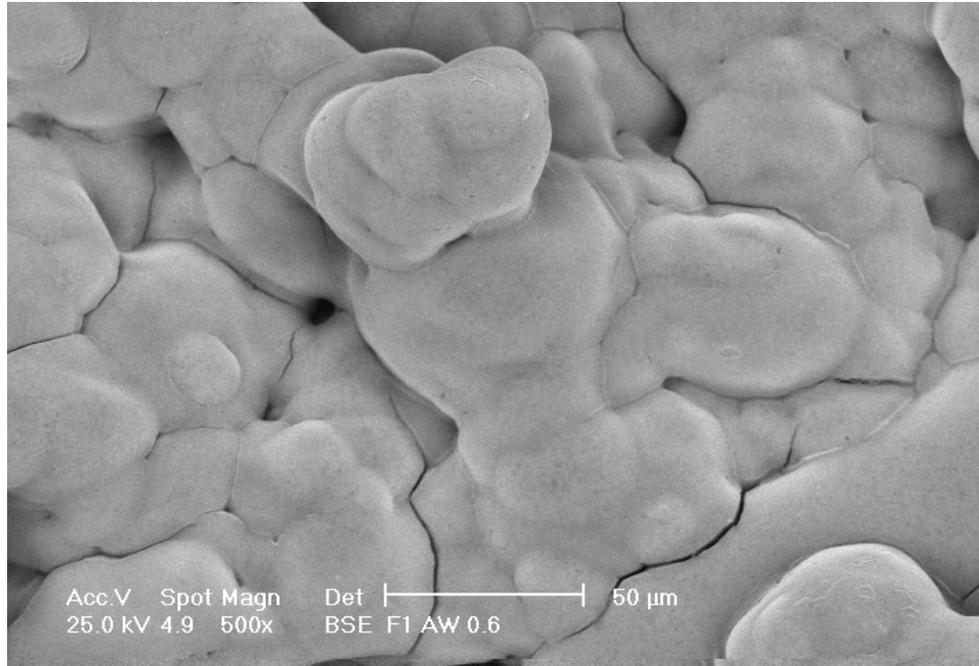
$M_{35\%, 3.9}, a_w = 0.318$



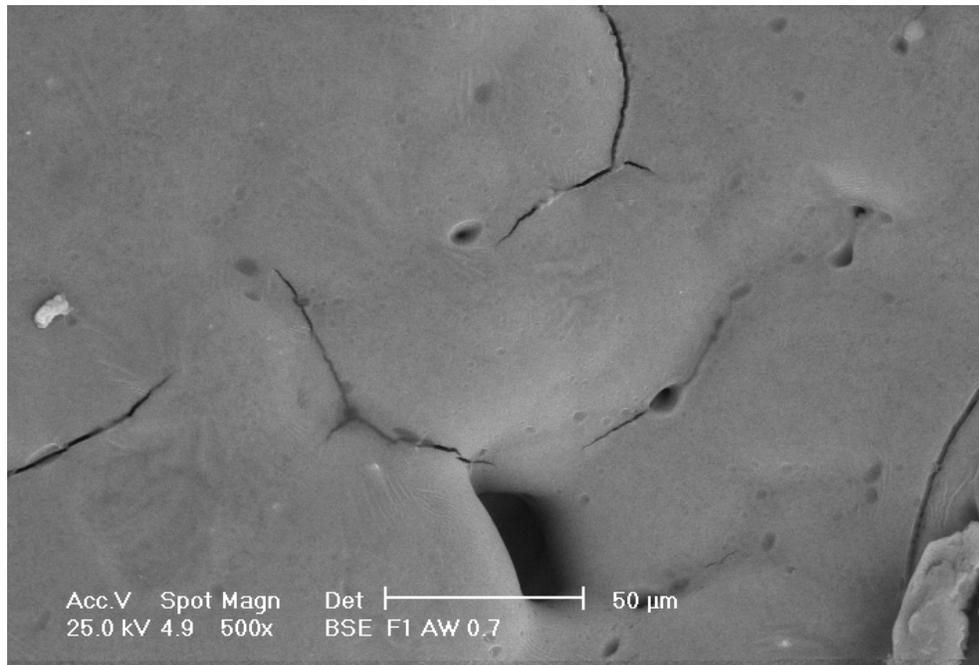
$M_{35\%, 3.9}, a_w = 0.436$



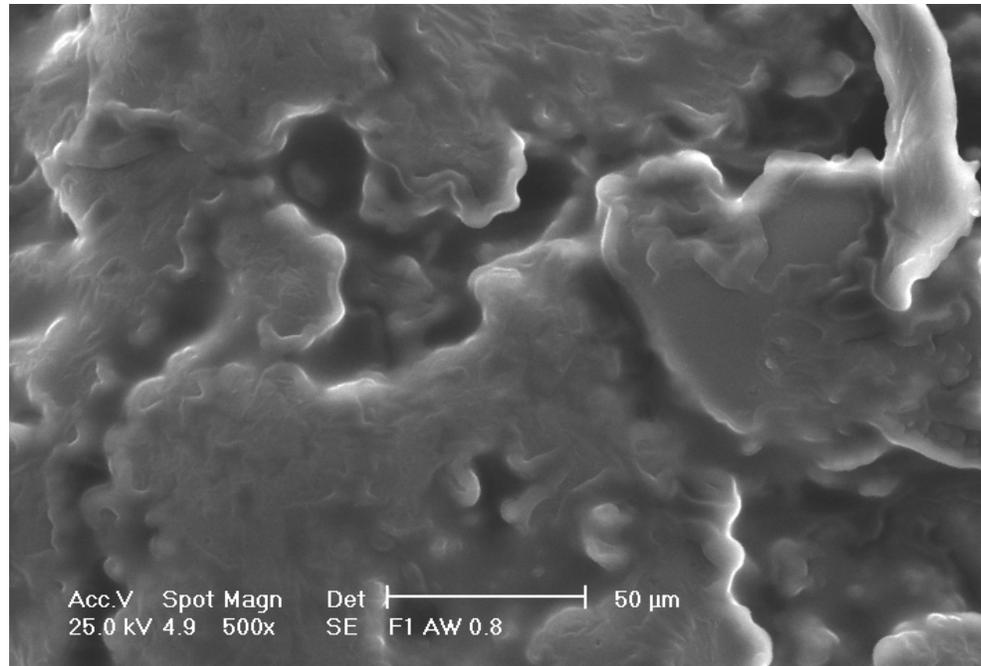
$M_{35\%, 3.9}, a_w = 0.515$



$M_{35\%, 3.9}, a_w = 0.628$



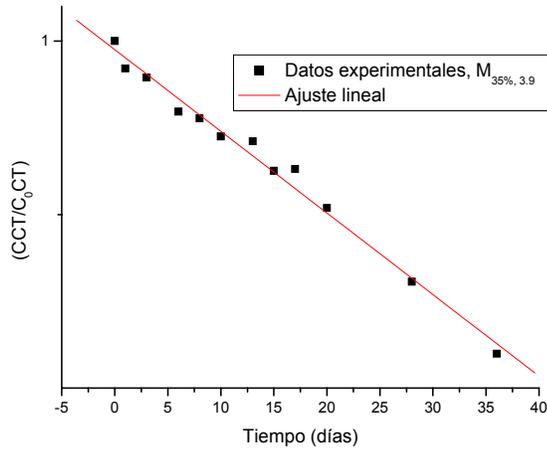
$M_{35\%, 3.9}, a_w = 0.742$



$M_{35\%, 3.9}, a_w = 0.821$

## ANEXO G

Determinación de los parámetros cinéticos de las microcápsulas  $M_{x,y}$ .



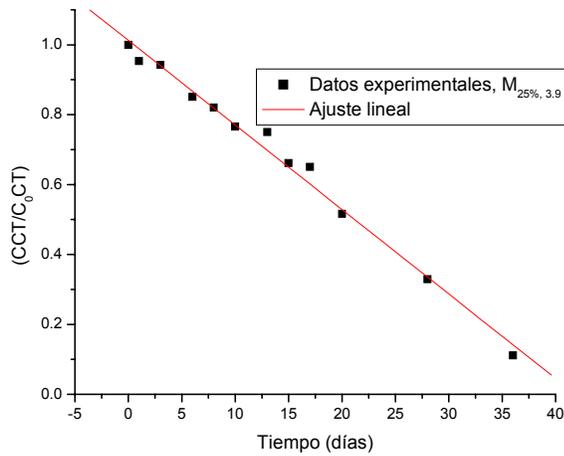
18/09/2003 16:43 "/Cart-total-normal/Graph7" (2452900)]

Linear Regression for Data2\_B:

$$Y = A + B * X$$

Parameter	Value	Error
A	0.97489	0.01412
B	-0.02358	4.209E-4

R	SD	N	P
-0.99364	0.03058	12	<0.0001



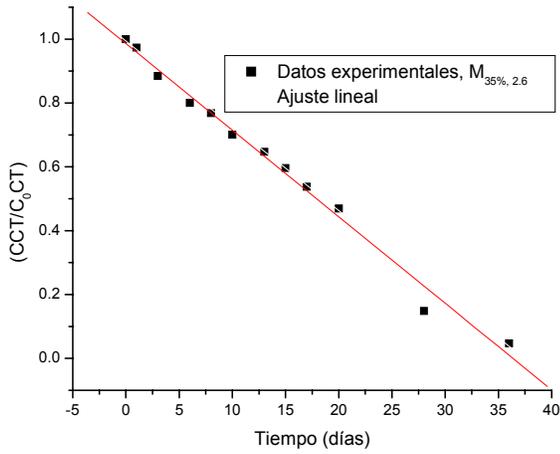
18/09/2003 16:57 "/Cart-total-normal/F2-ct" (2452900)]

Linear Regression for Data2\_C:

$$Y = A + B * X$$

Parameter	Value	Error
A	1.01239	0.0132
B	-0.02418	7.87368E-4

R	SD	N	P
-0.99474	0.02859	12	<0.0001



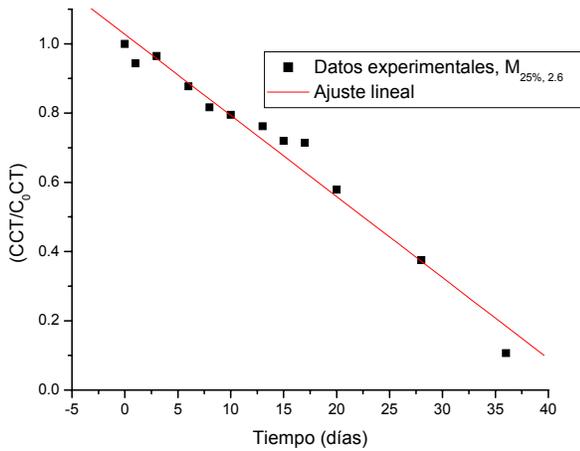
19/09/2003 12:03 "/Cart-total-normal/F3-ct" (2452901)

Linear Regression for Data2\_D:

$$Y = A + B * X$$

Parameter	Value	Error
A	0.98559	0.01485
B	-0.02711	8.85485E-4

R	SD	N	P
-0.99471	0.03216	12	<0.0001



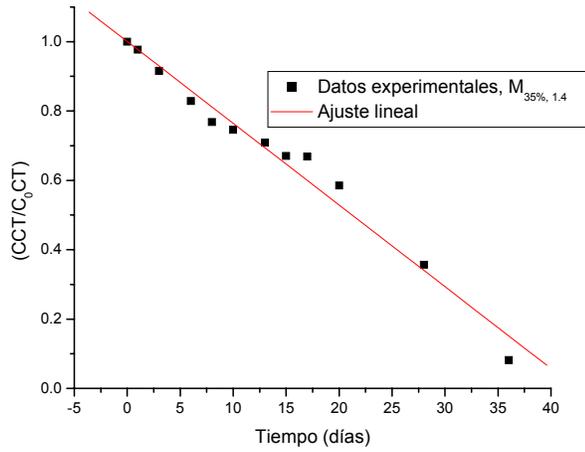
[18/09/2003 17:00 "/Cart-total-normal/F4-ct" (2452900)]

Linear Regression for Data2\_E:

$$Y = A + B * X$$

Parameter	Value	Error
A	1.02736	0.02171
B	-0.02342	0.0013

R	SD	N	P
-0.98505	0.04703	12	<0.0001



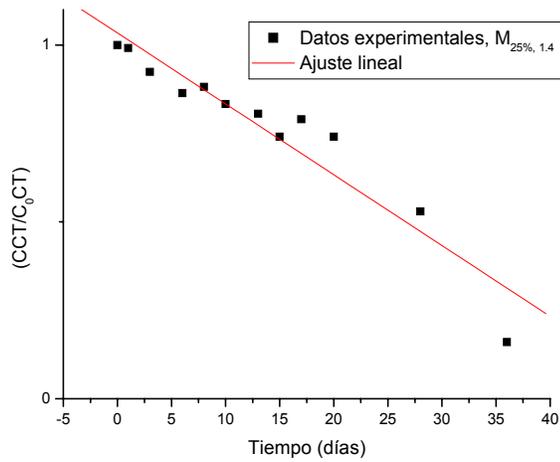
[18/09/2003 17:01 "/Cart-total-normal/F5-ct" (2452900)]

Linear Regression for Data2\_F:

$$Y = A + B * X$$

Parameter	Value	Error
A	1.0007	0.01911
B	-0.02358	0.00114

R	SD	N	P
-0.98852	0.0414	12	<0.0001



18/09/2003 16:57 "/Cart-total-normal/F6-ct" (2452900)]

Linear Regression for Data2\_G:

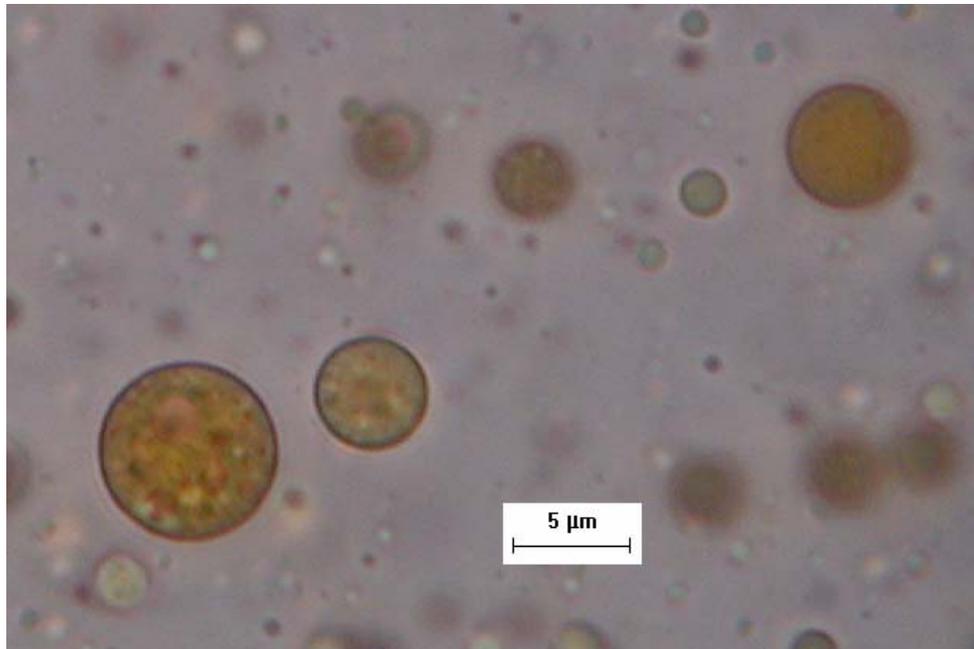
$$Y = A + B * X$$

Parameter	Value	Error
A	1.03379	0.03426
B	-0.02002	0.00204

R	SD	N	P
-0.95168	0.0742	12	<0.0001

## ANEXO H

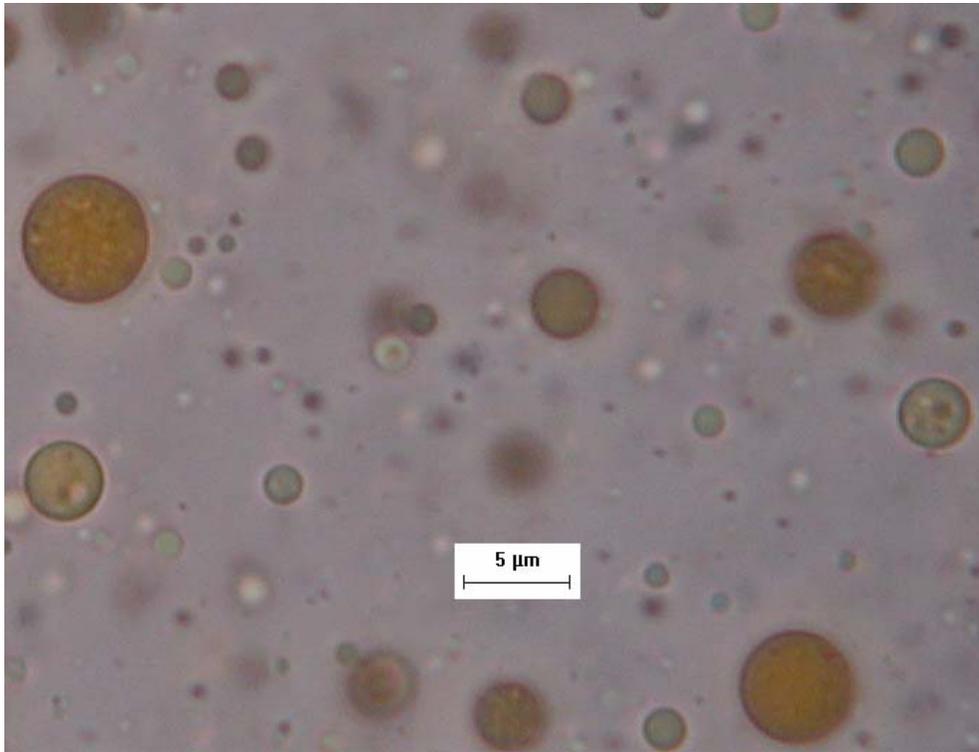
Micrografías de las microcápsulas M<sub>35%</sub>, 3.9 a distintas  
 $a_w$  redispersadas.



Microcápsulas re-dispersadas:  $M_{35\%, 3.9}$ ,  $a_w = 0.108$



Microcápsulas re-dispersadas:  $M_{35\%, 3.9}$ ,  $a_w = 0.318$



Microcápsulas re-dispersadas:  $M_{35\%, 3.9}$ ,  $a_w = 0.515$



Microcápsulas re-dispersadas:  $M_{35\%, 3.9}$ ,  $a_w = 0.628$



Microcápsulas re-dispersadas:  $M_{35\%, 3.9}$ ,  $a_w = 0.742$

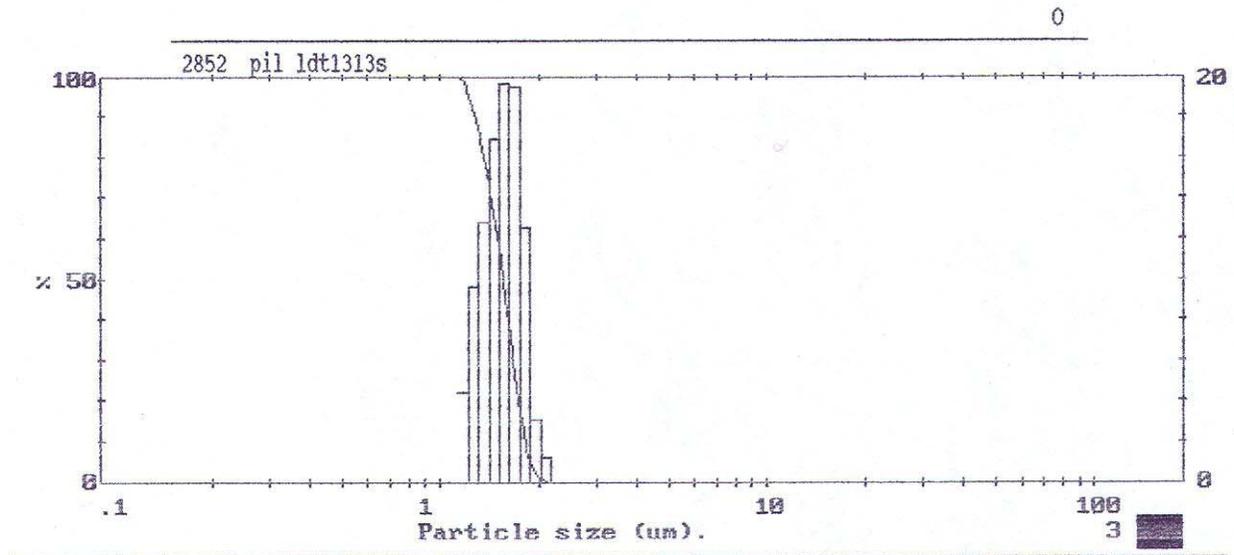
## ANEXO I

### Determinación de distribución y tamaño de gota promedio en las emulsiones múltiples

**MALVERN** Instruments SB.00 16 Jun 1983 3:22 pm

EMULSION W/O/W F<sub>35%, 3.9</sub>

000003233000003235 000003268

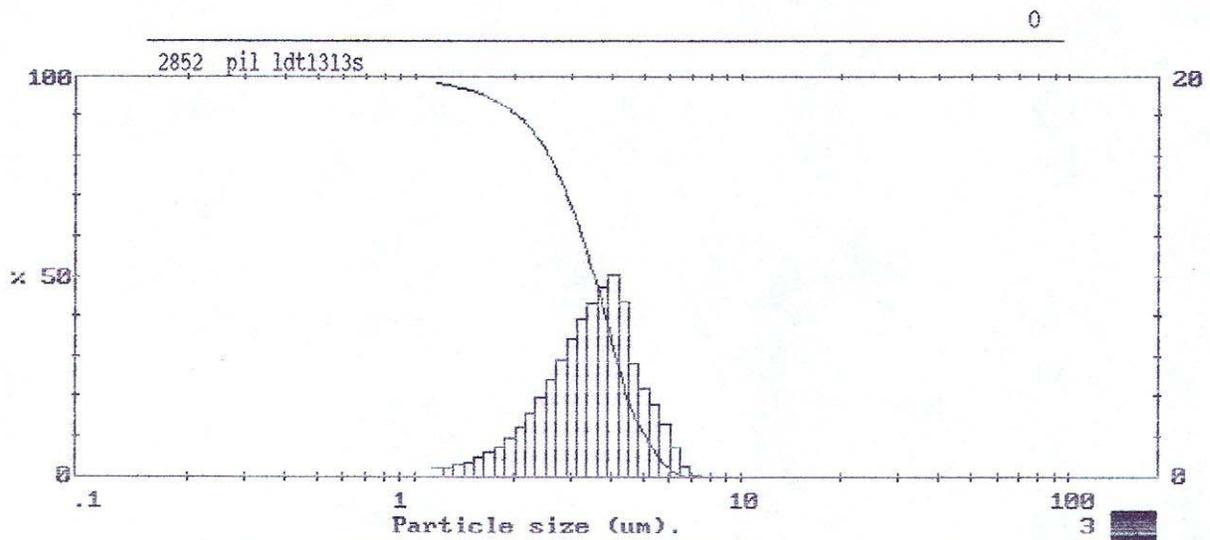


Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Span
				36.3	0.0	31.4	100	6.18	0.0	5.33	100	0.35
				31.4	0.0	27.1	100	5.33	0.0	4.60	100	D[4,3] 1.53µm
				27.1	0.0	23.3	100	4.60	0.0	3.97	100	
				23.3	0.0	20.2	100	3.97	0.0	3.42	100	D[3,2] 1.45µm
				20.2	0.0	17.3	100	3.42	0.0	2.95	100	
				17.3	0.0	15.0	100	2.95	0.0	2.55	100	D[v,0.9] 1.81µm
				15.0	0.0	12.9	100	2.55	0.0	2.19	100	
				12.9	0.0	11.1	100	2.19	3.6	1.90	96.4	D[v,0.1] 1.27µm
				11.1	0.0	9.63	100	1.90	31.3	1.64	65.1	
				9.63	0.0	8.31	100	1.64	38.4	1.41	26.7	D[v,0.5] 1.55µm
				8.31	0.0	7.16	100	1.41	22.2	1.22	4.4	
				7.16	0.0	6.18	100	1.22	4.4	0.32	0.0	Shape OFF
Source =	:Sample	Beam length = 2.2 mm		Normal		X= 1.55, N= 0.19		Volume Conc. = 0.0052%		Sp.S.A 4.1367 m <sup>2</sup> /cc.		
Focal length =	63 mm	Obscuration = 0.2098		Volume distribution								
Presentation =	pil											

Malvern Instruments

EMULSION W/O/W F<sub>25%</sub>, 3.9

000003233000003235 000003294

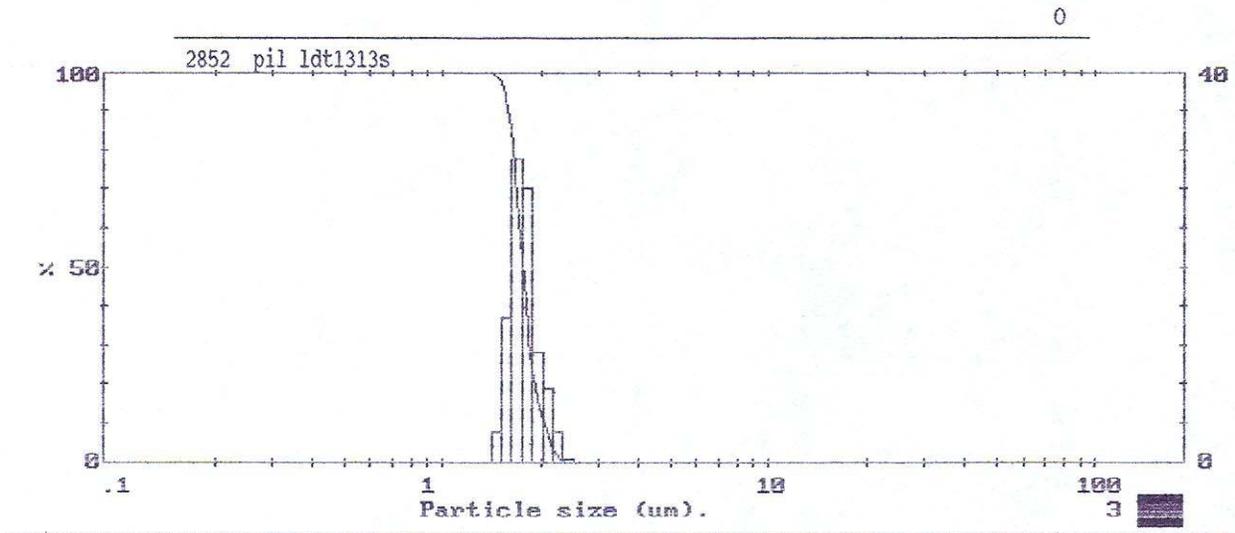


Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Span
				36.3	0.0	31.4	100	6.18	5.7	5.33	92.9	0.85
				31.4	0.0	27.1	100	5.33	9.5	4.60	83.5	D[4,3] 3.53µm
				27.1	0.0	23.3	100	4.60	18.2	3.97	65.3	
				23.3	0.0	20.2	100	3.97	18.8	3.42	46.4	D[3,2] 2.97µm
118	0.0	102	100	20.2	0.0	17.3	100	3.42	15.5	2.95	30.9	
102	0.0	88.2	100	17.3	0.0	15.0	100	2.95	11.1	2.55	19.8	D[v,0.9] 5.06µm
88.2	0.0	76.0	100	15.0	0.0	12.9	100	2.55	7.6	2.19	12.2	
76.0	0.0	65.6	100	12.9	0.0	11.1	100	2.19	4.5	1.90	7.7	D[v,0.1] 2.06µm
65.6	0.0	56.6	100	11.1	0.0	9.63	100	1.90	2.9	1.64	4.8	
56.6	0.0	48.8	100	9.63	0.0	8.31	100	1.64	1.8	1.41	3.1	D[v,0.5] 3.53µm
48.8	0.0	42.1	100	8.31	0.0	7.16	100	1.41	1.1	1.22	2.0	
42.1	0.0	36.3	100	7.16	1.4	6.18	98.6	1.22	2.0	0.32	0.0	Shape OFF
Source = :Sample				Beam length = 2.2 mm				Normal				D[v,0.5]
				Log. Diff. = 4.189				X= 3.52, N= 1.15				3.53µm
Focal length = 63 mm				Obscuration = 0.2035				Volume Conc. = 0.0102%				
Presentation = pil				Volume distribution				Sp.S.A 2.0204 m <sup>2</sup> /cc.				

Malvern Instruments

EMULSION W/O/W F 35%, 2.6

000003233000003235 000003272



Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Span
				36.3	0.0	31.4	100	6.18	0.0	5.33	100	0.26
				31.4	0.0	27.1	100	5.33	0.0	4.60	100	D[4,3] 1.78µm
				27.1	0.0	23.3	100	4.60	0.0	3.97	100	
				23.3	0.0	20.2	100	3.97	0.0	3.42	100	
118	0.0	102	100	20.2	0.0	17.3	100	3.42	0.0	2.95	100	D[3,2] 1.76µm
102	0.0	88.2	100	17.3	0.0	15.0	100	2.95	0.0	2.55	100	
88.2	0.0	76.0	100	15.0	0.0	12.9	100	2.55	3.0	2.19	97.0	D[v,0.9] 2.05µm
76.0	0.0	65.6	100	12.9	0.0	11.1	100	2.19	17.4	1.90	79.6	
65.6	0.0	56.6	100	11.1	0.0	9.63	100	1.90	59.7	1.64	19.9	D[v,0.1] 1.58µm
56.6	0.0	48.8	100	9.63	0.0	8.31	100	1.64	19.9	1.41	0.0	
48.8	0.0	42.1	100	8.31	0.0	7.16	100	1.41	0.0	1.22	0.0	D[v,0.5] 1.75µm
42.1	0.0	36.3	100	7.16	0.0	6.18	100	1.22	0.0	0.32	0.0	
Source = :Sample				Beam length = 2.2 mm				Normal				Shape OFF
Focal length = 63 mm				Log. Diff. = 3.594				X= 1.81, N= 0.11				
Presentation = pil				Obscuration = 0.2098				Volume Conc. = 0.0063%				
				Volume distribution				Sp.S.A 3.4038 m <sup>2</sup> /cc.				

Malvern Instruments

**MALVERN**

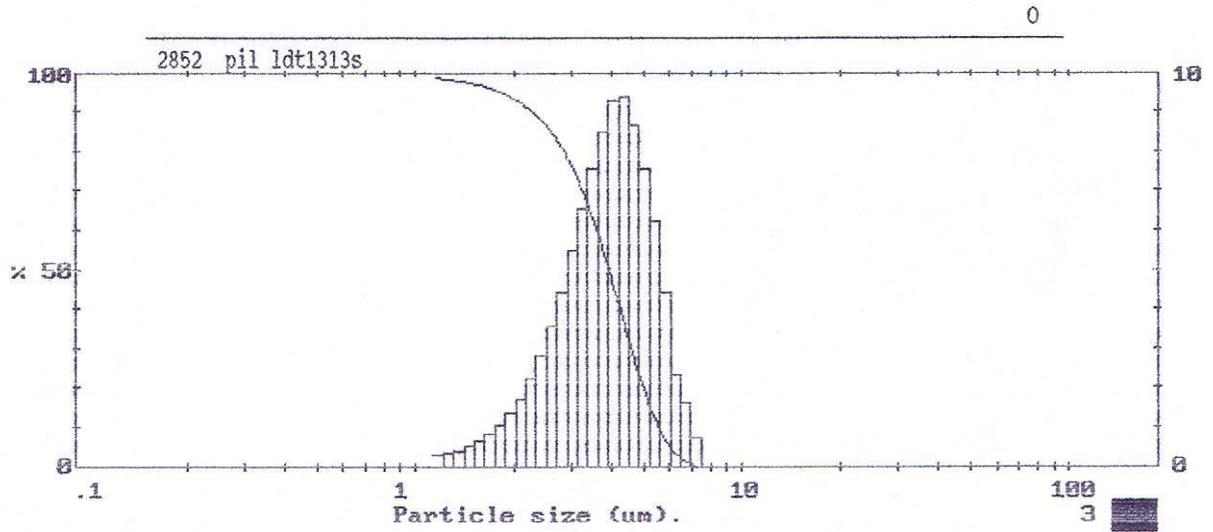
Instruments SB.8D

17 Jun 1983

5:03 pm

EMULSION W/O/W F 25%, 2.6

000003233000003235 000003273

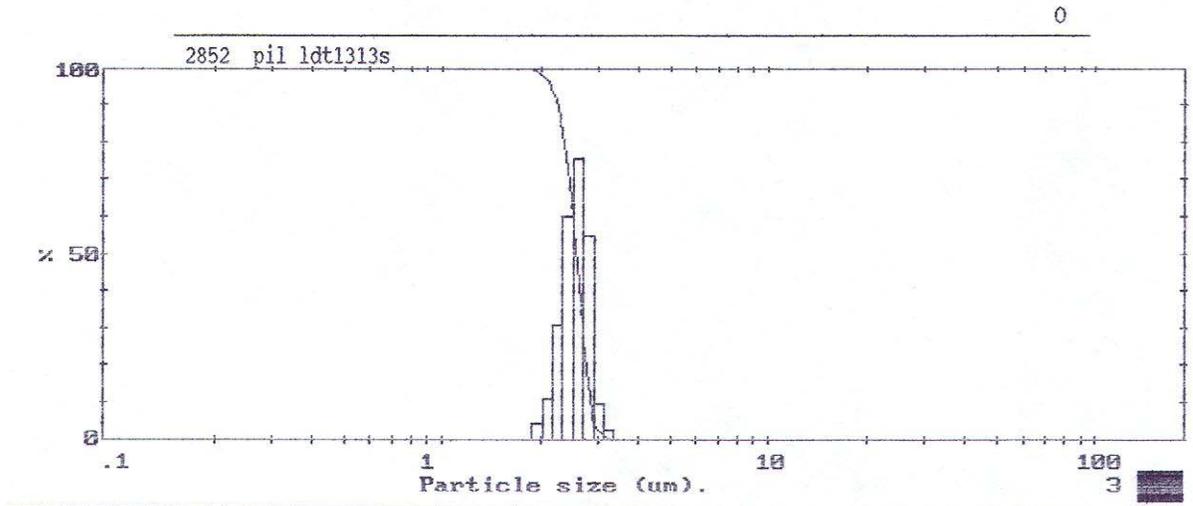


Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Span
				36.3	0.0	31.4	100	6.18	9.5	5.33	86.8	0.83
				31.4	0.0	27.1	100	5.33	15.9	4.60	70.9	D[4,3] 3.91µm
				27.1	0.0	23.3	100	4.60	19.0	3.97	52.0	
				23.3	0.0	20.2	100	3.97	16.9	3.42	35.1	
118	0.0	102	100	20.2	0.0	17.3	100	3.42	12.7	2.95	22.4	D[3,2] 3.31µm
102	0.0	88.2	100	17.3	0.0	15.0	100	2.95	8.3	2.55	14.1	
88.2	0.0	76.0	100	15.0	0.0	12.9	100	2.55	5.4	2.19	8.6	D[v,0.9] 5.54µm
76.0	0.0	65.6	100	12.9	0.0	11.1	100	2.19	3.2	1.90	5.5	
65.6	0.0	56.6	100	11.1	0.0	9.63	100	1.90	2.0	1.64	3.5	D[v,0.1] 2.30µm
56.6	0.0	48.8	100	9.63	0.0	8.31	100	1.64	1.2	1.41	2.2	
48.8	0.0	42.1	100	8.31	0.3	7.16	99.7	1.41	0.7	1.22	1.5	
42.1	0.0	36.3	100	7.16	3.4	6.18	96.3	1.22	1.5	0.32	0.0	
Source = :Sample				Beam length = 2.2 mm				Normal				D[v,0.5] 3.91µm
				Log. Diff. = 5.099				X = 3.90, N = 1.27				
Focal length = .63 mm				Obscuration = 0.2246				Volume Conc. = 0.0128%				Shape OFF
Presentation = pil				Volume distribution				Sp.S.A 1.8121 m <sup>2</sup> /cc.				

Malvern Instruments

EMULSION W/O/W F<sub>35%</sub>, 1.4

000003233000003235 000003276



Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Span
				36.3	0.0	31.4	100	6.18	0.0	5.33	100	0.23
				31.4	0.0	27.1	100	5.33	0.0	4.60	100	D[4,3] 2.56µm
				27.1	0.0	23.3	100	4.60	0.0	3.97	100	
				23.3	0.0	20.2	100	3.97	0.0	3.42	100	D[3,2] 2.53µm
118	0.0	102	100	20.2	0.0	17.3	100	3.42	3.5	2.95	96.5	
102	0.0	88.2	100	17.3	0.0	15.0	100	2.95	48.7	2.55	47.9	D[v,0.9] 2.85µm
88.2	0.0	76.0	100	15.0	0.0	12.9	100	2.55	41.1	2.19	6.8	
76.0	0.0	65.6	100	12.9	0.0	11.1	100	2.19	6.8	1.90	0.0	D[v,0.1] 2.25µm
65.6	0.0	56.6	100	11.1	0.0	9.63	100	1.90	0.0	1.64	0.0	
56.6	0.0	48.8	100	9.63	0.0	8.31	100	1.64	0.0	1.41	0.0	D[v,0.5] 2.56µm
48.8	0.0	42.1	100	8.31	0.0	7.16	100	1.41	0.0	1.22	0.0	
42.1	0.0	36.3	100	7.16	0.0	6.18	100	1.22	0.0	0.32	0.0	Shape OFF
Source = :Sample				Beam length = 2.2 mm				Normal				D[v,0.5]
Focal length = 63 mm				Log. Diff. = 4.541				X= 2.51, N= 0.17				2.56µm
Presentation = pil				Obscuration = 0.2693				Volume Conc. = 0.0120%				Shape OFF
				Volume distribution				Sp.S.A 2.3710 m <sup>2</sup> /cc.				

Malvern Instruments

**MALVERN**

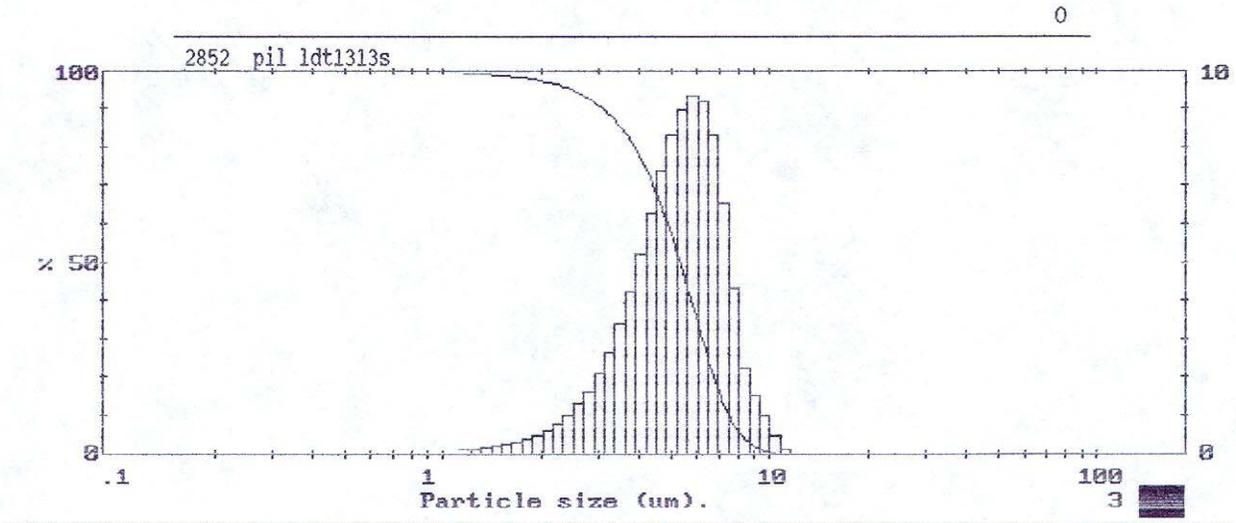
Instruments SB.00

20 Jun 1983

3:51 pm

EMULSION W/O/W F 25%, 1.4

000003233000003235 000003307



Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Span
				36.3	0.0	31.4	100	6.18	18.9	5.33	50.7	0.82
				31.4	0.0	27.1	100	5.33	16.6	4.60	34.1	D[4,3] 5.32µm
				27.1	0.0	23.3	100	4.60	12.3	3.97	21.8	
				23.3	0.0	20.2	100	3.97	8.2	3.42	13.5	
118	0.0	102	100	20.2	0.0	17.3	100	3.42	5.1	2.95	8.4	D[3,2] 4.51µm
102	0.0	88.2	100	17.3	0.0	15.0	100	2.95	3.1	2.55	5.3	D[v,0.9] 7.47µm
88.2	0.0	76.0	100	15.0	0.0	12.9	100	2.55	2.0	2.19	3.4	
76.0	0.0	65.6	100	12.9	0.0	11.1	100	2.19	1.1	1.90	2.2	
65.6	0.0	56.6	100	11.1	1.1	9.63	98.9	1.90	0.7	1.64	1.5	D[v,0.1] 3.11µm
56.6	0.0	48.8	100	9.63	3.2	8.31	95.7	1.64	0.5	1.41	1.0	
48.8	0.0	42.1	100	8.31	9.3	7.16	86.4	1.41	0.3	1.22	0.7	
42.1	0.0	36.3	100	7.16	16.9	6.18	69.5	1.22	0.7	0.32	0.0	
Source = :Sample				Beam length = 2.2 mm				Normal				D[v,0.5] 5.31µm
Focal length = 63 mm				Log. Diff. = 5.617				X= 5.30, N= 1.72				
Presentation = pil				Obscuration = 0.2113				Volume Conc. = 0.0162%				Shape OFF
				Volume distribution				Sp.S.A 1.3299 m <sup>2</sup> /cc.				

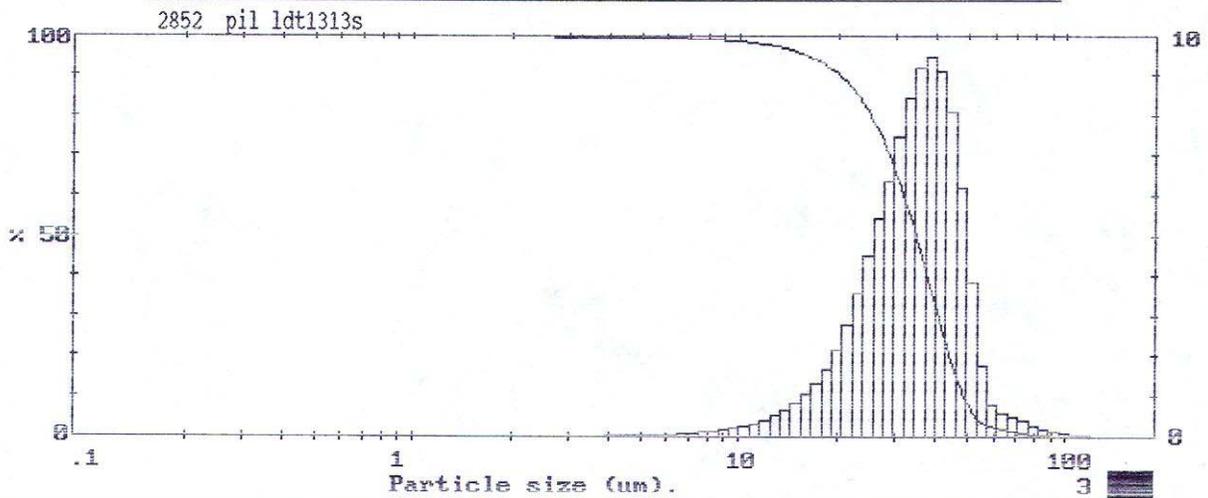
Malvern Instruments

## ANEXO J

### Determinación de distribución y tamaño de partícula de las microcápsulas

MICROCAPSULAS M<sub>35%, 3.9</sub>

000003371

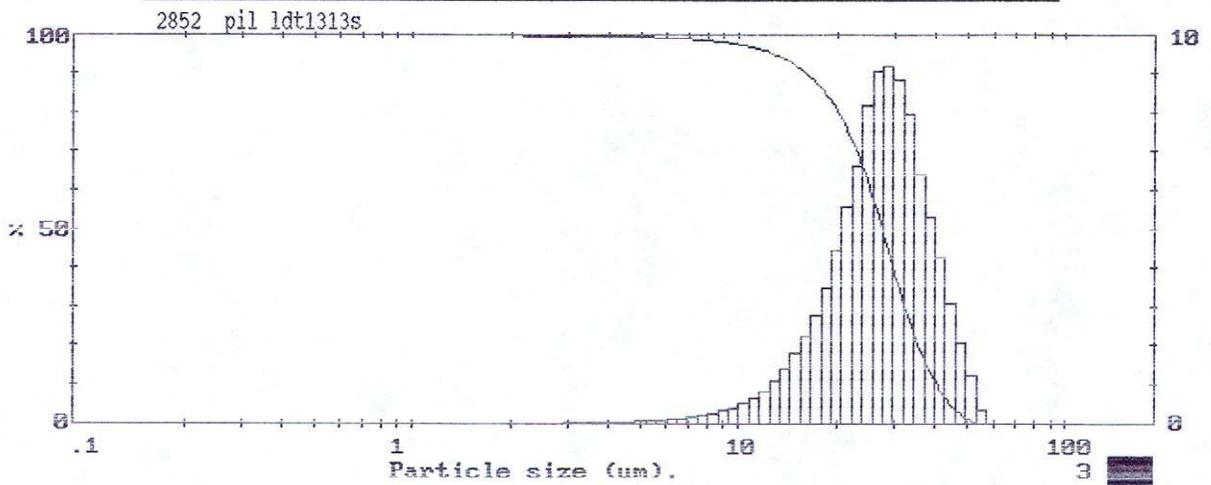


Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Span
				36.3	17.3	31.4	38.6	6.18	0.1	5.33	0.3	0.81
				31.4	13.5	27.1	25.2	5.33	0.1	4.60	0.3	D[4,3]
				27.1	9.6	23.3	15.5	4.60	0.1	3.97	0.2	34.96µm
				23.3	5.8	20.2	9.7	3.97	0.0	3.42	0.2	
118	0.1	102	99.9	20.2	3.6	17.3	6.1	3.42	0.0	2.95	0.1	D[3,2]
102	0.2	88.2	99.7	17.3	2.1	15.0	3.9	2.95	0.0	2.55	0.1	29.13µm
88.2	0.5	76.0	99.2	15.0	1.4	12.9	2.5	2.55	0.0	2.19	0.1	
76.0	0.9	65.6	98.3	12.9	0.8	11.1	1.7	2.19	0.0	1.90	0.1	D[v,0.9]
65.6	1.5	56.6	96.8	11.1	0.5	9.63	1.2	1.90	0.0	1.64	0.1	48.60µm
56.6	6.5	48.8	90.4	9.63	0.3	8.31	0.8	1.64	0.0	1.41	0.0	
48.8	15.4	42.1	75.0	8.31	0.2	7.16	0.6	1.41	0.0	1.22	0.0	D[v,0.1]
42.1	19.0	36.3	56.0	7.16	0.2	6.18	0.5	1.22	0.0	0.32	0.0	20.36µm
Source =	:Sample	Beam length =	2.2 mm	Normal			D[v,0.5]					34.65µm
Focal length =	63 mm	Log. Diff. =	5.270	Y=	34.66	N=	11.24					
Presentation =	pil	Obscuration =	0.2044	Volume Conc. =	0.1019%							
		Volume distribution	Sp.S.A	0.2060 m <sup>2</sup> /cc.								Shape OFF

Malvern Instruments

MICROCAPSULAS M<sub>25%</sub>, 3.9

000003372



Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Span
				36.3	15.2	31.4	66.9	6.18	0.2	5.33	0.5	0.88
				31.4	18.5	27.1	48.4	5.33	0.1	4.60	0.4	D[4,3]
				27.1	17.1	23.3	31.3	4.60	0.1	3.97	0.3	27.91µm
				23.3	11.4	20.2	19.9	3.97	0.1	3.42	0.2	
118	0.0	102	100	20.2	7.5	17.3	12.4	3.42	0.1	2.95	0.2	D[3,2]
102	0.0	88.2	100	17.3	4.5	15.0	7.9	2.95	0.0	2.55	0.1	23.32µm
88.2	0.0	76.0	100	15.0	3.0	12.9	4.9	2.55	0.0	2.19	0.1	
76.0	0.0	65.6	100	12.9	1.7	11.1	3.2	2.19	0.0	1.90	0.1	D[v,0.9]
65.6	0.0	56.6	100	11.1	1.0	9.63	2.1	1.90	0.0	1.64	0.1	40.46µm
56.6	1.9	48.8	98.1	9.63	0.7	8.31	1.4	1.64	0.0	1.41	0.1	
48.8	5.7	42.1	92.4	8.31	0.4	7.16	1.0	1.41	0.0	1.22	0.0	D[v,0.1]
42.1	10.2	36.3	82.2	7.16	0.3	6.18	0.7	1.22	0.0	0.32	0.0	16.18µm
Source = :Sample				Beam length = 2.2 mm				Normal				D[v,0.5]
				Log. Diff. = 5.294				X= 27.65, N= 8.97				27.44µm
Focal length = 63 mm				Obscuration = 0.2074				Volume Conc. = 0.0827%				
Presentation = pil				Volume distribution				Sp.S.A 0.2573 m <sup>2</sup> /cc.				Shape OFF

Malvern Instruments

**MALVERN**

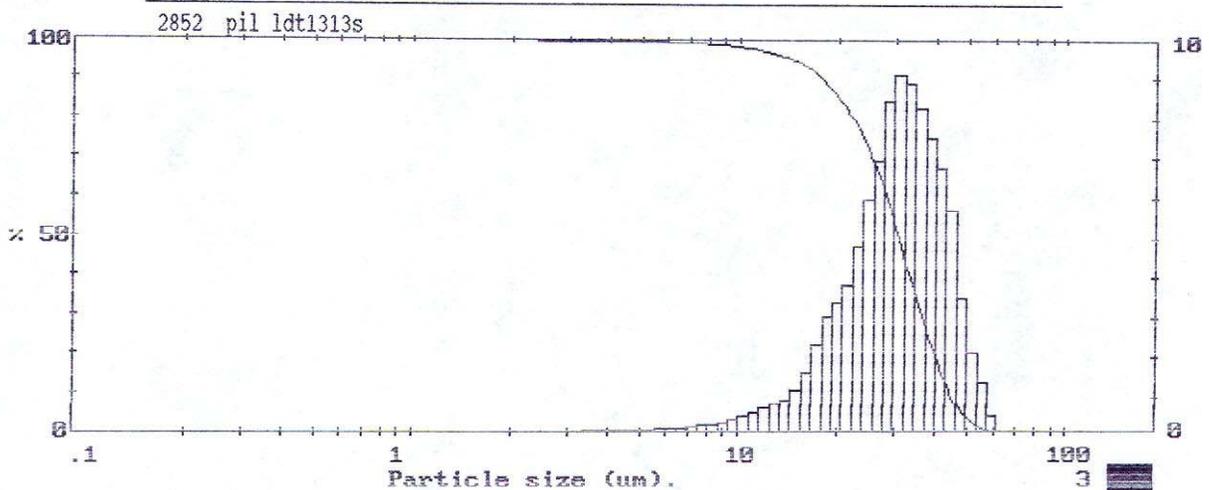
Instruments SB.8D

23 Sep 1983

2:41 pm

MICROCAPSULAS M<sub>35%, 2.6</sub>

000003373

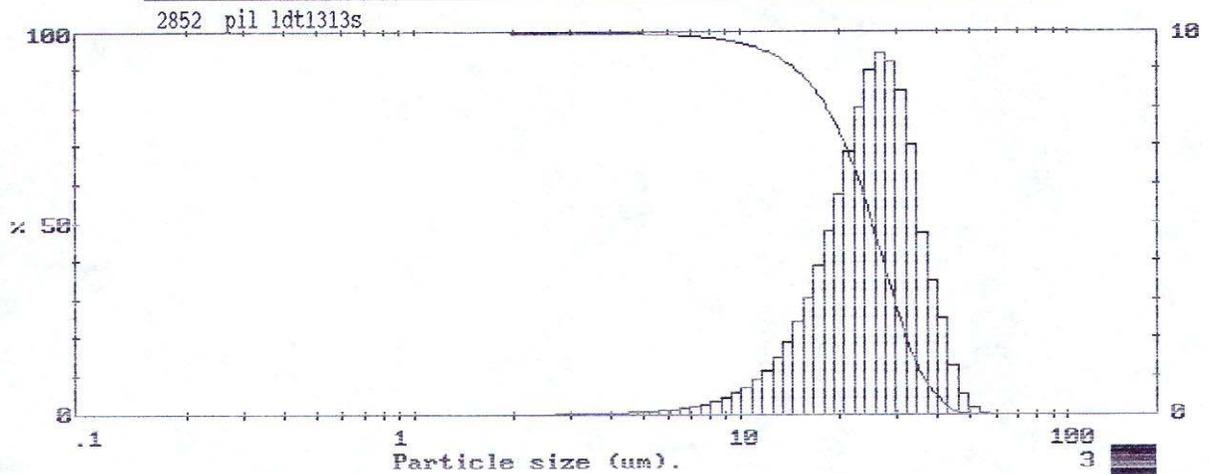


Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Span
				36.3	17.5	31.4	53.0	6.18	0.1	5.33	0.4	0.86
				31.4	17.4	27.1	35.6	5.33	0.1	4.60	0.3	D[4,3]
				27.1	12.6	23.3	23.0	4.60	0.1	3.97	0.2	30.98µm
				23.3	7.9	20.2	15.0	3.97	0.1	3.42	0.2	
118	0.0	102	100	20.2	6.3	17.3	8.8	3.42	0.0	2.95	0.2	D[3,2]
102	0.0	88.2	100	17.3	3.3	15.0	5.5	2.95	0.0	2.55	0.1	25.89µm
88.2	0.0	76.0	100	15.0	1.9	12.9	3.6	2.55	0.0	2.19	0.1	
76.0	0.0	65.6	100	12.9	1.3	11.1	2.4	2.19	0.0	1.90	0.1	D[v,0.9]
65.6	0.5	56.6	99.5	11.1	0.8	9.63	1.6	1.90	0.0	1.64	0.1	44.44µm
56.6	3.8	48.8	95.6	9.63	0.5	8.31	1.1	1.64	0.0	1.41	0.0	
48.8	10.2	42.1	85.4	8.31	0.3	7.16	0.8	1.41	0.0	1.22	0.0	D[v,0.1]
42.1	14.9	36.3	70.5	7.16	0.2	6.18	0.6	1.22	0.0	0.32	0.0	17.94µm
Source =	:Sample			Beam length =	2.2 mm		Normal					D[v,0.5]
				Log. Diff. =	5.183		X=	30.72, N= 9.96				30.67µm
Focal length =	63 mm			Obscuration =	0.1975		Volume Conc. =	0.0870%				
Presentation =	pil			Volume distribution			Sp.S.A	0.2318 m <sup>2</sup> /cc.				Shape OFF

Malvern Instruments

MICROCAPSULAS M<sub>25%, 2.6</sub>

000003374



Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Span
				36.3	13.0	31.4	78.0	6.18	0.2	5.33	0.6	0.84
				31.4	18.3	27.1	59.6	5.33	0.2	4.60	0.5	D[4,3]
				27.1	18.7	23.3	40.9	4.60	0.1	3.97	0.4	25.26µm
				23.3	14.0	20.2	26.9	3.97	0.1	3.42	0.3	
118	0.0	102	100	20.2	10.2	17.3	16.7	3.42	0.1	2.95	0.2	D[3,2]
102	0.0	88.2	100	17.3	6.2	15.0	10.6	2.95	0.0	2.55	0.2	21.21µm
88.2	0.0	76.0	100	15.0	4.0	12.9	6.6	2.55	0.0	2.19	0.1	
76.0	0.0	65.6	100	12.9	2.4	11.1	4.2	2.19	0.0	1.90	0.1	D[v,0.9]
65.6	0.0	56.6	100	11.1	1.4	9.63	2.7	1.90	0.0	1.64	0.1	35.76µm
56.6	0.3	48.8	99.7	9.63	0.9	8.31	1.8	1.64	0.0	1.41	0.1	
48.8	2.2	42.1	97.5	8.31	0.6	7.16	1.3	1.41	0.0	1.22	0.1	D[v,0.1]
42.1	6.6	36.3	91.0	7.16	0.4	6.18	0.9	1.22	0.1	0.32	0.0	14.76µm
Source =	:Sample			Beam length =	2.2 mm			Normal				D[v,0.5]
				Log. Diff. =	5.378			X=	25.16	N=	8.16	25.14µm
Focal length =	63 mm			Obscuration =	0.2008			Volume Conc. =	0.0725%			
Presentation =	pil			Volume distribution				Sp.S.A	0.2829	m <sup>2</sup> /cc.		Shape OFF

Malvern Instruments

# MALVERN

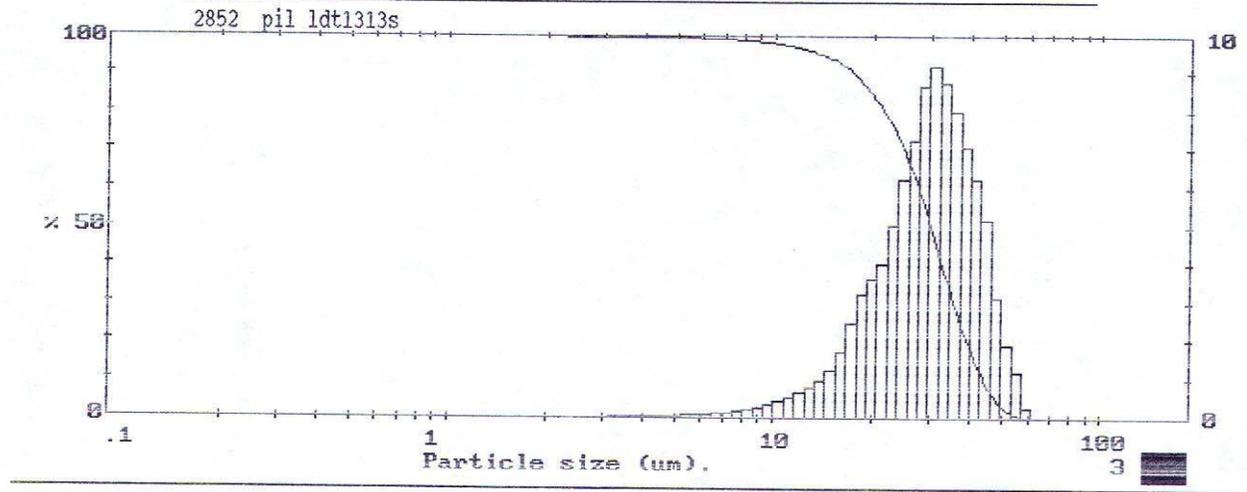
Instruments SB.0D

24 Sep 1983

10:33 am

MICROCAPSULAS M<sub>35%, 1.4</sub>

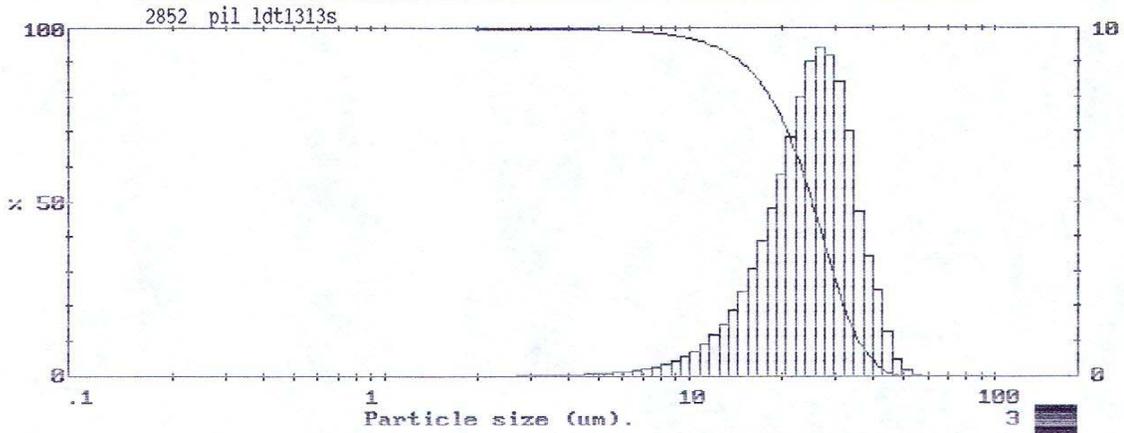
000003381



Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Span
				36.3	17.3	31.4	55.7	6.18	0.2	5.33	0.5	0.87
				31.4	17.8	27.1	37.9	5.33	0.1	4.60	0.4	D[4,3]
				27.1	13.2	23.3	24.7	4.60	0.1	3.97	0.3	30.34µm
				23.3	8.4	20.2	16.3	3.97	0.1	3.42	0.2	
118	0.0	102	100	20.2	6.7	17.3	9.5	3.42	0.0	2.95	0.2	D[3,2]
102	0.0	88.2	100	17.3	3.5	15.0	6.0	2.95	0.0	2.55	0.1	25.24µm
88.2	0.0	76.0	100	15.0	2.0	12.9	4.0	2.55	0.0	2.19	0.1	
76.0	0.0	65.6	100	12.9	1.4	11.1	2.6	2.19	0.0	1.90	0.1	D[v,0.9]
65.6	0.4	56.6	99.6	11.1	0.9	9.63	1.7	1.90	0.0	1.64	0.1	43.76µm
56.6	3.4	48.8	96.2	9.63	0.5	8.31	1.2	1.64	0.0	1.41	0.1	
48.8	9.3	42.1	86.9	8.31	0.3	7.16	0.9	1.41	0.0	1.22	0.0	D[v,0.1]
42.1	14.0	36.3	72.9	7.16	0.2	6.18	0.6	1.22	0.0	0.32	0.0	17.55µm
Source =	:Sample			Beam length =	2.2 mm			Normal				D[v,0.5]
Focal length =	63 mm			Log. Diff. =	4.653			X =	30.07	N =	9.82	30.03µm
Presentation =	pil			Obscuration =	0.2101			Volume Conc. =	0.0910%			
				Volume distribution			Sp.S.A	0.2377 m <sup>2</sup> /cc.				Shape OFF

MICROCAPSULAS M<sub>25%</sub>, 1.4

000003370



Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Upper	in	Lower	Under	Span
				36.3	13.0	31.4	78.1	6.18	0.2	5.33	0.6	0.84
				31.4	18.3	27.1	59.8	5.33	0.2	4.60	0.5	D[4,3]
				27.1	18.7	23.3	41.1	4.60	0.1	3.97	0.4	25.23µm
				23.3	14.0	20.2	27.0	3.97	0.1	3.42	0.3	
118	0.0	102	100	20.2	10.2	17.3	16.8	3.42	0.1	2.95	0.2	D[3,2]
102	0.0	88.2	100	17.3	6.2	15.0	10.6	2.95	0.0	2.55	0.2	21.18µm
88.2	0.0	76.0	100	15.0	4.0	12.9	6.6	2.55	0.0	2.19	0.1	
76.0	0.0	65.6	100	12.9	2.4	11.1	4.2	2.19	0.0	1.90	0.1	D[v,0.9]
65.6	0.0	56.6	100	11.1	1.4	9.63	2.7	1.90	0.0	1.64	0.1	35.71µm
56.6	0.3	48.8	99.7	9.63	0.9	8.31	1.8	1.64	0.0	1.41	0.1	
48.8	2.2	42.1	97.6	8.31	0.6	7.16	1.3	1.41	0.0	1.22	0.1	D[v,0.1]
42.1	6.5	36.3	91.1	7.16	0.4	6.18	0.9	1.22	0.1	0.32	0.0	14.74µm
Source =	:Sample	Beam length =	2.2 mm	Normal								D[v,0.5]
		Log. Diff. =	5.663	X =	25.14	N =	8.15					25.11µm
Focal length =	63 mm	Obscuration =	0.2007	Volume Conc. =	0.0724%							Shape OFF
Presentation =	pil	Volume distribution		Sp.S.A	0.2833	m <sup>2</sup> /cc.						

Malvern Instruments