



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**“ESTUDIO SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE α -TOCOFEROL EN
MICROCÁPSULAS OBTENIDAS POR SECADO POR ASPERSIÓN”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN ALIMENTOS**

PRESENTA

MARÍA XIMENA QUINTANILLA CARVAJAL

DIRECTORES DE TESIS

DR. GUSTAVO FIDEL GUTIÉRREZ LÓPEZ
DR. ANTONIO RUPERTO JIMÉNEZ APARICIO



MÉXICO, D.F. JUNIO DEL 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F., siendo las 11:00 horas del día 09 del mes de JUNIO del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de Alimentos para examinar la tesis de titulada:

Estudio sobre la distribución de α -tocoferol en microcápsulas obtenidas en secado por aspersión

Presentada por el alumno:

QUINTANILLA
Apellido paterno

CARVAJAL
Apellido materno

MARÍA XIMENA
Nombre(s)

Con registro:

B	0	7	1	4	8	6
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

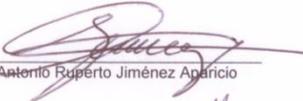
DOCTORADO

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

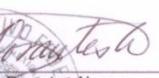

Dr. Gustavo Fidel Gutiérrez López


Dr. Antonio Ruperto Jiménez Aparicio


Dr. Humberto Hernández Sánchez

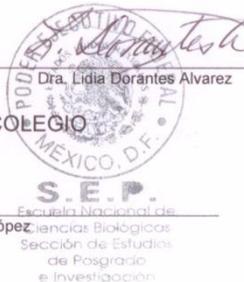

Dra. Liliana Alamilla Beltrán


Dr. José Jorge Chanona Pérez


Dra. Lidia Dorantes Alvarez

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO


Dr. Manuel Jesús Piñón López



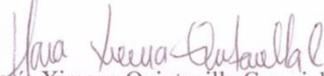


INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F., el día 09 del mes de Junio del año 2011, el (la) que suscribe **María Ximena Quintanilla Carvajal** alumno (a) del Programa de **Doctorado en Ciencias en Alimentos** con número de registro **B071486**, adscrito a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dr. Gustavo Fidel Gutiérrez López y el Dr. Antonio Jiménez Aparicio** ceden los derechos del trabajo intitulado: "**Estudio sobre la distribución de α -tocoferol en microcápsulas obtenidas por secado por aspersión**", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones: **maxiqui@hotmail.com**, **gusfgl@gmail.com** y **arjaparicio@gmail.com**; si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


María Ximena Quintanilla Carvajal

Nombre y firma alumno (a)

Vo. Bo


Dr. Gustavo Fidel Gutiérrez López
Director (a) de Tesis


Dr. Antonio Jiménez Aparicio
Director (a) de Tesis

Food Eng. Rev.
DOI 10.1007/s12393-009-9012-6

Nanoencapsulation: A New Trend in Food Engineering Processing

María Ximena Quintanilla-Carvajal · Brenda Hideliza Camacho-Díaz ·
Lesvia Sofia Meraz-Torres · José Jorge Chanona-Pérez · Liliana Alamilla-Beltrán ·
Antonio Jimenéz-Aparicio · Gustavo F. Gutiérrez-López

© Springer Science+Business Media, LLC 2009

Abstract Nanoencapsulation is defined as a technology to pack substances in miniature making use of techniques such as nanocomposite, nanoemulsification, and nanostructuring. It provides final product functionality (including controlled release of the core) which is expected to be maintained during storage. Within the food engineering field, protection of bioactive compounds such as vitamins, antioxidants, proteins, and lipids as well as carbohydrates may be achieved using this technique for the production of functional foods with enhanced functionality and stability. In this paper, the different techniques that have been developed for the production of nanocapsules are discussed, and examples of their application are provided including regulatory aspects on products of nanotechnology. Also, it is illustrated a proposal of classification and characterization of the different structural arrangements of core-shell materials in nanoencapsulates composites found in the literature.

Keywords Nanotechnology · Nanoencapsulation · Nanoemulsion · Size of particles

M. X. Quintanilla-Carvajal · B. H. Camacho-Díaz ·
L. S. Meraz-Torres · J. J. Chanona-Pérez ·
L. Alamilla-Beltrán · G. F. Gutiérrez-López (✉)
Departamento de Graduados e Investigación en Alimentos,
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN, Prol. de Carpio y
Plan de Ayala s/n, Col. Santo Tomás,
1340 Delegación Miguel Hidalgo, Mexico
e-mail: gusfgl@gmail.com

A. Jimenéz-Aparicio
Centro de Desarrollo de Productos Bióticos-IPN, Yauhtepec,
Morelos, Mexico

Introduction

The term nanotechnology was coined in 1974; Nario Taniguchi used it to describe the manipulation of particles of less than one micrometer, and in 1959, the physicist, Richard Feynman spread the concept within the atomic engineering field [1]. Nanotechnology involves research, technology development, and control of structures within sizes from 1 to 100 nm. Nowadays, nanotechnology is applied to creating structures with special properties which strongly depend on size and structure such as quantum confinement in semiconductor particles, surface plasmon resonance in some metal particles, and superparamagnetism in magnetic materials [2, 3].

A number of advances in the food processing fields have been made on nanotechnology grounds. Preparation of nano-sized materials can be carried out using "Top down" methodologies which consist in decreasing the size of macrostructures down to the nano-size scale or by "Bottom up" techniques in which arrangements of atoms, molecules, or single particles are induced. The large surface area per unit mass of nano-sized biomaterials may increase their biological activity [4] as in the formulations of herbaceous plants as a result of nanotechnology-based studies [5]. Nanostructures have been used for the inhibition of thermal polymerization and for eliminating bad odors by catalytic refining of frying oil using nanoceramics [6]. Also, the preparation of milk protein nanotubes with potential applications as carrier materials and enhancers of properties such as jellification and viscosity has received special attention [7]. As far as packaging is concerned, there have been advances on the preparation of nylon and titanium dioxide nanocomposites as barriers to oxygen in fried foods packs [8]. Worldwide sales of nanofoods have increased from 150 millions of dollars in 2002 to 860 in 2004, and it

Published online: 10 November 2009

 Springer

is foresight that this figure will reach 20.4 billions in 2010 [9, 10].

Is within the nutraceutical and food safety fields that applications of nanotechnology have made important progress; the FDA approved methodologies and techniques supporting the inclusion of nanotechnology-based ingredients for mass consumption [11]. Examples of these are the production of vitamins in the form of micelles and of small (nano) detectors of viruses. These developments provide the pattern for the further progress in the creation of new nanostructured products that are capable of releasing at controlled rates, different compounds of improved functionality [12, 13].

In this revision, it is aimed to highlight basic and applied aspects of encapsulation processes in nanotechnology, stressing production of functional foods. Also, issues on characterization and elaboration and regulatory issues on nanoencapsulation-related fields are described.

Regulation

Legal aspects related to the handling and consumption of nano-sized materials in food applications are important for deciding on the consumption of these composites and will have in years to come an important role in mass production of nanofoods. Currently available information of risks associated to manipulation of nano-sized products is limited, and there are not internationally agreed regulatory parameters related to manipulation of nano-sized food materials, and thus, many products reach markets without prior evaluation on safety aspects related to their manipulation [11, 14].

Impact of nanoparticles over human physiology depends on their chemical nature, surface properties, and manner of self-assembly [15]. Particles enter human body by inhalation, contact, or ingestion. Particles having a size within the range of 4–10 μm can reach human lungs, whereas particles having a size smaller than 400 nm may reach alveoli [16]. There is a lack of information on aspects related to development of foodstuffs which contain manufactured nanoparticles and on physicochemical properties of nano-sized particles used as additives during their transit through the gastrointestinal tract [17].

Regulatory aspects related to nanoproducts are led by the United States of America. The National Nanotechnology Initiative (NNI) describes the uses and the applications of nanotechnology in three main areas: (1) Research and technology on the development of products at the atomic, molecular or macromolecular scales in the length of 1–100 nm. (2) Creating and using structures that have novel properties and functions because of their small sizes. (3) Ability to control or manipulate on the atomic scale [11].

It is important to mention that although the “nano” term refers to a magnitude 10^{-9} , study of materials of bigger size but with pores, cracks, incrustations, etc. of nano-size which add functionality are included in the nanotechnology study field. This has been illustrated by introducing thermodynamic considerations in water sorption analysis of food-related systems as in the work by Flores-Andrade et al. [18]. Improved functionality may be observed in food applications at particle sizes somehow larger than the 1–100 nm range reported earlier. For example, Wulff-Pérez et al. [19] demonstrated that the colloidal stability of some nanoemulsions can be precisely controlled by the chemical structure of its interface. In their work, they used the amphiphilic uncharged tri-block copolymer Pluronic F68 as surfactant and natural oils from soybean, sesame, and olive as the organic phase. The more stable resulting emulsions resulted very appropriate for parenteral administration and had an average particle size, determined by dynamic light scattering (DLS), of approximately 500 nm.

Chi-Fai et al. [11] reported 42 bodies worldwide that support development of nanotechnology and involved in regulatory aspects. Asia was reported to have 23 entities, nine of them in Japan; Taiwan and Korea had five each one and China, four. Europe was the second continent in the list having four integrated entities, plus other five by United Kingdom, three by France, and two by Germany and Italy. United States was reported to have six groups at the time of releasing the survey; Canada with one and finally, Australia with three.

Background

Nanoencapsulation is defined as a technology to pack substances in miniature and refers to bioactive packing at the nanoscale [20]. Nanocapsules can often release their content at controlled rates [21] as in the case of hydrophobic ion pairing for incorporating lysozyme into electrospun poly(ϵ -caprolactone) (PCL)/poly(ethylene glycol) (PEG) non-woven membranes. Li et al. [22] reported that the addition of PEG into the PCL nanofibers not only improved the hydrophilicity of the membrane but also played an important role on in vitro lysozyme release rate. It was also found that the release rate of lysozyme was enhanced with the increase in PEG content and with salt concentration in the medium accelerating the liberation of the enzyme which kept most of its activity. In another work, Niu et al. [23] studied the effects of tissue engineering scaffold on the controlled releasing of a synthetic peptide from porous nano-hydroxyapatite/collagen/poly(L-lactic acid)/chitosan microspheres (nHAC/PLLA/CMs) containing different quantities of chitosan which were prepared by a thermally induced phase separation method.

Food Eng. Rev.

Rehydration of food materials can be improved by encapsulation. Generation of pores, extent of hydrophobic–hydrophilic balances within them, and capsule–solvent large contact areas aid to improve wetting processes. Zimet and Livney [24] investigated on the use of β -lactoglobulin (β -Lg) as natural molecular nanocarrier for hydrophobic molecules and reported the formation of colloidal stable nanocomplexes of fatty acids (docosahexaenoic) DHA-loaded β -Lg and low methoxyl pectin below the isoelectric point of β -Lg (5.2). These authors found that by adding excess of pectin, the formation of dilutable nanoparticle dispersions was enabled, and transparent solutions containing 0.05% β -Lg and DHA at a 1:2 (β -Lg:DHA) molar ratio were formed, having a very good colloidal stability and average particle size of 100 nm. These nanocomplexes provided good protection against degradation of DHA during accelerated shelf life stress tests.

It is also important the encapsulation and delivery of sensitive health-promoting substances using natural GRAS (generally regarded as safe) ingredients. Semo et al. [25] studied systems containing the oil-soluble vitamin D₂, which is essential for calcium metabolism. They demonstrated the possibility to load this vitamin into casein micelles (CM), utilizing the natural self-assembly tendency of bovine caseins. The vitamin was about 5.5 times more concentrated within the micelles than in the serum. Also, the morphology and average diameter of the re-assembled micelles were studied. This study suggested that CM may be useful as nanovehicles for entrapment, protection, and delivery of sensitive hydrophobic nutraceuticals within food products. Also, Preetz et al. [26] prepared three-layer polyelectrolyte shell capsules and a core consisting of medium-chain triglycerides. The preparation was based on a high-pressure homogenized emulsion that was stabilized by a modified starch. The nanocapsules with an average size of 130 nm were characterized by Zeta potential, nuclear magnetic resonance, transmission electron microscopy, and light scattering techniques. All ingredients were non-toxic and biocompatible.

Preparation of capsules by dehydration and induction of nanopores on the surface of shell materials can be observed in the work by Drusch and Berg [27]. The aim of the study was to investigate the localization of the extractable oil in spray-dried microencapsulated fish oil prepared under different spray-drying conditions and the impact on lipid oxidation upon storage. Authors used confocal laser scanning microscopy, scanning electron microscopy, and different extraction procedures and revealed that the extractable oil in microencapsulated fish oil is mainly located on the surface and in oil droplets close to the surface. It is noteworthy that the inlet/outlet spray-drying air temperatures (210/90 °C y 160/60 °C) not only had effects on surface lipidic contents. Besides, it is possible to

observe formation of nanopores on the surface of the materials.

The main technological trends in the preparation of nanocapsules are development of nano-sized capsules, structuring nano or micro capsules with nano-sized pores [28], and encapsulation of nano-size particulate compounds. Encapsulation of nanoparticles prepared from nanoemulsions of different sources of oils and produced by different homogenization methodologies followed by spray drying has received a good deal of attention within this field [29–35].

Different techniques have been developed for the production of nanocapsules. In general, these methodologies may be divided into three main groups [36]: (a) Physical processes such as spray drying–coating, extrusion, and spray drying; (b) Physicochemical processes such as simple or complex coacervation and entrapment into liposomes; (c) Chemical processes: interfacial polymerization and molecular inclusion. In order to select the most suitable encapsulation process for a given purpose, it is necessary to know the required size of the particles, the physicochemical properties of the core material as well as the nature of the substance to encapsulate. Other parameters to be taken into account are the desired or recommended releasing mechanism and associated costs [36]. Techniques for achieving nanoencapsulation are more complex than those used for microencapsulation chiefly due to the fact that it is, in general, more difficult to attain a good nanoencapsulation process given the complex morphology of the capsule and core material and the demands of releasing rates [11]. Chemical and physical natures of the core and shell materials, evaluation of their interactions as well as their proportion in the formulation of the capsules are important parameters which determine the final properties of the particles [37]. Castellanos et al. [38] evaluated the effect of molecular radius and chemical composition of wall materials onto -chymotrypsin with methoxy poly(ethylene glycol; PEG) encapsulated in poly(lactic-co-glycolic acid (PLGA) microspheres by a solid-in-oil-in-water method. Encapsulation was evaluated through enzyme kinetics, thermal stability, and tertiary structure intactness.

Nanoencapsulation is efficient for the development of functional products and may help to solve difficulties such as loss of functionality during processing or in storage, incompatibilities between core and shell materials, generation of bad odors and flavors, deterioration of texture, and in the case of enzymes, loss of activity [39].

The formation of polymeric nanoparticles in water which are used for food or medicine is the result of the auto assembling of nanocomposites containing hydrophobic complexes in the center of the capsule and the even more hydrophobic shell [29, 40]. One way to produce amphiphilic structures is attaching or “grafting” dextran with

synthetic polymers [41]. This assembly can also be modified by the addition of hydrophobic functional groups [42].

Emulsions are mixtures of immiscible fluids. Usually, one of them, in the form of small droplets, forms the dispersed phase, and although the natural tendency of the emulsions is to coalesce, the rate and the extent of these phenomena will depend mainly on the droplet size of the emulsion (DSE) and composition of the phases. Depending on the DSE, emulsions can be classified into micro (10–100 nm), mini (100–1,000 nm), and macroemulsions (0.5–100 μ m) [43]. Nano-submicron emulsions are kinetically stable systems that can be either transparent (DSE < 200 nm) or “milky” (DSE \approx 500 nm) [43, 44].

Interfaces between two immiscible fluids generate a tension also called interfacial energy which is caused by the difference in cohesion between the molecules of both phases. The generation of boundaries or interfaces implies energy costs proportional to the amount of generated interface, and the size distribution of droplets forming the emulsions plays a key role in determining the specific interfacial tension [45].

Colloidal stability of nanoemulsions can be controlled by handling the chemical nature and structure of the phases, and by handling the process of elaboration [19].

Formation of Nanoemulsions

Methods and principles for the preparation of nanoemulsions are those based on processes available for the fabrication of traditional-sized emulsions and on the applications of flow fields, and by using membranes and micro-channels [46]. In Table 1, a selection of works describing nano-emulsification techniques and applications in food-related areas is presented.

Preparation of Emulsions Using Flow Fields

One of the most frequent methods to produce emulsions is by inducing a very strong flow by agitation, intense mixing, or by flow through a small opening. Flow around a droplet induces a shear force that makes the droplets to break up, forming smaller droplets [55].

- Rotor–stator systems: the flow field between two elements becomes very intense within a very short distance. The most important equipments used are the stirred tanks as well as the colloid and toothed mills [56].
- High-pressure homogenizers: the mixture is pumped through a very small hole or gap. The extensional flows

break up the large droplets into small ones. Valve and nozzle systems are used in these cases [57].

- Ultrasound systems: high frequency sound waves follow a pattern which propagates turbulence and induces fluctuation of pressure generated by an actuator which vibrates at specific frequencies. This technology has not yet been proved as efficient for industrial scale applications [58].

Preparation of Emulsions by Flow through a Membrane

In membrane treatments, fluid is forced through a membrane having pores of a certain diameter to decrease the size of droplets in the downstream side of the membrane. The main characteristics of these techniques are that flow fields applied are mild, and energy consumption is lower than for homogenization through a single orifice [59].

- Cross flow membrane emulsification [60]: if the purpose is to prepare oil in water emulsions, the membrane used should be hydrophilic, causing the oil to emerge out of a pore and forming small droplets on top of the mouth of pore as shown in Fig. 1.
- Dead-End (“Premix”) membrane emulsification: coarse pre-emulsions need to be passed a number of times through the membrane to homogenize size of the emulsion [59, 61].

Preparation of Emulsions by Flow through Micro-Channels (Microfluidics)

In this technique, streams of fluids are forced to pass through a system of micro-channels arranged in a number of geometries in such a way that the dragging force exerted by the fluids when moving in the system and contact to each other causes the breaking down of the droplets. The operating principle of these equipments is based on shear stresses developed when the streams get into contact at high velocities. In all geometries of micro-channel devices depicted in Fig. 2, the relationship between radiuses of conducts for different fluids subjected to processing are, besides working pressure, key factors for obtaining good quality nanoemulsions with the desired size distribution. T-Junction geometry is usually applied for oil in water O/W emulsions, whereas cross and concentric junction arrangements are used for a wider range of needs such as preparation of water–oil–water or oil–water–oil emulsions and also to avoid coalescence of droplets and production of non-spherical particles.

Kawakatsu et al. [62], who developed this procedure, found that the size of produced droplets was related to the

Food Eng. Rev.

Table 1 Examples of different methods of nanoemulsification in food-related areas

Method	Studied system	Reference
Phase inversion composition	Meyhod used to prepare O/W nanoemulsions in the W/oleylammonium chloride-oleylamine-C12E10/hexadecane ionic system, where the oleylammonium acted as a cationic surfactant. Nanoemulsions were prepared by continuous addition of HCl watery solutions to the mixtures formed by hexadecane, oleylamine, and C12E10 or by progressive addition of potassium hydroxide watery solutions to hexadecane-oleic acid-C12E10 mixtures. Progressively the pH decreased, resulting in a progressive ionization of the oleylamine. Likewise, the oleic acid was gradually ionized when an increase in pH is produced by the addition of KOH. The preparation conditions were maintained constant at a stirring rate of 750 rpm and an addition rate of 1.6 mL/min	[47]
High pressure homogenization	Oil-in-water (O/W) emulsions were prepared using β -carotene as the dispersed phase and Milli-Q water as the continuous phase. The premix was homogenized using a high-speed homogenizer at 5,000 rpm for 10 min to form a coarse emulsion, followed by a two-stage high pressure homogenization. Temperature and pressure, β -carotene concentration, the quadrics of emulsifier concentration and the interactions between β -carotene and emulsifier concentrations and between homogenization temperature and emulsifier concentration $p < 0.05$ had a significant effect on the stability of the emulsions	[48]
Ultrasonic	Nanoemulsion was prepared from a lipid mixture composed of 40 mg cholesteryl oleate, 20 mg egg phosphatidylcholine, 1 mg triolein, and 0.5 mg cholesterol	[49]
	Emulsification of lipids by prolonged ultrasonic irradiation in aqueous media and the procedure of two-step ultracentrifugation of the crude emulsion with density adjustment by addition of KBr to obtain the nanoemulsion	[50] [51] [52]
	The authors investigated the preparation of O/W nanoemulsion containing surfactants and oleoresin capsicum(OC) in four component systems, O/W nanoemulsions of OC could be prepared by the ultrasonication process at the ration of mixture of OC:Tween 80(1:0.7) and by self-assembly method at the ratio of mixture of OC:Tween 80(1:3) with a particle size of 20–100 nm and having a good stability during storage	
	Multibond metal alkoxides and ultrasonic pretreatment were used to produce nanoemulsions with large interfacial area which had the potential to be easily separated. The micelle size was observed to be as low as 5.1 nm. Viscosity and apparent vapor pressure reduction were also observed. The alcohol/soybean oil molar ratio was a main factor for apparent vapor pressure reduction	
Microfluidization	In this work, the authors created remarkably small transparent O/W nanoemulsions with average diameters as low as 40 nm from sunflower oil. This was possible using ultrasound or high shear homogenization and a surfactant/co-surfactant/oil system that is well optimized. The minimum droplet size was obtained when both droplet deformability (surfactant design) and the applied shear (equipment geometry) were optimal. Oil stability was unaffected by the sonication process	
	Pre-emulsions were prepared by dissolving sodium dodecylsulphate, (0–5.6 wt%) and polyethylene glycol (0–18.9 wt%) in distilled deionized water and then adding the oil (15 vol%) using mixer Emulsions were prepared using a Microfluidics M-110Y Microfluidizer TM by subjecting pre-emulsions to five passes at 1,000 bar, which was the maximum practical limit with the air supply of the Microfluidizer. Examination of the Ostwald ripening of mixed oil nanoemulsions found that the entropy gain associated with oil demixing provided a thermodynamic barrier to Ostwald ripening	[53] [54]
	The authors prepared nanoemulsion with a MicroFluidizer Processor [®] -containing delta, alpha, and gamma tocopherol, these nanoemulsions have enhanced anti-inflammatory properties and increased bioavailability, with gamma tocopherol, in particular compared to their suspensions	

geometry of the channel but independent of the flow. Micro-channels can be found on different sizes with various geometries. Microfluidics devices deal with small amounts of fluids and have the potential to significantly change the way of processing dispersed food systems [63].

Nanoencapsulation Procedures

Polymerization

Polymerization of miniemulsions causes the encapsulation by separation of phases during the process. Amphiphilic

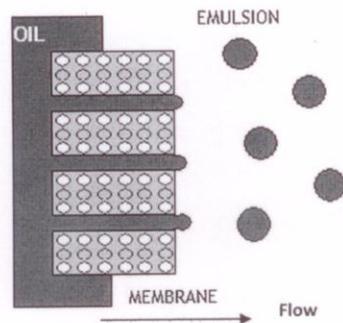


Fig. 1 Cross flow membrane emulsification

oligomers are used as surfactant agents to prepare the miniemulsion (oil particles from 50 to 500 nm dispersed in water). Due to the properties of amphiphilic oligomers, the molecules can auto assembly in the water/oil interface through ultrasonication. To form these products, a water-soluble initiator such as potassium persulfate may also be added, and from the mixture, the water-soluble radicals will emerge. After several additions of monomers, oligo-radicals begin to be active on the surface and are captured by mini packets of oil, causing that the active radicals of the surface link to the interface of those mini packets and water. Polymerization is carried out on the interface where the chains of the polymer gradually grow, allowing the formation of the core. Important factors during this process are the hydrophobicity and the structure of the oligomers which also have an influence on the morphology of the nanocapsules [64]. Ren et al. [65] prepared liquid-core nanocapsules by cross linking an amphiphilic copolymer at an oil-water interface. The hydrophilic copolymer poly[(ethylene oxide)-*co*-glycidol] was first obtained by anionic polymerization of ethylene oxide and ethoxyethyl

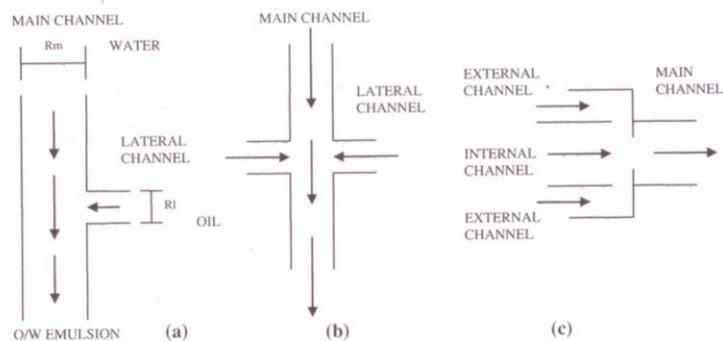
glycidyl ether, then the hydroxyl groups on the backbone were recovered after hydrolysis and partially modified by hydrophobic conjugated linoleic acid. The copolymer with multiple linoleate pendants was absorbed at an oil-water interface and then cross linked to form stable nanocapsules. The mean diameter of the nanocapsule was below 350 nm, and the particle size could be adjusted by manipulating the emulsification conditions. It was found that the nanocapsules were stable in water for at least 5 months.

Another work highlighting several advantages of polymerization was carried out by Liang et al. [66] who investigated whether the entrapment of peptides within poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles could be increased by functionalizing the peptide, so that it could copolymerize with the alkyl cyanoacrylate monomer; nanoparticles were prepared using both an aqueous micellar and a water-in-oil micro-emulsion polymerization template. Using the micellar template, nanoparticles could not be produced in the presence of acryloyl peptide, and rather, an agglomerated mass was formed on the stirrer. In contrast, nanoparticles could be prepared using both acryloyl and parent peptide using the water-in-oil micro-emulsion template. Encapsulation efficiency was more than twofold greater for the functionalized peptide.

Assembling Using Layer by Layer Techniques

By using layer-by-layer (LBL) techniques, it is possible to manufacture nano-scale films achieving a precise control of their thickness and uniformity [67]. LBL is based on adsorption of opposite-charged polyelectrolytes contained in a solution with a solid substrate having a charged surface [67–72]. Interactions among layers are affected by the pH and ionic strength of the system [73, 74]. In food areas, this technique has a wide range of applications such as the development of new edible coatings with improved functionality for fresh and minimally processed fruits as well as

Fig. 2 Channel arrangements in microfluidics devices.
 a T-junction b Cross junction
 c Concentric junction



Food Eng. Rev.

for the protection of aromatic compounds from those fruits [74].

In other works, this technique was applied as strategy to fabricate the nano-multilayer wall for micro and submicrocapsules by the LBL of polyelectrolytes, particularly polymers such as chitosan (CHI) and alginate (ALG) for drug-controlled release. By means of the LBL technique, immobilized enzymes of urease and superoxide dismutase on polystyrene nanoparticles presented a decrease in enzyme bioactivity but an increase in their storage stability. LBL self-assembly of CHI and ALG was used directly on indomethacin (IDM) microcrystals to reduce the releasing rates. The LBL multilayers have been used to encapsulate the drug-loading microparticles made from solvent evaporation or adsorption using porous CaCO_3 microparticles to enhance the loading capacity and suppress the initial burst. Increasing the number of layers, raising the deposition temperature, and cross linking of the neighboring layers slowed down the enzymatic desorption of polyelectrolyte multilayer films and the releasing rate of encapsulated drug [75].

Liposomes

Liposomes trapped in water-soluble compounds have been used in pharmacology and cosmetology. The encapsulation of antimicrobials in liposomes helps preserving their effectiveness and stability in various applications [13]. Principles involved in the formation of liposomes are those based on hydrophobic/hydrophilic interactions between lipid/lipid and lipid/water. The added energy (ultrasonication, homogenization, agitation, or heat) generates settlement of lipids in the form of bicapillary vesicles to attain thermodynamic equilibrium in the aqueous phase [76] as shown Fig. 3.

The capacity of liposomal carriers to encapsulate antimicrobial compounds depends on the interaction between the liposome membrane and the membrane of the bacteria.

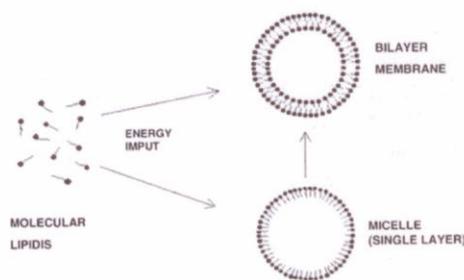


Fig. 3 Forming a liposome membrane (bi and single layer arrangements)

It has been observed that addition of positively charged nisin to a phospholipid anion such as diglycerol phosphate generates electrostatic interactions causing neutral liposomes to group together, thus generating hydrophobic interactions [77]. In another work, nanoliposomes were prepared from different lipids (Phospholipon 90H, Phospholipon 100H, dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), stearylamine (SA), dicetyl phosphate (DCP), and cholesterol) and were tested for their capacity to encapsulate nisin Z and target bacteria (*Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*). Nisin was entrapped in different nanoliposomes with encapsulation efficiencies (EE) ranging from 12 to 54%. Anionic vesicles possessed the highest EE for nisin, while increasing the cholesterol content in the lipid membranes up to 20% molar ratio resulted in a reduction in EE. Stability of nanoliposome-encapsulated nisin was demonstrated for at least 14 months at 4 °C (DPPC:DCP:CHOL vesicles) and for 12 months at 25 °C (DPPC:SA:CHOL vesicles) [78].

Other works such as those by Xia et al. [79] showed the effectiveness of food-related compounds to elaborating nanoliposomes. Coenzyme Q10 (CoQ10) was incorporated into nanoliposomes composed of egg yolk phospholipid, cholesterol, and Tween 80, and the influence of CoQ10 on the nanoliposomal structure was investigated. CoQ10 incorporation can suppress the increase in the z-average diameter of nanoliposomes during storage for 8 months at 4 °C. The liposomal lipid peroxidation caused by Fe(III)/ascorbate was also significantly inhibited. Fluorescence probe studies indicated that CoQ10 incorporation increases microviscosity of the nanoliposomes. Results suggested that CoQ10 might intercalate between lipid molecules and perturb the bilayer structure.

Dialysis

In this process, the core compound is added to the copolymer into an organic solvent. After repeated dialysis procedures against water, encapsulation is achieved [80]. Nanoparticles formed by using amphiphilic copolymers have been used as carriers of hydrophobic compounds [12] which form a shell that serves as a carrier of lipophilic drugs and stabilizes particles in aqueous dispersions, thus improving the kinetic stability of the capsules over those obtained by other methodologies [37]. Final product may be subjected to dehydration to stabilize capsules [81, 82]. There are not many application of dialysis in the nanofoods field, however, fundamentals of this methodology can be applied to situations such as those described by Min et al. [83] who prepared by chemical conjugation, hydrophobically modified glycol chitosan (HGC) nanoparticles containing water insoluble camptothecin (CPT). Insoluble anticancer drug, CPT, was easily encapsulated into HGC

nanoparticles by a dialysis method, and the drug-loading efficiency was above 80%. CPT-encapsulated HGC (CPT-HGC) nanoparticles formed nano-sized self-aggregates in aqueous media (280–330 nm in diameter) and showed sustained release of CPT for 1 week.

Proposal of a Classification and Characterization of Nanocapsules

The properties and appearance of nanocapsules depend, by far, on their size and on the size of particles forming the core. Particles called nanocapsules are those having a nano-size diameter, a micro porous structure or nano-sized core compounds, and combination of them as proposed in Fig. 4. The characterization of these materials includes the evaluation of their shape, texture, and appearance.

In the case of nanocapsules obtained by spray drying, it is important to characterize not only the nanoemulsion but also, the final dehydrated product. It is important to specify that it is not possible to assure that the final powder will have a similar distribution of sizes than the emulsion feed to the spray drier. Pre-emulsification, emulsification, and atomization in the drier may induce several phenomena including breakage or coalescence of particles [84].

There are various tools used to evaluate the particle size of nanoemulsions and nanopowders. The most commonly reported is the dynamic light scattering technique (DLS) which measures the Brownian motion of particles [85]. The smaller the particles, the faster will move; speed of motion is called translational diffusion coefficient (D) which is related to the radius of particle and obtained by means of the Stokes–Einstein equation as illustrated in Fig. 5.

The Zeta potential measures the overall charge a particle acquires in a specific medium giving an indication of the stability of a system. If particles have a large Zeta potential

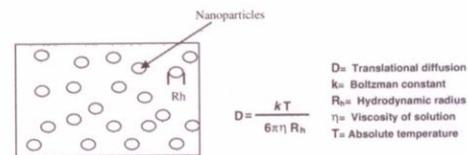


Fig. 5 Hydrodynamic radius and Stokes–Einstein equation

(negative or positive), they will repel each other, this means a higher stability than a neutral particles charge. The Zeta potential is a measure of the net charge, and there may be significant charge heterogeneities that can lead to aggregation, even though, the net Zeta potential suggests otherwise [86]. Gèze et al. [87] conducted pioneer works on characterization of nanoparticles by DLS, cryo-transmission electron microscopy, and Zeta potential within the food field. In their work, amphiphilic β -cyclodextrins (β CDa) were synthesized by statistically grafting hexanoyl carbon chains. The obtained derivative was used to prepare submicronic colloidal nanosphere suspensions using a nano-precipitation method. The fresh suspensions contained particles with diameters ranging from 60 to 100 nm. The long-term stability of the aqueous nano-dispersions was investigated. An unexpected good physical stability of the suspensions after 3-year storage at room temperature was observed. This behavior appears to be related to the small size and structural organization of the nanoparticles. The mean diameters determined from light scattering experiments were consistent with those measured from electron micrographs.

Different types of microscopes such as optic, confocal [88], transmission electronic [31], scanning electron (SEM), high-resolution transmission electron (HRETM), and atomic force (AFM) [40] have been used for the characterization of nanoparticles. Spectroscopic techniques

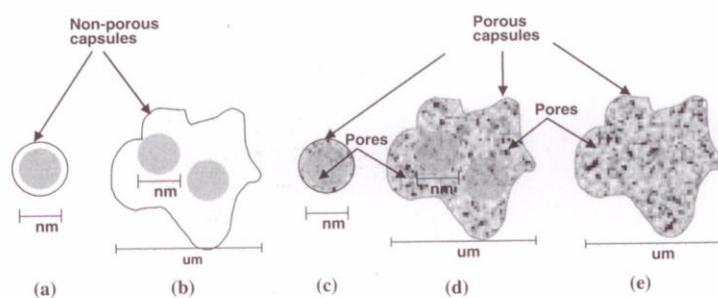


Fig. 4 Proposal of different nanostructuring patterns in capsules. **a** Non-porous nanocapsule containing a nano-sized core; **b** Non-porous microcapsule containing nano-sized cores; **c** Porous nanocapsule

containing a nano-sized core; **d** Nanoporous microcapsule containing nano-sized cores; **e** Porous microcapsule with nanopores

Food Eng. Rev.

coupled to SEM provide chemical composition by applying high angle annular dark field imaging (HAADF) and energy dispersive X-ray spectroscopy (XRD). Besides these high spatial resolution techniques, the use of X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) may provide a coarse but sensitive view of the surface of particles. Some of the advantages of optical microscopes over the electronic ones are that the latter cannot see the actual features of the sample, since they deliver a generated image by electronic interactions between sample and electrons. Moreover, when using electronic vision systems, sample is more prone to be disrupted [89, 90]. A non-destructive microscopic technique with potential use in nanofoods-related areas is the environmental scanning electron microscope (ESEM); by using ESEM, it is possible to acquire images involving a minimum of manipulation of the objects in such a way that the presence of artifacts is minimized [91].

Freeze-fracture transmission electron microscopy was used to investigate the morphology of small unilamellar vesicles with a diameter of approximately 100 nm [92]. In this work, three different lecithins (SLP-WHITE, SLP-PC70 from Tsuji Oil Mill Co. Ltda Japan and PL30S from QP Co. Ltda Japan) were used for preparing liposomes. Also, their physicochemical properties were examined by using a confocal laser scanning microscopy (CLSM) and by measurements of trapping efficiency. CLSM observation showed that the particle size of liposomes prepared from SLP-WHITE was significantly smaller than those from other lecithins. In addition, liposomal solution prepared from SLP-WHITE remained well dispersed for at least 30 days, while two other liposomal solutions showed a phase separation due to aggregation and/or fusion of liposomes. SLP-WHITE liposomes were then prepared by using a homogenizer and a microfluidizer, aiming at improving the efficiency of preparation and the liposome stability.

Recently, Zabar et al. [93] studied amylase as vehicle for the nanoencapsulation of unsaturated fatty acids. Authors used three different structural strata of V-amylose, and nanostructures were examined by using XRD, DLS, nuclear magnetic resonance (NMR) as well as small angle x-ray scattering (SAXS). Using these methods, it was noted that decreased degree of fatty acid unsaturation induces the formation of organized and well-defined structures. SEM observations showed that structural trends extended even into the microscopic level. This study also showed that increased fatty acid unsaturation impairs structuration of amylase inclusion complexes.

Despite being able to observe and characterize samples obtained by different procedures, it is still difficult to identify the actual location of the different components of the nanoparticles. Possible interactions between core and wall materials are still difficult to evaluate [88]. Wall

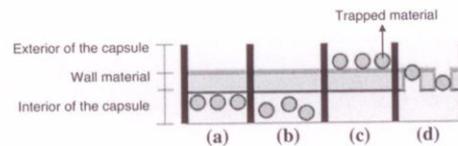


Fig. 6 Possible (a, b, c, d) locations of trapped material in capsules

materials can act just as containers or may interact with core substances either holding them into the capsule or fixing them on their surface and even imbibing them as shown in Fig. 6. Confocal microscopy which delivers optical planes of the observed object may allow studying three-dimensional wall-core arrangements, and therefore the spatial location of their components.

Perspectives and Trends

Nanoencapsulation is a process that has been developed within the pharmaceutical field, and that has been applied on food-related fields for production of nanofoods and related products. There are, however, a number of issues that will have to be looked after for such application to become widely accessible by industry and consumers. Regulatory issues on nanofoods are still being developed, and it is expected that national bodies will increase initiatives to control, administrate, and promote proper development of nano-sized food-related products. Complex phenomena involved in nanotechnology and nanoengineering are related to interactions among different phases encountered in procedures in which, difficulties on solving turbulent-turbulent, laminar-turbulent multiphase interactions play key roles toward the developing of robust knowledge-base for designing pieces of equipments, processes, and products. Different disciplines and techniques are having increased and important roles in food nanotechnology such as advanced non-linear dynamics, solid state physics, biotechnology, computer vision systems together with novel interpretations of traditional concepts such as interfaces and product architecture. Also, the multiplicity of interactions among compounds frequently found in nanotechnology applications at molecular and atomic levels must be extensively and intensively studied with techniques that, in several cases, are still in the process of being developed, and that must be officially accepted by regulatory bodies. The main issues related to commercialization of nanoencapsulated composites are those derived from the evaluation of the practical use of nano-foods, including the appraisal of the advantages of the usage of these products against traditional ones of the same composition and bigger size.

Conclusion

Nanoencapsulation provides final product functionality (including controlled release of the core) which is expected to be maintained during storage. As far as production is concerned, stages of the process are important and determine structuring of the capsule. Trends in nanocapsule and nanoemulsion construction are related to manufacture, observation, and measurement of capsules as well as to the evaluation of the distribution of the size of the particle and interaction of wall and core materials and control of coalescence. It is expected that food engineering practice will make important profit of nanoencapsulated products in the near future given enhanced functional properties and stability. Diffusion of active compounds through the capsule has not been well understood and is, nowadays, a subject of major attention given the scale (nano) at which core substances migrate and interact with other components of the product. It is important to highlight that research and development on preparation of nanocapsules will include results of recent investigations on processes and equipments as well as on characterization techniques and will consider continuing adapting a number of tools from fields such as the medical, pharmaceutical and from physical, engineering, and chemical sciences.

References

- INN National Nanotechnology Initiative (2007) USA <http://www.nano.gov>. Accessed 12 Apr 2009
- Marotti R (2007) Physic Group of the solid state. Physics Institute, Engineering Faculty, Universidad de la República 1-8
- Uskokovic V (2007) Nanotechnologies: What we do not know? *Technol Soc* 29:43-61
- Elder A, Oberdorster G (2005) Translocation and Effects of Ultrafine Particles Outside of the Lung. *Clin Occup Env Med* 5(4):785-796
- ElAmin A (2006) USA <http://www.foodproductiondailyusa.com/news/ng.asp?id61973>. Accessed 29 Mar 2009
- OilFresh (2005) California, USA <http://www.oilfresh.com/of1000.html>. Accessed 13 Jun 2009
- Graveland-Bikkera JF, De Kruijff CG (2006) Unique milk protein based nanotubes: Food and nanotechnology meet. *Trends Food Sci Technol* 17:196-203
- Sherman LM (2005) New York, USA <http://www.ptonline.com/articles/200411fa2.html>. Accessed 12 Apr 2009
- Fletcher A (2006) USA <http://www.foodproductiondaily.com>. Accessed 27 Mar 2009
- Sozer N, Kokini J (2009) Nanotechnology and its applications in the food sector. *Trends in biotechnol* 27(2):82-89
- Chi-Fai C, Shiu-Huei W, Gow-Chin Y (2007) The development of regulations for food nanotechnology. *Trends Food Sci Technol* 18(5):269-280
- Liu TY, Chen SY, Liu DM, Liou SC (2005) On the study of BSA-loaded calcium-deficient hydroxyapatite nano-carriers for controlled drug delivery. *J Controll Release* 107(1):112-121
- Were ML, Bruce B, Davidson M, Weiss J (2003) Size, stability, and entrapment efficiency of phospholipid nanocapsules containing polypeptide antimicrobials. *J Agric Food Chem* 51:8073-8079
- IFST, Institute of Food Science and Technology (2006) <http://www.ifst.org/uploadedfiles/cms/store/ATTACHMENTS/Nanotechnology.pdf>. Accessed 2 Apr 2009
- Nel A, Xia T, Mädler L, Li N (2006) Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311(5761):622-627
- Hoet PHM, Brüske-Hohlfeld JJ, Salata OV (2004) Nanoparticles—known and unknown health risks. *J Nanobiotechnol*. doi: 10.1186/1477-3155-2-12
- Chaudhry Q, Scotter M, Blackburn J, Ross B, Boxall A, Castle L, Aitken R, Watkins R (2008) Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. *Food Addit Contam*. doi: 10.1080/02652030701744538
- Flores-Andrade E, Beristain CI, Vernon-Carter E, Gutiérrez G, Azuara E (2009) Enthalpy-entropy compensation and water transfer mechanism in osmotically dehydrated agar gel. *Drying Tech*. doi: 10.1080/07373930902904921
- Wulff-Pérez M, Torcello-Gómez A, Gálvez-Ruiz MJ, Martín-Rodríguez A (2009) Stability of emulsions for parenteral feeding: preparation and characterization of o/w nanoemulsions with natural oils and Pluronic f68 as surfactant. *Food Hydrocoll* 24(4):1096-1102
- López A, Gavara R, Lagaron J (2006) Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through biomaterials. *Trends Food Sci Technol* 17:567-575
- Jiménez M, García HS, Beristain CI (2004) Spray-drying microencapsulation and oxidative stability of conjugated linoleic acid. *Eur Food Res Technol* 219:588-592
- Li Y, Jiang H, Zhu K (2008) Encapsulation and controlled release of lysozyme from electrospun poly(ϵ -caprolactone)/poly(ethylene glycol) non-woven membranes by formation of lysozyme-oleate complexes. *J Mater Sci: Mater Med* 19:827-832
- Niu X, Feng Q, Wang M, Guo X, Zheng Q (2009) Porous nano-HA/collagen/PLLA scaffold containing chitosan microspheres for controlled delivery of synthetic peptide derived from BMP-2. *J Controll Release* 134(2):111-117
- Zimet P, Livney D (2009) Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for ω -3 polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocoll* 23:1120-1126
- Semo E, Kesselman E, Danino D, Livney YD (2007) Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals. *Food Hydrocoll* 21:936-942
- Preetz C, Rube A, Reiche I, Hause G, Mäder K (2008) Preparation and characterization of biocompatible oil-loaded polyelectrolyte nanocapsules. *Nanomed: Nanotechnol, Biol, Med* 4:106-114
- Drusch S, Berg S (2008) Extractable oil in microcapsules prepared by spray-drying: localisation, determination and impact on oxidative stability. *Food Chem* 109:17-24
- Zeller B, Saleeb F (1996) Production of microporous sugars for adsorption of volatile flavors. *J Food Sci* 61:749-752
- Akagi T, Baba M, Akashi M (2007) Preparation of nanoparticles by the self-organization of polymers consisting of hydrophobic and hydrophilic segments: potential applications. *Polymer* 48:6729-6747
- Jafari SM, He Y, Bhandari B (2007) Optimization of nano-emulsions production by microfluidization. *Eur Food Res Technol*. doi: 10.1007/s00217-006-0476-9
- Jafari SM, Assadpoor E, Bhandari B, He Y (2008) Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying. *Food Res Int* 41:172-183
- Luo Y, Gu H (2007) Nanoencapsulation via interfacially confined reversible addition fragmentation transfer (RAFT) miniemulsion polymerization. *Polymer* 48:3262-3272

33. Luo Y, Zhou X (2004) Nanoencapsulation of a hydrophobic compound by a miniemulsion polymerization process. *J Polym Sci* 42:2145–2154
34. Moinard-Chécot D, Chevalier Y, Briançon S, Beney L, Fessi H (2008) Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion-diffusion process. *J Colloid Interface Sci* 317:458–468
35. Takashima Y, Saito R, Nakajima A, Oda M, Kimura A, Kanazawa T, Okada H (2007) Spray-drying preparation of microparticles containing cationic PLGA nanospheres as gene carriers for avoiding aggregation of nanospheres. *Int J Pharm* 343:262–269
36. [36] Yáñez J, Salazar J, Chaires L, Jiménez J, Márquez M, Ramos E (2003) Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. XXX Aniversario de Biotecnología y Bioingeniería: 1–7
37. Li W, Szoka F (2007) Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery. *Pharm Res* 24:1–12
38. Castellanos JJ, Al-Azzam W, Criebeben K (2005) Effect of the covalent modification with poly(ethylene glycol) on α -chymotrypsin stability upon encapsulation in poly(lactic-co-glycolic) microspheres. *J Pharm Sci* 94(2):327–340
39. Fogliano V, Vitaglione P (2005) Functional foods: planning and development. *Mol Nut Food Res* 49(3):327–340
40. Oliva M, Díez-Pérez I, Lastra C, Oliva I, Caramella C, Marin E (2003) Self-assembly of drug-polymer complexes: a spontaneous nanoencapsulation process monitored by atomic force microscopy. *J Pharm Sci* 92:1
41. Gref R, Rodrigues J, Couvreur P (2002) Polysaccharides grafted with polyesters: novel amphiphilic copolymers for biomedical applications. *Macromol* 35:9861–9867
42. Nichifor M, Lopes A, Carпов A, Melo E (1999) Aggregation in water of dextran hydrophobically modified with bile acids. *Macromol* 32:7078–7085
43. Windhab EJ, Dressler M, Feigl K, Fischer P, Megias-Alguacil D (2005) Emulsion processing—from single-drop deformation to design of complex processes and products. *Chem Eng Sci* 60:210–2113
44. Izquierdo P, Esquena J, Tadros TF, Dederen JC, Feng J, Garcia-Celma MJ, Azemar N, Solans C (2002) Phase behavior and nanoemulsion formation by the phase inversion temperature method. *Langmuir* 18:26–30
45. Tadros T, Izquierdo P, Esquena J, Solans C (2004) Formation and stability of nano-emulsions. *Adv Colloid Interface Sci* 108:303–318
46. Boom R (2008) Food materials science, principles and practice. In: Aguilera J (ed) *Emulsions: principles and preparation*, 1st edn. Helistong, UK, pp 305–339
47. Maestro A, Solé I, González C, Solans C, Gutiérrez JM (2008) Influence of the phase behavior on the properties of ionic nanoemulsions prepared by the phase inversion composition method. *J Coll Interface Sci* 327:433–439
48. Yuan Y, Gao Y, Zhao J, Mao L (2008) Characterization and stability evaluation of β -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. *Food Res Int* 41(1):61–68
49. Pires A, Hegg R, Valduga CJ, Graziani SR, Rodrigues DG, Maranhão RC (2009) Use of cholesterol-rich nanoparticles that bind to lipoprotein receptors as a vehicle to paclitaxel in the treatment of breast cancer: pharmacokinetics, tumor uptake and a pilot clinical study. *Cancer Chemother Pharmacol* 63:281–287
50. Choi AJ, Kim CJ (2008) Technic proceedings of the 2008 NSTI nanotechnol conference and trade show, NSTI-Nanotech. *Nanotechnology* 1:416–419
51. Ye X, Fernando S (2007) Tuning catalyst and process for biodiesel production by means of emulsion and ultrasonic pretreatment. *Chem Eng Technol* 30(11):1481–1487
52. Leong TSH, Wooster TJ, Kentish SE, Ashokkumar M (2009) Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. *Ultrason Sonochem* 16(6):721–727
53. Wooster TJ, Golding M, Sanguansri P (2008) Impact of oil type on nanoemulsion formation and ostwald ripening stability. *Langmuir* 24(22):12758–12765
54. Kuo F, Subramanian B, Kotyla T, Wilson TA, Yoganathan S, Nicols RJ (2008) Nanoemulsions of an anti-oxidant synergy formulation containing gamma tocopherol have enhanced bioavailability and anti-inflammatory properties. *Int J Pharm* 363(1–2):206–213
55. Koupantsis T, Kiosseoglou V (2009) Whey protein-carboxymethylcellulose interaction in solution and in oil-in-water emulsion systems. Effect on emulsion stability. *Food Colloid* 23:1156–1163
56. López A, Chemtob A, Milton JL, Manea M, Paulis M, Barandiaran MJ, Theisinger S, Asua JM (2008) miniemulsification of monomer-resin hybrid systems. *Ind Eng Chem Res*. doi: 10.1021/ie701768z
57. Lee S, Lefèvre T, Subirade M, Paquin P (2009) Effects of ultrahigh pressure homogenization on the properties and structure of interfacial protein layer in whey protein-stabilized emulsion. *Food Chem* 113:191–198
58. Wagner C, Yan L, Wittemann A (2008) Preparation of submicrometer-sized clusters from polymer spheres using ultrasonication. *Langmuir*. doi: 10.1021/la802580k
59. Geerken M, Lammertink R, Wessling M (2007) Interfacial aspects of water drop formation at micro-engineered orifices. *J Colloid Interface Sci* 312:460–471
60. De Luca G, Di Maio F, Di Renzo A, Drioli E (2008) Droplet detachment in cross-flow membrane emulsification: comparison among torque- and force-based models. *Chem Eng Process* 47:1150–1158
61. Charcosset C (2009) Preparation of emulsions and particles by membrane emulsification for the food processing industry. *J Food Eng* 92:241–249
62. Kawakatsu T, Trägårdh G, Trägårdh C (2001) Production of W/O/W emulsions and S/O/W pectin microcapsules by microchannel emulsification. *Colloid Surf A* 189:257–264
63. Skurtys O, Aguilera JM (2008) Applications of microfluidic devices in food engineering. *Food Biophys* 3(1):1810–1817
64. Hu SH, Liu TY, Liu KH, Liu DM, Chen SY (2007) Nano-ferrospoons for controlled drug release. *J Control Release* 121(3):181–189
65. Ren Y, Wang G, Huang J (2007) Preparation of liquid-core nanocapsules from poly[(ethylene oxide-co-glycidol)] with multiple hydrophobic linoleates at an oil-water interface and its encapsulation of Pyrene. *Biomacromol* 8(6):1873–1880
66. Liang M, Davies N, Toth I (2008) Increasing entrapment of peptides within poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles prepared from water-in-oil microemulsions by copolymerization. *Int J Pharm* 362(1–2):141–146
67. Varahramyan K, Lvov Y (2007) Louisiana Tech University http://www.isnm2005.org/_metacanvas/attach_handler.uhtml?attach_id=251&content_type=application/pdf&filename=Paper%2013.pdf. Accessed 2 Apr 2009
68. Cai K, Rechtenbach A, Hao J, Bossert J, Jandt KD (2005) Polysaccharide-protein surface modification of titanium via a layer-by-layer technique: characterization and cell behaviour aspects. *Biomater* 26:5960–5971
69. Krol S, Del Guerra S, Grupillo M, Diaspro A, Gliozzi A, Marchetti P (2006) Multilayer nanoencapsulation. New approach for immune protection of human pancreatic islets. *Nano Lett* 6:1933–1939

70. Serizawa T, Iida K, Matsuno H, Kurita K (2006) Prolonged degradation of end-capped polyelectrolyte multilayer films. *Polym Bulletin* 57:407–413
71. Sui Z (2004) USA, Florida State University <http://etd.lib.fsu.edu/theses/available/etd-07072004-171316/>. Accessed 2 Apr 2009
72. Weiss J, Takhistov P, McClements J (2006) Functional materials in food nanotechnology. *J Food Sci* 71:107–116
73. McClements D (2006) Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. *Biotechnol Adv* 24:621–625
74. Vargas M, Pastor C, Chiralt A, McClements DJ, González-Martínez C (2008) Recent advances in edible coatings for fresh and minimally processed fruits. *Crit Rev Food Sci Nutr* 48(6): 496–511
75. Wang C, Ye S, Sun Q, He C, Ye W, Liu X, Tong Z (2008) Microcapsules for controlled release fabricated via layer-by-layer self-assembly of polyelectrolytes. *J Exp Nanosci* 3(2):133–145
76. Mozafari-Reza M (2005) Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *Cell Mol Biol Lett* 10:711–719
77. Mozafari R (2006) Recent trends in the lipid based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. *J Sci Food Agric* 86:154–160
78. Colas JC, Shi W, Rao VSNM, Omri A, Mozafari MR, Singh H (2007) Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. *Micron* 38(8):841–847
79. Xia S, Xu S, Zhang X, Zhong F (2007) Effect of coenzyme Q10 incorporation on the characteristics of nanoliposomes. *J Phys Chem B* 111(9):2200–2207
80. Adams M, Lavasanifar A, Kwon G (2003) Amphiphilic block copolymers for drug delivery. *J Pharm Sci* 92:1343–1355
81. Hornig S, Heinze T (2007) Nanoscale structures of dextran esters. *Carbohydr Polym* 68:280–286
82. Xie J, Wang C (2005) Self-assembled biodegradable nanoparticles developed by direct dialysis for the delivery of paclitaxel. *Pharm Res* 22(12):2079–2090
83. Min K, Park K, Kim YS, Bae SM, Lee S, Jo HG, Park RW, Kwon IC (2008) Hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles-encapsulated camptothecin enhance the drug stability and tumor targeting in cancer therapy. *J Control Release* 127(3): 208–218
84. Murray B, Dickinson B, Wang Y (2009) Bubble stability in the presence of oil-in-water emulsion droplets: Influence of surface shear versus dilatational rheology. *Food Hydrocoll* 23:1198–1207
85. Kaszuba M, Mc Knight DL, Connah MT, McNeil-Watson FK, Nobbmann U (2008) Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering. *J Nanopart Res* 10:823–829
86. Tiede K, Boxall A, Tear SP, Lewis J, David H, Hasselov M (2008) Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment. *Food Addit Contam Part A* 25(7):795–821
87. Gêze A, Putaux J-L, Choïnard L, Jéhan P, Woussidjewe D (2004) Long-term shelf stability of amphiphilic β -cyclodextrin nanosphere suspensions monitored by dynamic light scattering and cryo-transmission electron microscopy. *J Microencapsul* 21(6):607–613
88. Goya GF, Marcos-Campos I, Fernández-Pacheco R, Sáez B, Godino J, Asín L, Lambea J, Tres A (2008) Dendritic cell uptake of iron-based magnetic nanoparticles. *Cell Biol Int* 32:1001–1005
89. Fery A, Weinkamer R (2007) Mechanical properties of micro- and nanocapsules: single-capsule measurements. *Polymer* 48: 7221–7235
90. Zhao R, Sun J, Torley P, Wang D, Niu S (2008) Measurement of particle diameter of *Lactobacillus acidophilus* microcapsule by spray drying and analysis on its microstructure. *World J Microbiol Biotechnol* 24:1349–1354
91. Grande C, Torres F, Gomez CM, Troncoso OP, Canet-Ferrer J, Martínez-Pastor J (2009) Development of self-assembled bacterial cellulose-starch nanocomposites. *Mater Sci Eng* 29(4):1098–1104
92. Takahashi M, Inafuku K, Miyagi T, Oku H, Wada K, Imura T, Kitamoto D (2006) Efficient preparation of liposomes encapsulating food materials using lecithins by a mechanochemical method. *J Oleo Sci* 56(1):35–42
93. Zabar S, Lesmes U, Katz I, Shimoni E, Bianco-Peled H (2009) Studying different dimensions of amylose-long chain fatty acid complexes: molecular, nano and micro level characteristics. *Food Hydrocoll* 23(7):1918–1925

Revista Mexicana de Ingeniería Química

Publicación de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química, A. C. Depto. de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Izapaalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, 09340 Mexico, D. F. Tel. 5844648 al 51. FAX 58 044900. E-mail: amiq@xanum.uam.mx

Editores en Jefe:

Dr. J. Alberto Ochoa Tapia

Dr. E. Jaime Vernon Carter

Dr. Tomás Viveros García

Responder a:

Dr. Tomás Viveros García

E-mail: tvig@xanum.uam.mx;

amidiq@xanum.uam.mx

Dr. Gustavo F.

Gutiérrez López

México, D. F., a 14 de Junio de 2011

e-mail: gasfgl@gmail.com

Manuscrito No. RMIQ-050611

Estimado(a) Dr. Gutiérrez López

Le informo que la *Revista Mexicana de Ingeniería Química* ha aceptado su artículo

Título del Trabajo: **CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA DE CÁPSULAS DE ALFA-TOCOFEROL OBTENIDAS POR SECADO POR ASPERSIÓN.**

Autores: **H. Carrillo-Navas, D. A. González-Rodea, J. Cruz-Olivares, J.F. Barrera-Pichardo, Aparicio A. R. and Gutiérrez-López G. F*, Quintanilla-Carvajal M. X., Meraz-Torres L. S.,**

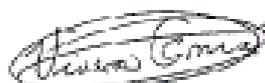
para su publicación.

En breve le haremos llegar las galeras correspondientes para su revisión.

Agradezco su participación y colaboración y hacemos una extensa invitación para que sometan futuros manuscritos a la RMIQ.

Sin más por el momento me despido de usted.

Atentamente:



Dr. Tomás Viveros García

Editor de RMIQ

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección del **Dr. Gustavo Fidel Gutiérrez López** y del **Dr. Antonio Ruperto Jiménez Aparicio**, en el Laboratorio de Ingeniería de Alimentos de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, del Departamento de Ingeniería Bioquímica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, en la Ciudad de México.

Al **Instituto Politécnico Nacional** por parte de la **Secretaría de Posgrado e Investigación (SIP)** por el apoyo financiero otorgado para la realización del presente trabajo de tesis doctoral, así como al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** No. Becario 212186 y al **Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI)** del Instituto Politécnico Nacional, por la beca otorgada a través de los proyectos de investigación dirigidos por el **Dr. Gustavo Fidel Gutiérrez López**.

Proyectos SIP:

- Microestructura, nanotecnología y nanociencia de alimentos. Clave: 20082342
- Morfología y funcionalidad de alimentos macro, micro y nano estructurados. Clave: 20091469
- Estructura y función de alimentos y sistemas modelo macro, micro y nanométricos. Clave: 20100875

Proyecto CONACyT:

Construcción de materiales micro y nano porosos y evaluación de sus relaciones estructura-función.
CLAVE: 84287

DEDICATORIAS

A mis padres, hermanos y amigos.

ÍNDICE

INDICE DE CUADROS	22
IINDICE DE FIGURAS	23
RESUMEN	25
ABSTRACT	26
1. INTRODUCCIÓN	27
1.1 EMULSIONES	29
1.1.1 <i>Propiedades de las emulsiones</i>	29
1.1.1.1 Tensión interfacial	29
1.1.1.2 Presión de Laplace	29
1.1.2 <i>Estabilidad de las emulsiones</i>	29
1.1.3 <i>Caracterización de las emulsiones</i>	30
1.1.4 <i>Preparación de las emulsiones utilizando campos de flujo</i>	30
1.1.5 <i>Preparación de emulsiones por membrana y micro canales</i>	30
1.1.5.1 Microfluidización	32
1.2 NANOENCAPSULACIÓN A PARTIR DE EMULSIONES	34
1.2.1 <i>Una nueva tendencia para nanoencapsular</i>	34
1.2.1.1 El secado por aspersión como proceso de encapsulación de sustancias nanométricas	35
1.2.1.2 Parámetros que afectan la eficiencia de encapsulación durante el secado por aspersión	36
1.2.1.2.1 Las propiedades de los materiales de pared	37
1.2.1.2.2 Las propiedades de los materiales a encapsular	37
1.2.1.2.3 La emulsión inicial	38
1.2.1.2.4 Método de emulsificación	39
1.2.2 <i>Algunas formas de nanoencapsulación</i>	39
1.2.2.1 Polimerización	39
1.2.2.2 Sistemas Multicapa	40
1.2.2.3 Liposomas	40
1.2.2.4 Diálisis	41
1.3 MICROENCAPSULACIÓN	42
1.3.1 <i>Métodos de microencapsulación</i>	42
1.3.1.1 Aspersión por enfriamiento o congelamiento	42
1.3.1.2 Extrusión	42
1.3.1.3 Cobertura por lecho fluidizado	43
1.3.1.4 Atrapamiento en liposomas	43
1.3.1.5 Coacervación	44
1.3.1.6 Polimerización interfacial	44
1.4 LOS ANTIOXIDANTES	44
1.4.1 <i>α-Tocoferol (AT)</i>	45
1.5 CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES ENCAPSULADOS	46
1.5.1 <i>Factores determinantes en la caracterización de polvos</i>	46
1.5.1.1 Tamaño y distribución de la partícula	46
1.5.1.2 Humedad	46
1.5.1.3 Actividad de agua (Aw)	47
1.5.1.4 Potencial Z	47
1.5.2 <i>Herramientas para la caracterización de materiales encapsulados</i>	47
1.5.2.1 Microscopía	47
1.5.2.2 Análisis de imágenes	48
1.5.2.2.1 Adquisición de imágenes	49
1.5.2.2.2 Procesamiento	49
1.5.2.2.3 Segmentación de la imagen	49
1.5.2.2.4 Extracción de parámetros de la imagen	49

1.5.2.2.5	Clasificación	50
1.5.2.3	Dimensión fractal	51
2.	JUSTIFICACIÓN.....	53
3.	OBJETIVOS	54
3.1	OBJETIVO GENERAL	54
3.2	OBJETIVOS PARTICULARES	54
4.	HIPÓTESIS.....	54
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	55
5.1	MATERIALES.....	55
5.1.1	Reactivos.....	55
5.1.2	Equipos.....	55
5.1.3	PROGRAMAS DE CÓMPUTO	55
5.2	METODOLOGÍA	56
5.3	EFFECTO DE LA ATOMIZACIÓN EN LA DISTRIBUCIÓN DEL A-TOCOFEROL.....	56
5.3.1	Preparación de las emulsiones.....	56
5.3.2	Homogenización por medio de Atomización	57
5.3.3	Secado por aspersión.....	57
5.3.4	Contenido de humedad	57
5.3.5	Determinación de actividad de agua (a_w).....	58
5.3.6	Evaluación de la encapsulación	58
5.3.6.1	Resonancia Magnética Nuclear.....	58
5.3.6.2	HPLC	60
5.3.6.3	Cuantificación total del α -tocoferol en los polvos	60
5.3.6.4	Índice de atrapamiento.....	60
5.3.6.5	Penetrabilidad (P).....	60
5.3.7	Caracterización de las emulsiones y el polvo.....	61
5.3.7.1	Estudio Microestructural.....	61
Microscopía Óptica		61
Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental		61
5.3.7.2	Estandarización de la imagen.....	62
5.3.7.3	Morfometría	62
5.3.7.4	Determinación de la Dimensión fractal	62
5.4	EFFECTO DE LA MICROFLUIDIZACIÓN EN LA DISTRIBUCIÓN DEL μ -TOCOFEROL	63
5.4.1	Preparación de las emulsiones.....	64
5.4.2	Secado por aspersión.....	65
5.4.3	Caracterización de las emulsiones y de los polvos	65
5.4.4	Evaluación de la encapsulación	65
5.4.4.1	Cuantificación parcial por HPLC.....	65
5.4.4.2	Cuantificación total.....	65
5.4.4.3	Microscopía Confocal de Barrido Láser	66
5.4.4.4	Procesamiento de la imágenes	66
5.4.4.5	Determinación de la penetrabilidad y el Índice de Atrapamiento.....	66
5.4.4.6	Análisis estadístico.....	66
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	67
6.1	EFFECTO DE LA ATOMIZACIÓN EN LA DISTRIBUCIÓN DEL A-TOCOFEROL.....	67

6.1.1	Contenido de humedad y Actividad de Agua.....	67
6.1.2	Cuantificación del α -Tocoferol en los encapsulados.....	67
6.1.2.1	Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	67
6.1.2.2	Cuantificación parcial y total del α -Tocoferol por HPLC e Índice de Atrapamiento ..	69
6.1.2.3	Penetrabilidad	72
6.1.3	Caracterización de las emulsiones	74
6.1.4	Caracterización de los polvos	80
6.1.4.1	Dimensión fractal.....	85
6.1.4.1.1	Dimensión fractal de contorno	85
6.1.4.1.2	Dimensión fractal de textura.....	88
6.2	EFFECTO DE LA MICROFLUIDIZACIÓN EN LA DISTRIBUCIÓN DEL A-TOCOFEROL....	90
6.2.1	Análisis de las emulsiones	90
6.2.2	Análisis de los polvos	92
6.2.2.1	Cuantificación parcial	92
6.2.2.2	Índice de atrapabilidad.....	96
6.2.2.3	Penetrabilidad	97
7.	CONCLUSIONES	100
8.	NOMENCLATURA	102
9.	BIBLIOGRAFÍA	105

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Diferentes técnicas para obtención de nanoemulsiones.....	31
Cuadro 2. Diferentes proporciones utilizadas para elaboración de emulsiones	57
Cuadro 3. Diseño experimental para determinar el efecto de la microfluidización en la distribución del α -Tocoferol en las cápsulas.	64
Cuadro 4. Humedad y Actividad de Agua de los polvos para PA y PB.....	67
Cuadro 5. % de lectura de α -Tocoferol en RMN en los diferentes polvos del proceso A y B	68
Cuadro 6. Contenido de α -Tocoferol en los polvos de los procesos A y B.....	71
Cuadro 7. Diámetro de Feret de las diferentes emulsiones en cada una de las etapas de los dos procesos.	78
Cuadro 8. Parámetros Morfométricos evaluados a las emulsiones del proceso A	78
Cuadro 9. Parámetros Morfométricos evaluados a las emulsiones del proceso B	78
Cuadro 10. Parámetros morfométricos evaluados en las Etapas EA2 y EB2.....	80
Cuadro 11. Parámetros Morfométricos evaluados a los polvos PA y PB.	82
Cuadro 12. Diámetro de Feret de los polvos PA y PB.	82
Cuadro 13. Parámetros Morfométricos evaluados a los polvos PA y PB después de la extracción del α -Tocoferol no encapsulado	84
Cuadro 14. Diámetro de Feret de los polvos PA y PB después de la extracción del α -Tocoferol no encapsulado	84
Cuadro 15. Tamaño medio de las emulsiones del diseño en todas las etapas del proceso (nm)	90
Cuadro 16. Cuantificación del α -Tocoferol superficial, encapsulado y total por Kim <i>et al</i> , 2009.....	93
Cuadro 17. Posibles soluciones para la optimización de las variables.....	99

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes geometrías en Microfluidizadores. (a) Arreglo T. (b) Arreglo en cruz. (c) Arreglo Concéntrico. Modificada de Quintanilla-Carvajal <i>et al</i> , 2009.....	32
Figura 2. Diferentes maneras en las que se forman nanocápsulas (Quintanilla-Carvajal <i>et al</i> , 2009)	34
Figura 3. Formación de membranas. Modificada de Mozafari,2005.	41
Figura 4. Estructura molecular del α -Tocoferol.	45
Figura 5. Diagrama de flujo del trabajo experimental.....	56
Figura 6. Diagrama de los procesos A (a) y B (b).....	58
Figura 7. Espectro de RMN para α -Tocoferol.....	68
Figura 8. Imágenes de polvos sometidos a técnicas de extracción de α -Tocoferol superficial con diferentes disolventes. A) Cloroformo.b) Acetona. c) Hexano.....	69
Figura 9. Curva tipo del α -Tocoferol en metanol.....	69
Figura 10. Relación entre el α -Tocoferol cuantificado y extraíble para todos los polvos.....	72
Figura 11. Imágenes de Florescencia tomadas con Microscopio Óptico a 40X con filtro W-blue.....	72
Figura 12. Micrografía de PA3:2:1. A) Fluorescencia b) Luz óptica c) superposición de a y b.....	73
Figura 13. Micrografía de PA3:2:1 después de la extracción superficial de α -Tocoferol a) Fluorescencia b) Luz óptica c) superposición de a y b.....	73
Figura 14. Gráficas de la Penetrabilidad	74
Figura 15. Ejemplo de las diferentes imágenes que se tomaron de las diferentes emulsiones (3:2:1 PE, EA1 y EA2) 40X.....	75
Figura 16. Distribución de Tamaños en Zetasizer de Emulsión 3:2:1 EA2 a diferentes diluciones de la emulsión original.....	76
Figura 17. Distribución de Frecuencias de Emulsiones para el proceso A y B (mm).....	77
Figura 18. Distribución de Frecuencias de EA2 vs. EB2 para todas las emulsiones.	79
Figura 19. Ejemplo de las diferentes imágenes tomadas de los polvos (3:2:1 PA y PB) a 40X	80
Figura 20. Distribución de Tamaño de partícula muestral de PA vs. PB.....	81
Figura 21. Distribución de Tamaño de partícula muestral de PA vs. PB después de la extracción del α -Tocoferol no encapsulado.	83

Figura 22. Grosor de los diferentes polvos obtenidos en los dos procesos a partir de micrografías de ESEM a 3000X de PA y PB cortados con técnica de cinta de carbono	85
Figura 23. Determinación de la Dimensión Fractal de Contorno de los polvos de los procesos A y B. a) Polvo 3:2:1, b) Polvo 3:2:2, c) Polvo 3:1:1, d) Polvo 2:2:1 y e) Polvo 2:1:1.....	86
Figura 24. Determinación de la Dimensión Fractal de Contorno de los polvos de los procesos A y B después de la extracción del α -Tocoferol superficial a) Polvo 3:2:1, b) Polvo 3:2:2, c) Polvo 3:1:1, d) Polvo 2:2:1 y e) Polvo 2:1:1.....	87
Figura 25. Imágenes de ESEM a 500X y 2000X de los polvos PA y PB tomadas antes y después de la extracción del α -Tocoferol superficial y su respectiva Dimensión Fractal de Textura.....	89
Figura 26. Imagen del Polvo (8) antes y después de la extracción superficial de α -Tocoferol en fluorescencia, luz óptica y superposición de fluorescencia y luz óptica con su respectivo z-stack (40X).	92
Figura 27. Perfiles de penetrabilidad de los polvos con y sin α -Tocoferol superficial.....	98
Figura 28. Correlación de la coordenada de color “a” máximo de cada uno de los polvos y la respectiva eficiencia de encapsulación.....	99

RESUMEN

En este trabajo se evaluó la distribución del α -tocoferol (AT) en microcápsulas obtenidas por secado por aspersión a partir de nanoemulsiones generadas por dos técnicas de homogenización diferentes. Inicialmente se estudió el efecto de la atomización en la distribución de tamaño de partícula a emulsiones con 20% de sólidos (maltodextrina, goma arábiga y AT en diferentes proporciones: 3:2:1, 3:2:2, 3:1:1, 2:2:1 y 2:1:1 respectivamente). Se determinó el efecto de la atomización como técnica de homogenización en la cantidad de AT extraíble y encapsulado en polvos obtenidos a partir de dichas emulsiones sometidas a dos pasos por boquilla (atomización fuera del secador y atomización durante el proceso de secado) y en los polvos obtenidos de las emulsiones que pasaron sólo una vez por boquilla (durante el proceso de secado). Esta cuantificación del AT extraíble y encapsulado se hizo a partir de extracciones con cloroformo con el fin de no romper o modificar la cápsula. Los resultados de eficiencia de encapsulación total se compararon con la suma de AT extraíble y encapsulado sin encontrarse diferencias significativas en los dos procesos. Por lo menos en uno de los varios parámetros morfométricos evaluados (área, diámetro de Feret, perímetro máximo, perímetro y factor de forma) se evidenciaron diferencias significativas entre los dos procesos de homogenización (dos pasos por boquilla y un paso por boquilla) antes y después de la extracción del AT. La microestructura de los polvos también se evaluó a través de la dimensión fractal de textura y contorno, evidenciándose también diferencia para los polvos obtenidos de las emulsiones homogenizadas (dos pasos boquilla) y no homogenizadas antes y después de la extracción. En general se determinó que la cantidad inicial de AT controla la cantidad de AT extraíble, pero es el acomodamiento y las relaciones de los materiales de pared, durante el proceso de atomización, los que determinan la cantidad de AT encapsulado. Finalmente, se evaluó el efecto de la microfluidización en la cantidad de AT extraíble y encapsulado en 21 diferentes combinaciones de maltodextrina, goma arábiga y AT determinadas a partir de un diseño de superficie de respuesta de dos factores (concentración de AT: 17, 19, 20 y 25% y ciclos de microfluidización: 0, 1 y 2). Se determinó que la eficiencia máxima de encapsulación depende de la cantidad inicial de AT en la emulsión y variará en una relación de segundo orden según los ciclos de microfluidización que se utilicen. Así mismo se encontró una relación entre el tamaño de la emulsión y la cantidad de AT cuantificado, un mayor número de pasos en el microfluidizador disminuirá el tamaño de la nanoemulsión con concentraciones iniciales bajas (17-20%) de tocoferol. También se estableció el perfil de acomodamiento del AT por microscopia confocal y se correlacionaron las eficiencias de encapsulación de todos los polvos con su respectiva coordenada de color "a" hallando una relación de segundo orden.

ABSTRACT

In this study was evaluated the distribution of α -tocopherol (AT) in microcapsules obtained by spray drying from nanoemulsions generated by two different homogenization techniques. Initially we studied the effect of atomization in the particle size distribution of emulsions with 20% solids (maltodextrin, gum arabic and AT in different proportions: 3:2:1, 3:2:2, 3:1:1, 2:2:1 and 2:1:1, respectively). The effect of atomization as a homogenization technique was determinate in the amount of AT removable and encapsulated in the powders obtained from the emulsions subjected to two passes through nozzle (spray out the spray dryer and during the drying process) and powders obtained from the emulsions that passed only once per nozzle (during the drying process). The removable and encapsulated AT quantification was based on extraction with chloroform in order to not break or interrupt the capsule. The results of total encapsulation efficiency were compared with the sum of removable and encapsulated AT, no significant differences between the two processes were found. At least in one of the morphometric parameters evaluated (area, Feret diameter, maximum perimeter, perimeter and shape factor) significant differences were found between the two processes of homogenization (two passes through nozzle and one pass through nozzle) before and after extraction of TA. The microstructure of the powders was also evaluated by the fractal dimension of texture and contour, demonstrating also a difference for the powders obtained from the homogenized emulsions (two-step nozzle) and not homogenized before and after extraction. In general it was found that the initial amount of AT controls the amount of extractable AT, but the accommodation and the relations between the wall materials during the atomization process, determine the amount of encapsulated AT. Finally, the effect of microfluidization in the amount of removable and encapsulated AT was evaluated in 21 different combinations of maltodextrin, gum arabic and AT determined by a response surface design of two factors (AT concentration: 17, 19, 20 and 25% and microfluidization cycles: 0, 1 and 2). It was determined that the maximum encapsulation efficiency depends of the initial amount of TA in the emulsion and will vary in a second order ratio according to the microfluidization cycles used. Also a relationship between the size of the emulsion and the amount of AT quantified was found, a larger number of steps in the Microfluidizer decrease the size of the nanoemulsion at low initial concentrations (17-20%) of AT. Also was established the accommodation profile of AT by confocal microscopy and the encapsulation efficiencies of all powders were correlated with their respective color coordinate "a" finding a second-order relation.

1. INTRODUCCIÓN

La microencapsulación es un proceso en el que sustancias bioactivas (sabores, vitaminas, antioxidantes, antimicrobianos o aceites esenciales) son almacenadas en pequeñas cantidades al ser introducidas en una matriz o sistema pared (Lekago y Dunford, 2010). El objetivo principal de la encapsulación es proteger los compuestos de reacciones con otras sustancias presentes en el alimento. En campos como la ingeniería de alimentos y la industria farmacéutica, el secado por aspersión se utiliza como una técnica de microencapsulación por la cual gotas de líquido, partículas sólidas o gases son atrapados en las películas finas de alimentos o de agentes químicos de grado microencapsulante (Gharsallaoui *et al*, 2007; Champagne y Fuster, 2007; Pérez –Alonso *et al*, 2008).

Las técnicas de encapsulación han ido incrementando en número y complejidad, debido a los avances tecnológicos de ciencias como la nanotecnología. La obtención de nanocápsulas o cápsulas nanoestructuradas se puede realizar utilizando metodologías “*Top down*” que consisten en disminuir el tamaño de las emulsiones hasta la escala nanométrica a través de diferentes técnicas de emulsificación, o por técnicas “*Bottom up*” en las que se inducen arreglos de moléculas o partículas individuales hasta llegar a los tamaños deseados por medio del autoensamblaje (Elder y Oberdörster, 2005; Quintanilla-Carvajal *et al*, 2009). La nanoencapsulación ofrece la conservación de la funcionalidad del producto encapsulado (incluyendo la liberación controlada del compuesto) que se espera, sea constante durante el almacenamiento.

En el campo de la ingeniería de alimentos, la producción de productos con mejor estabilidad y funcionalidad, puede lograrse a través de la protección de compuestos bioactivos a través de la encapsulación. Es así como se han desarrollado productos nanoestructurados capaces de liberar y conservar diversos compuestos como antioxidantes, vitaminas, proteínas y lípidos (Were *et al*, 2003; Mozafari *et al*, 2005). Este tipo de compuestos se han encapsulado bajo diversas técnicas; la polimerización, los sistemas multicapas, los liposomas, la diálisis y la microfluidización son algunas de las metodologías que se emplean para capturar compuestos a partir de emulsiones homogenizadas (Nisisako, 2008). La encapsulación de nano-partículas por secado por aspersión se ha desarrollado a partir de la preparación de emulsiones nanométricas con diferentes microfluidizadores (Jafari *et al*, 2007; Jafari *et al*, 2008a).

En los últimos años, el énfasis que se ha dado al estudio de la microencapsulación, se ha concentrado en mejorar la eficiencia de atrapamiento durante el secado por aspersión tratando de prevenir la pérdida de materiales volátiles e incrementando la vida de anaquel de los productos obtenidos minimizando la cantidad de materiales no encapsulados en la superficie de las partículas de los polvos (Madene *et al*, 2006). Se ha reportado la eficacia de la microfluidización como técnica de emulsificación al disminuir la

cantidad de material superficial de compuestos lipídicos por secado por aspersión (Jafari *et al*, 2007; Jafari *et al*, 2008b).

El secado por aspersión es una operación unitaria en la que pequeñas partículas de líquido tienen contacto con una corriente de gas caliente (generalmente aire) para formar partículas sólidas. La nube atomizada o aerosol, entra en contacto con el aire por tiempos muy cortos, garantizando así, la preservación de los atributos del producto final (Shahidi y Han, 1993). El uso del secado por aspersión en microencapsulación consiste en cuatro etapas fundamentales: preparación de la emulsión, homogenización de la dispersión, atomización en la cámara de secado y deshidratación de las partículas atomizadas (Dziezak, 1988; Shahidi y Han, 1993). Una vez secadas las emulsiones, la cantidad de material en la superficie de las cápsulas y la cantidad de material encapsulado son parámetros clave para determinar la calidad del producto. Se ha demostrado, que la superficie de las partículas de polvo individuales de productos lácteos que contienen lípidos, está cubierta casi totalmente por una fina capa oleosa (Kim *et al*, 2002). Esta característica determina la fluidez y la humectabilidad de los polvos secos (Vega y Roos, 2006). Existen diferentes métodos para determinar la cantidad de materiales lipídicos no encapsulados en emulsiones secadas por aspersión que se basan en la extracción de las distintas fracciones del aceite no encapsulado (Drusch y Berg, 2008). El aceite extraíble o no encapsulado, se define como aquel que se puede extraer con disolventes orgánicos de las microcápsulas sin romperlas (Lekago y Dunford, 2010).

Si bien, la aplicación de la ciencia y la tecnología de los alimentos ha permitido desarrollar productos con mejores propiedades funcionales y de estabilidad, todavía es difícil determinar la ubicación de los diferentes componentes de las cápsulas. Las posibles interacciones entre los materiales de pared y los compuestos a encapsular son aún difíciles de evaluar (Goya *et al*, 2008). Los materiales de pared pueden actuar como contenedores de los compuestos activos manteniéndolos en la cápsula, ya sea fijándolos en su superficie o embebiéndolos en su estructura (Quintanilla-Carvajal *et al*, 2009). Conceptos como el de eficiencia o rendimiento de encapsulación deben ser replanteados con el fin de distinguir la cantidad de material encapsulado o atrapado superficialmente o bien embebido en los materiales de pared (Drusch y Berg, 2006). Es por ésto, que el objetivo del presente estudio, fue el de evaluar la distribución del alfa-AT en las microcápsulas obtenidas a partir de emulsiones de maltodextrina y goma arábiga de diferentes tamaños (nanoemulsiones), a través de atomización antes del secado por aspersión y por la aspersión en el mismo, así como por microfluidización (homogenización por microcanales).

1.1 EMULSIONES

Las emulsiones son mezclas de fluidos inmiscibles. Usualmente un fluido está presente en otra fase a manera de pequeñas gotas, llamándose éstas la fase dispersa (Boom, 2008).

1.1.1 Propiedades de las emulsiones

1.1.1.1 Tensión interfacial

La tensión interfacial o energía interfacial es característica de la superficie entre dos fluidos inmiscibles y es causada por la diferencia de fuerzas de cohesión entre las moléculas de ambas fases. El generar dicha interfase requiere un costo energético proporcional a la cantidad de interfase generada. La energía libre que se necesita para crear área interfacial es la tensión o energía interfacial (en el SI de unidades, se expresa en N/m). Esta tensión superficial siempre es positiva con la excepción de aquella presentada en las microemulsiones; ésto significa que ΔG es siempre positiva puesto que hacer pequeñas gotas requiere energía. El sistema intentará reducir la cantidad de interfase generando así, una fuerza que lleva a la coalescencia (Cheong *et al*, 2008).

1.1.1.2 Presión de Laplace

En una gota esférica de un fluido inmiscible en otro, dado que la interfase es curva, la tensión interfacial ejerce una fuerza perpendicular a la interfase dirigida al lado cóncavo de ésta. Este lado o zona de la fuerza es proporcional al área interfacial y por eso se puede describir como una presión. En el interior de las gotas o de otro fluido dominado en sus alrededores por una interfase, la presión siempre es mayor que en el exterior y entre más pequeño sea el dominio, mayor será la diferencia de presión (Boom, 2008).

1.1.2 Estabilidad de las emulsiones

Como la tendencia natural de todas las emulsiones es la de coalescer, se requiere de una fuerza que estabilice a la emulsión y hay tres diferentes formas de conseguir dicha estabilización.

La estabilización con surfactantes se da con moléculas que tienen un lado con afinidad mayor a una de las fases mientras que el otro tiene mayor afinidad al otro líquido. Ésto permite conservar las dos fases si el surfactante se ubica en la interfase. La estabilización con polímeros y cristales se genera si se “engruesa” la fase dispersa agregando algún soluto que ocupe la polaridad de ésta. La estabilización con proteínas funciona como la de polímeros por la gran afinidad que tienen algunos aminoácidos con el agua (Tadros *et al*, 2004; Boom, 2008; Wulff-Pérez *et al*, 2009).

1.1.3 Caracterización de las emulsiones

Las propiedades de una emulsión dependen del tamaño de las gotas que formen a ésta. La apariencia de la emulsión depende del tamaño, según esto, las emulsiones se pueden dividir en micro- (10–100 nm), mini (nano)- (100–1000 nm) y macro-emulsiones (0.5–100 μ m) (Windhab *et al*, 2005). Las nano emulsiones son sistemas cinéticamente estables que pueden ser transparentes (<200 nm) ó cremosas (\approx 500 nm) (Izquierdo *et al*, 2002; Tadros *et al*, 2004). Una emulsión presenta diferentes tamaños de partícula y la distribución es una propiedad importante a diferenciar.

1.1.4 Preparación de las emulsiones utilizando campos de flujo

El método más común para producir emulsiones es el de inducir una corriente muy fuerte de algún flujo, por agitación o mezcla o a través de una pequeña apertura. El flujo que se genera en torno a una gota induce una fuerza de cizallamiento en ésta; cuando la fuerza es lo suficientemente grande, la gota puede dividirse en varias más pequeñas (Koupantsis y Kiosseoglou, 2009).

- Sistemas de rotor: en este sistema, el campo de flujo entre dos elementos se vuelve muy intenso en una distancia muy corta. Existen diferentes tipos de equipos, los más importantes son, el tanque agitado, el molino y el molino dentado (López *et al*, 2008).
- Homogenizadores de alta presión: en este caso la mezcla se bombea a través de un agujero muy pequeño o aguja. El flujo se frena sobre las grandes gotas generando así, otras más pequeñas. Estos sistemas se denominan de válvula y aguja (Lee *et al*, 2009).
- Ultrasonido: El sonido es un patrón de propagación de turbulencias de fluctuaciones de presión. Éste es generado por un actuador que vibra con una frecuencia específica. Esta tecnología no es particularmente útil a escalas industriales (Wagner *et al*, 2008). El Cuadro 1 describe algunas técnicas utilizadas para generar nanoemulsiones en el campo de los alimentos.

1.1.5 Preparación de emulsiones por membrana y micro canales

En los tratamientos de membrana, el líquido es forzado a través de una membrana con poros de determinado diámetro para disminuir el tamaño de las gotas. Las principales características de estas técnicas es que los campos de flujo aplicados son leves, y el consumo de energía es menor que para la homogenización a través de un solo orificio (Geerken *et al*, 2009).

- Membranas y micro canales de emulsificación: La principal característica de esta técnica es que el flujo que se aplica es relativamente bajo y por ende el consumo de energía menor respecto a técnicas como la de altas presiones. Las características de las gotas dependerán de la forma y las dimensiones de los poros del micro-canal (De Luca *et al*, 2008).

Cuadro 1. Diferentes técnicas para obtención de nanoemulsiones

Técnica	Sistema estudiado	Referencia
<p>Composición Fase Inversa</p>	<p>Método utilizado para preparar emulsiones (O/W) en el sistema iónico W/cloruro de oleilamonio-oleilamina-$C_{12}E_{10}$/hexadecano; las nanoemulsiones fueron preparadas por la adición de soluciones acuosas de HCl, hexadecano, oleilamina y $C_{12}E_{10}$ o mediante la adición progresiva de soluciones de K_2OH a mezclas de hexadecano-ácido oleico-$C_{12}E_{10}$. El pH disminuyó, dando lugar a una ionización de la oleilamina. El ácido oleico fue ionizado incrementando el pH con KOH.</p> <p>Se prepararon nanoemulsiones de β-caroteno utilizando una técnica de emulsificación- evaporación en fase inversa. Fue posible obtener dispersiones en una escala nanométrica. El tiempo y la velocidad de corte en la homogeneización afectaron la distribución de tamaño de las partículas respecto al diámetro medio. Las nanoemulsiones obtenidas presentaron un Dvs de 9 a 280 nm y en todos los casos, una distribución monomodal.</p>	<p>Maestro <i>et al</i>, 2008</p> <p>Silva <i>et al</i>, 2011</p>
<p>Homogeneización a altas presiones</p>	<p>Se prepararon emulsiones (O / W) utilizando β-caroteno como fase dispersa y agua Milli-Q como fase continua. La premezcla se homogenizó a 5000 rpm por 10 minutos formando una emulsión gruesa, seguido por homogeneización a alta presión de dos etapas. Los factores: temperatura, presión, concentración de β-caroteno, concentración de emulsionante, las interacciones entre el β-caroteno y la concentración de emulsificante y la interacción entre la temperatura de homogeneización y la concentración del emulsificante afectaron la estabilidad de las emulsiones.</p> <p>Se encapsularon aceites esenciales a nivel nanométrico para su incorporación en jugos de fruta, para mejorar su actividad antimicrobiana y reducir el impacto en la calidad del producto final. Se elaboró una mezcla de terpenos y D-limoneno por la homogeneización a 300 MPa. Se obtuvo una mayor actividad antimicrobiana de los compuestos nanoencapsulados.</p>	<p>Yuan <i>et al</i>, 2008</p> <p>Donsi <i>et al</i>, 2010</p>
<p>Ultrasonido</p>	<p>La nanoemulsión se preparó con una mezcla de lípidos que se emulsificaron por irradiación ultrasónica en medio acuoso y ultracentrifugación en dos fases de la emulsión ajustando densidad.</p> <p>Preparación de una nanoemulsión O/W con tensioactivos y oleoresina de capsicum (OC). Las nanoemulsiones de OC se prepararon por ultrasonificación con una relación de mezcla OC:Tween80 (1:0.7) por el método de auto-ensamblado OC:Tween80 (01:03).</p> <p>Se prepararon nanoemulsiones O/W transparentes con diámetros promedio de 40 nm a partir de aceite de girasol mediante ultrasonido y homogeneización de alto corte y un sistema de surfactante/co-surfactante/aceite.</p>	<p>Pires <i>et al</i>, 2009.</p> <p>Ye y Fernando, 2007.</p> <p>Leong <i>et al</i>, 2009.</p>
<p>Microfluidización</p>	<p>Las pre-emulsiones se prepararon disolviendo dodecilsulfato de sodio, (0 - 5.6% en peso) y polietileno glicol (0 - 18.9% en peso) en agua destilada desionizada, posteriormente se agregó el aceite (15% en volumen) con homogenizador. Las emulsiones se prepararon con un Microfluidizador de configuración M-110Y pasando las pre-emulsiones cinco veces a una presión máxima del equipo de 1000 bar.</p> <p>Se prepararon con un microfluidizador, nanoemulsiones de alfa y gamma tocoferol, estas nanoemulsiones mejoraron las propiedades anti-inflamatorias e incrementaron la biodisponibilidad de los compuestos.</p>	<p>Wooster <i>et al</i>, 2008.</p> <p>Kuo <i>et al</i>, 2008.</p>

• Emulsificación de “*Dead-End*” de membrana (premezclas): este proceso parte de una pre-emulsión, cuando ésta pasa a través de una membrana gruesa, por lo general se obtiene una mezcla de gotas muy grandes y algunas pequeñas, pero a medida que se repite el proceso, el número de las pequeñas aumenta y el de las grandes decrece (Geerken *et al*, 2007; Charcosset, 2009).

1.1.5.1 Microfluidización

En esta técnica, se fuerzan corrientes de flujo a través de un sistema de micro-canales dispuestos en una serie de geometrías. La fuerza de arrastre ejercida por los fluidos al moverse en el sistema y el contacto entre partículas causa el rompimiento de las gotas. El principio fundamental de estos equipos se basa en los esfuerzos de corte que se presentan cuando las corrientes de fluido se ponen en contacto a altas velocidades. La Figura 1 presenta las diferentes geometrías de dispositivos de micro-canales, la presión y la relación entre los radios de los conductos para diferentes fluidos sometidos al procesamiento son factores fundamentales para obtener nanoemulsiones con distribuciones de tamaño homogéneo.

La geometría de cruce en T se aplica generalmente para generar emulsiones de aceite en agua (O/W), mientras que las geometrías de salida en cruz y concéntrica son arreglos que se utilizan para preparar emulsiones dobles (agua-aceite-agua o emulsiones de aceite-agua-aceite) y para evitar coalescencia o la producción de partículas no esféricas (Skurtys y Aguilera, 2008). Kawatsu *et al*, (2001) al desarrollar este procedimiento, encontraron que el tamaño de gota de las emulsiones producidas bajo esta técnica estaba relacionado con la geometría del canal pero era independiente del flujo.

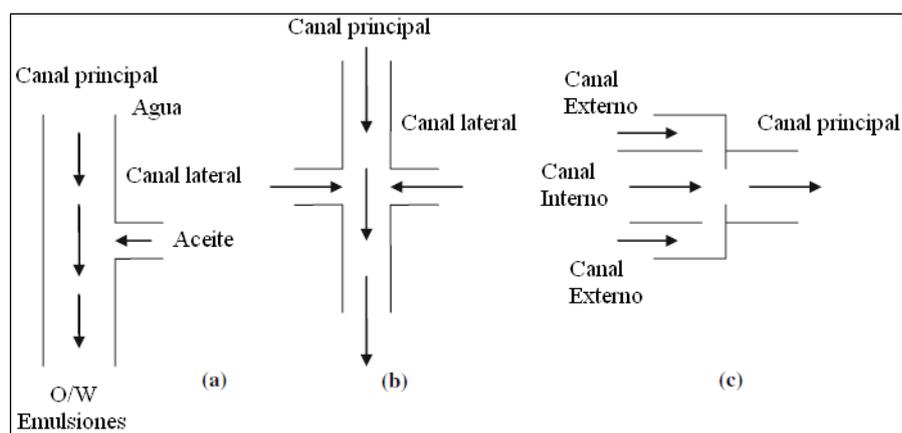


Figura 1. Diferentes geometrías en Microfluidizadores. (a) Arreglo T. (b) Arreglo en cruz. (c) Arreglo Concéntrico. Modificada de Quintanilla-Carvajal *et al*, 2009.

Un microfluidizador realiza los esfuerzos de corte, impacto y cavitación para emulsificar sistemas líquido-líquido o para desaglomerar y dispersar sólidos en líquidos. El proceso toma lugar a altos niveles de energía en una cámara de interacción (CI) y puede utilizar una cámara adicional llamada Módulo Auxiliar de Procesamiento (MAP).

Son seis las variables que se deben controlar durante la microfluidización (Jafari *et al*, 2008a):

- El tipo de Cámara de Interacción (CI)
- El tipo de la cámara auxiliar (MAP)
- El lugar y tamaño de la CI y la MAP
- La cantidad de presión a aplicar
- El número de veces al que se someterá el tratamiento al proceso
- Temperatura de procesamiento

La CI es un dispositivo patentado que permite asignar las características deseadas a emulsiones que bajo otras técnicas más económicas o convencionales, no es posible. Es un dispositivo con una geometría única sin partes en su interior. Se pueden procesar diversos materiales a través de la CI a presiones altas, hasta 275.78 MPa (40000 psi) a partir orificios pequeños (hasta 7 μm) para obtener tamaños de partículas nanométricos, homogéneos y procesos escalables y reproducibles (Microfluidics, 1996).

Hay dos tipos de CI, el tipo “Y” y el tipo “Z” cuyos tamaños pueden variar ya sea para requerimientos a nivel laboratorio o industrial. Estas CI pueden utilizarse en conjunto con MAP, la cual se puede situar antes o después según los resultados que se deseen. Si se ubica antes de la CI, la MAP funcionará como mezclador o preprocesador para preparar al material para el paso por los pequeños orificios de la CI. La MAP siempre es una cámara tipo Z y siempre más grande que la CI en capacidad de flujo.

Para una adecuada selección de las cámaras y arreglos a utilizar se deben seguir diversos pasos: Lo primero que se debe hacer es determinar las características del producto, jerarquizando las particularidades deseadas. Posteriormente se debe seleccionar los tamaños y tipos de la CI y la utilización y posicionamiento de la MAP. Luego se deben determinar las proporciones de las fases dispersas, el porcentaje de surfactante y aditivos, el número de pasos, y la presión de operación. Otros parámetros pueden ser la temperatura y el calentar o enfriar los productos antes o después del procesamiento.

Para el caso de las emulsiones, el Microfluidizador produce mejores resultados con emulsiones de tipo aceite en agua O/W. Se recomienda utilizar la CI del tamaño más pequeño (7 μm). También se recomienda colocar la MAP después de la CI para producir distribuciones de tamaño de gota más estrechas. La MAP imparte entre el 10 y el 20% de la presión que ejerce la CI. Hay un punto al que el incremento de energía representado como pasos adicionales a través de las cámaras o mayores presiones, causa un incremento en el tamaño de partícula (Schultz *et al*, 2004). Se deben determinar el número de pasos hasta alcanzar el tamaño deseado. La temperatura por otro lado debe ser controlada como factor importante para la obtención de las emulsiones, ya que esta incrementa en 1.7 °C por cada 1000 psi de presión ejercida (Microfluidics, 1996)

1.2 NANOENCAPSULACIÓN A PARTIR DE EMULSIONES

En 1959, el significado conceptual de la palabra nanotecnología empezó a difundirse gracias a la Ingeniería Atómica con el físico Richard Feynman. Pero en 1974 se constituye con Nario Taniguchi para describir la manipulación de partículas menores a una micra. La nanotecnología involucra la investigación, desarrollo tecnológico y control de estructuras en dimensiones que comprenden entre 1 y 100 nm y entre 100 y 1000 nm para el caso de las emulsiones. Con la nanotecnología se crean y usan estructuras que tienen propiedades útiles; éstas se han ido descubriendo a la luz de los cambios en las características que se observan a medida que el tamaño va disminuyendo; un ejemplo de esto es el oro que a nivel atómico incrementa su conductividad debido al confinamiento espacial y a los efectos cuánticos que se generan en la superficie atómica (Marotti, 2007; Uskokovic, 2007).

1.2.1 Una nueva tendencia para nanoencapsular

Ya se ha reportado una clasificación o explicación a los diferentes conceptos que se dan en la nanoencapsulación; de la literatura revisada, este trabajo evidencia tres tendencias para encapsular y las posibles combinaciones de ellas: la elaboración de cápsulas tamaño nano (Figura 2 a y c), la estructuración de micro o nanocápsulas con estructuras porosas de tamaño nano (Figura 2 c, d y e) (Zeller y Saleeb 1996), o la encapsulación de compuestos particulados a tamaño nano (Figura 2 a, b, c y d).

El secado por aspersión, es una técnica que permite el desarrollo de éstas tres tendencias. Es así como se han conseguido partículas de tamaño nanométrico (Bilensoy *et al*, 2008); así también se han encapsulado partículas nanométricas provenientes de nanoemulsiones de aceite de pescado bajo diferentes metodologías de homogenización (Takashima *et al*, 2007, Jafari *et al*, 2007; Jafari *et al*, 2008a). Es por esto, que la alimentación al secador por aspersión (micro o nanoemulsión), es de vital importancia para el proceso (Moinard-Chécot *et al*, 2008; Akagi *et al*, 2007; Luo y Gu, 2007; Luo y Zhoe, 2004).

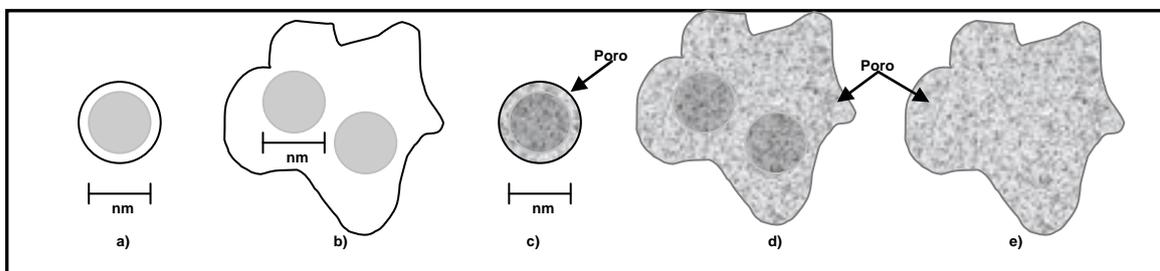


Figura 2. Diferentes maneras en las que se forman nanocápsulas (Quintanilla-Carvajal *et al*, 2009)

Cabe mencionar que la formación de nanopartículas poliméricas en agua, utilizadas para alimentos o medicamentos, resulta del autoensamblaje para nanoesferas regulares que contienen complejos hidrofóbicos en el centro de la cápsula y una coraza mucho más hidrofóbica (Akagi *et al*, 2007, Oliva *et*

al, 2002). Una forma de asignar estructuras anfifílicas es la de anexas o “injertar” dextranos con polímeros sintéticos (Gref *et al*, 2002). También se pueden modificar dichos dextranos con grupos funcionales hidrofóbicos (Nichifor *et al*, 1999).

1.2.1.1 El secado por aspersión como proceso de encapsulación de sustancias nanométricas

En la actualidad ya se han encapsulado diversas oleorresinas y aceites en emulsiones de agua. Los biopolímeros más utilizados son la goma mezquite, la maltodextrina y proteínas (Perez-Alonso *et al*, 2003). También se han encapsulado bajo este proceso otros compuestos volátiles y de uso extensivo en la industria alimentaria (Krishnan *et al*, 2005; Kanakdane *et al*, 2007; Perez-Alonso *et al*, 2003). La mayoría de los estudios relacionados al secado por aspersión para microencapsulación se refieren a la formulación de una emulsión para la alimentación del secador (Gharsalloui *et al*, 2007).

El tamaño y la forma de partículas atomizadas y la eficiencia de encapsulación se han relacionado con diversas condiciones del secado por aspersión, por ejemplo con las temperaturas de entrada y salida, el flujo de alimentación o la velocidad del aire de atomización (Tonon *et al*, 2008; Kurozawa *et al*, 2009; Tewa-Tagne *et al*, 2007). Son muy pocos los estudios que han relacionado los dispositivos de atomización como parte del proceso de homogenización, a pesar del alto corte de cizalla al que se someten los productos en el atomizador. Sin embargo Coulter *et al*, (1951) plantearon esta posibilidad al explicar que la leche que se atomizaba para un proceso de secado no necesitaba una homogenización previa debido a que la atomización per se ya se consideraba un proceso de homogenización. Otros trabajos han planteado el uso de boquillas sónicas como medio de mezclado previo al secado (Lekago y Dunford, 2010) pero ninguno ha relacionado la atomización como agente homogenizador con el fin de evaluar una reducción de tamaño y su efecto en la distribución de los componentes en las cápsulas.

Los métodos de liberación de los compuestos encapsulados en las cápsulas se pueden dar por una disolución normal en agua, por esfuerzos de cizalla, por temperatura, por reacciones químicas y enzimáticas o por cambios en la presión osmótica. La liberación de las sustancias de una microcápsula puede ser controlada por difusión de la pared de la cápsula o por una membrana que cubre la pared. La permeabilidad a través de la matriz y la solubilidad del componente de la pared de la cápsula influyen en la velocidad de difusión. El compuesto que va a difundir debe solubilizarse en la matriz y la presión de vapor de sustancias volátiles en cada lado de la matriz puede ser la fuerza que determine la difusión. La selección de una matriz o membrana es importante; la naturaleza química, morfología y temperatura de transición vítrea, el grado de hinchamiento y de entrecruzamiento también influyen en la difusión de la membrana aunque pueden disminuir la velocidad de liberación (Jafari *et al*, 2008b).

1.2.1.2 Parámetros que afectan la eficiencia de encapsulación durante el secado por aspersión

Los tamaños de partícula que se pueden obtener a partir de procesos de encapsulación se clasifican en macro ($>5000\mu\text{m}$), micro ($1-5000\mu\text{m}$) y nano ($<1\mu\text{m}$). En el secado por aspersión se obtienen polvos por debajo de $1\mu\text{m}$ y estas cápsulas se conocen como “*multiple-core*” ya que el material a encapsular se dispersa a través de los materiales de pared y el área central está ocupada por el espacio que genera la expansión durante las últimas etapas del secado (King, 1995).

Se han encapsulado exitosamente diferentes tipos de sabores y aceites con mínimas cantidades de material oleoso en la superficie de las cápsulas y máximas cantidades de retención. Estos resultados han suscitado el desarrollo de diferentes tipos de investigaciones en donde se determinan diferentes parámetros del secado por aspersión como los principales factores que afectan la eficiencia de encapsulación. Dentro de los principales parámetros que influyen en el rendimiento se encuentran el tamaño de partícula del polvo, el tipo de atomización, la temperatura de la alimentación, el flujo de aire y humedad en el secador por aspersión, la temperatura de entrada y la temperatura de salida (Jafari *et al*, 2008b).

El componente mayoritario en una emulsión es el agua, componente que se evapora durante el secado ($>90\%$), sin embargo la evaporación de ésta, determina en cierto grado, la retención de los compuestos a encapsular. Dos teorías se debaten respecto a este aspecto: según la teoría de difusión selectiva, cuando la humedad de la superficie de una partícula atomizada se reduce entre un 7 y 23%, esta superficie seca actúa como una membrana semipermeable permitiendo la pérdida (o difusión) del agua facilitando la retención de los compuestos encapsulados (Reineccius, 2004). A medida que continúa el secado la difusividad de los compuestos a encapsular se dificulta respecto a la de las moléculas del agua. Es por eso que durante las primeras etapas del secado se dan las mayores pérdidas respecto a la retención de los materiales (Bhandari, 2005).

King y Hecht (1995) reportan tres etapas en donde se da la pérdida de los compuestos encapsulados: 1) durante la atomización por el amplio contacto de área superficial con el aire, la turbulencia y los esfuerzos de corte de la gota atomizada. 2) después de la formación de la gota donde se da una rápida pérdida de agua y aún no se forma la membrana semipermeable y 3) cuando la temperatura de la gota excede la de ebullición y se forman burbujas dentro de la cápsula que al explotar arrastran compuestos con ellas. Ahora bien, durante el proceso de optimización de la eficiencia de encapsulación, las cuatro variables más importantes a considerar se describen a continuación:

1.2.1.2.1 Las propiedades de los materiales de pared

Los materiales protectores influyen en las características de la emulsión, en la retención de los compuestos encapsulados y durante la vida de anaquel del producto final. Los materiales hidrolizados como las maltodextrinas son los más económicos, aportan un sabor suave, presentan baja viscosidad a altos niveles de sólidos y una excelente capacidad de protección para materiales oleosos (Jafari *et al*, 2008b). Se ha determinado así que en el uso de maltodextrinas como materiales de pared, los equivalentes de dextrosa están directamente relacionados a la capacidad de protección, permeabilidad al oxígeno y eficiencia de encapsulación (Hogan *et al*, 2003). Trabajos como el de Re y Lui (1996) reportan un 67% de retención de Alilguayacol usando maltodextrina de 10DE frente a un 94% de retención al utilizar almidón modificado. También se ha reportando el uso de combinaciones con biopolímeros de superficies activas como las gomas con el fin de conseguir mayores valores de retención (Krishnan *et al*, 2005). Las gomas aparte de poseer buenas propiedades de retención actúan como agentes emulsificantes (Fang *et al*, 2005).

1.2.1.2.2 Las propiedades de los materiales a encapsular

La retención de los materiales: No sólo las propiedades del material pared influyen en las características de la cápsula, los materiales a encapsular también influyen en la retención durante el secado. El peso molecular y la presión de vapor de los compuestos influyen en dicha eficiencia (Vega y Roos, 2006).

Peso molecular: El aumento del peso molecular generalmente genera una tasa de difusión más lenta, consiguiendo así, que las moléculas demoren más tiempo en llegar a la superficie de la gota atomizada durante el secado, específicamente, en las etapas iniciales del proceso logrando un mayor porcentaje de retención. Un segundo factor que promueve la retención de moléculas de mayor peso molecular se da ya que la superficie de la gota se convierte en impermeable con mayor rapidez durante el secado y la difusión se detiene por un bajo contenido de humedad. Este comportamiento se observó al secar dos ésteres de diferentes pesos moleculares con goma arábiga con diferentes eficiencias de encapsulación como resultado (Rosenberg *et al*, 1990).

Polaridad: La retención de compuestos también depende de la polaridad, entre más polar sea el material se dará una menor retención puesto que se solubilizará más fácilmente en el agua y tenderá a migrar con el agua que se retira durante el proceso de secado (Voilley, 1995).

Concentración del material a encapsular: La eficiencia de encapsulación o la retención de los compuestos será menor a mayores concentraciones iniciales de material oleoso (Tan *et al*, 2005) pero de la misma forma se obtendrá mayor contenido de aceite en la superficie del polvo (Keogh *et al*, 1999). Por ejemplo, Bhandari *et al*, (1992), reportaron una disminución del 10% en volátiles de retención total y un

aumento del 150% en sustancias volátiles retenidas en la superficie de las partículas de polvo cuando la concentración inicial de aceite se incrementó de 20 a 25%.

1.2.1.2.3 La emulsión inicial

Uno de los pasos clave en la encapsulación de secado por aspersión de aceites y sabores es la preparación de la emulsión de entrada. Los parámetros importantes a considerar son la concentración de sólidos totales, la viscosidad, la estabilidad, el tamaño de gota, y el método de emulsificación que se utilice (Jafari *et al*, 2008b).

Sólidos totales en la emulsión: Algunos trabajos reportan que el contenido de sólidos totales en la emulsión es el factor que determina la retención de compuestos volátiles y la eficiencia de encapsulación de aceites en alimentos durante secado por aspersión (Sootinatanwat *et al*, 2005). Un alto contenido de sólidos reduce el tiempo necesario para formar una membrana semipermeable en la superficie de la partícula de secado y por ende se incrementa la viscosidad de la emulsión, dificultando la circulación de los compuestos dentro de las gotas. Aunque algunos autores como Sankarikutty *et al*, (1988) y Rosenberg *et al*, (1990) sugirieron que se debe utilizar el contenido de sólidos de alimentación más alto, otros trabajos reportan que existe un contenido de sólidos de alimentación óptimo para el secado por aspersión de aceites (Yuliani *et al*, 2006). En algún contenido de sólidos, la adición de más material pared superará la solubilidad de los compuestos, y estos al no disolverse no podrán proporcionar ningún efecto encapsulador. Liu *et al*, (1990) pusieron de manifiesto que la retención de D-limoneno (más del 95%) fue independiente de la la concentración inicial de sólidos.

Viscosidad de la emulsión: Un aumento en la viscosidad de la emulsión ayudará a la retención de los compuestos debido a la reducción de la circulación en las gotas y a la rápida formación de la membrana semi-permeable. Sin embargo, el aumento de la viscosidad más allá de un límite óptimo provoca una disminución en la retención de los compuestos, debido a una mayor exposición durante la atomización. Está demostrado que una alimentación más viscosa produce gotas de tamaños más grandes haciéndose más difícil la formación de gota generando partículas más irregulares después del secado (Silva *et al*, 1996).

Estabilidad de la emulsión: La eficiencia de encapsulación de aceites y sabores en los alimentos se ve afectada por la estabilidad de la emulsión inicial: una mayor estabilidad de la emulsión de alimentación se ve reflejada en un aumento de eficiencia de encapsulación (Barbosa *et al*, 2005b).

Tamaño de la Emulsión: se ha reportado que el tamaño de la emulsión tiene un efecto considerable sobre la eficiencia de encapsulación de aceites y sabores durante el secado por aspersión (Soottitantawat *et al*, 2003). Risch y Reineccius (1988) reportaron una retención superior de aceite de naranja y una disminución en la cantidad de aceite superficial mediante la reducción del tamaño de la emulsión (0,90 mm) a través de microfluidización. Sin embargo trabajos como el Soottitantawat *et al*, (2003), también reportan un incremento de material superficial en los polvos para las emulsiones con tamaños de gota más grande.

1.2.1.2.4 Método de emulsificación

Mongenot *et al*, (2000) demostraron que el uso de ultrasonido como técnica de homogenización aumentó la calidad de la emulsión de materiales de pared bajos en viscosidad, incrementando la retención del aroma encapsulado respecto a una técnica de homogenización por alta presión. Jafari *et al*, (2007), redujeron la cantidad de material superficial en polvos producidos a partir de emulsiones homogenizadas por microfluidización.

1.2.2 Algunas formas de nanoencapsulación

El desarrollo de productos funcionales es una innovación tecnológica que ha adquirido adeptos con el paso de los años. Las tecnologías que envuelven esta tendencia comprenden la nano y microencapsulación, encapsulación enzimática, inmovilización de compuestos a nivel atómico, síntesis polimérica y sistemas de multicapas (“LbL”, por sus iniciales en inglés) entre otros (López *et al*, 2006; Luo y Gu, 2007; Krol *et al*, 2006).

1.2.2.1 Polimerización

La polimerización de miniemulsiones consigue que la encapsulación sea provocada por una separación de fases durante la polimerización. Un oligómero anfifílico se utiliza como tensoactivo para preparar una miniemulsión (paquetes de aceites de 50 a 500 nm dispersos en agua). Debido a las propiedades anfifílicas del oligómero las moléculas pueden auto ensamblarse en la interfase de agua/aceite mediante ultrasonicación. Cuando un iniciador soluble en agua como lo puede ser el Persulfato de Potasio es introducido, los primeros radicales solubles en agua empiezan a surgir en ésta. Después de varias adiciones de monómeros, los oligoradicales comienzan a ser activos en la superficie y son capturados por mini paquetes de aceite. Los radicales activos de la superficie con las cabezas de grupos aniónicos son enlazados a la interfase de mini paquetes y el agua. De esta manera la polimerización se hace en la interfase y las cadenas del polímero pueden ir creciendo gradualmente permitiendo la formación de la coraza. En esta forma de nanoencapsulación es ideal que la única forma de formación de partícula sea la

nucleación de la gota. Y así mismo se han identificado parámetros importantes a tener en cuenta: la hidrofobicidad y/o estructura del oligómero que influye en la morfología de la nanocápsula al final del proceso. A mayor peso molecular del oligómero, menor formación de partículas (Luo y Gu, 2007; Hu *et al*, 2007; Ren *et al*, 2007; Liang *et al*, 2008).

1.2.2.2 Sistemas Multicapa

Con la técnica “*LbL*” se pueden fabricar películas a escala nanométrica teniendo un control preciso del espesor y de la uniformidad de éstas (Varahramyan y Lvov, 2007). La técnica “*LbL*” se basa en la adsorción alternada de polielectrolitos cargados opuestamente que están contenidos en una solución sobre un substrato sólido de superficie cargada (Sui, 2004; Varahramyan y Lvov, 2007, Cai *et al*, 2005; Serizawa *et al*, 2006). Para la fabricación de estas estructuras intervienen diversos tipos de interacciones que son las responsables del autoensamblaje; las principales son las interacciones electrostáticas (Weiss *et al*, 2006). Este tipo de interacciones son importantes ya que los polímeros que se emplean en la técnica “*LbL*” poseen una carga eléctrica lo que permite que estos puedan ser usados (Serizawa *et al*, 2006). Las interacciones electrostáticas pueden ser de atracción o repulsión dependiendo de las cargas de los polímeros, predominando las de atracción. Este tipo de interacciones se ve afectado por el pH y la fuerza iónica del sistema, por ejemplo, un aumento en la fuerza iónica del sistema disminuye la fuerza y la magnitud de estas interacciones (McClements, 2006). Para el caso de la nanoencapsulación por esta técnica, se utilizan polímeros con cargas opuestas al material a encapsular con el fin de generar las atracciones anteriormente nombradas (Serizawa *et al*, 2006; McClements, 2006).

1.2.2.3 Liposomas

La habilidad de atrapamiento de los liposomas de compuestos solubles en agua, ha sido empleada en farmacología y cosmetología. El encapsulamiento de antimicrobianos en liposomas ofrece una buena solución para protegerlos y garantizar su eficacia y estabilidad en las aplicaciones alimentarias (Were *et al*, 2003). El principio básico para la formación de liposomas es la interacción hidrofóbica / hidrofílica entre lípido/lípido y lípido moléculas del agua. El añadir energía (ultrasonificación, homogenización, agitación o calor) genera el arreglo de los lípidos en forma de vesículas bicapilares para asignar un equilibrio termodinámico en la fase acuosa (Mozafari, 2005). En la Figura 3 se puede ver la ilustración.

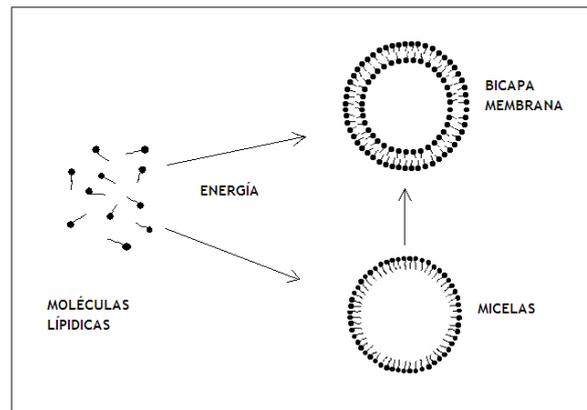


Figura 3. Formación de membranas. Modificada de Mozafari,2005.

Las propiedades funcionales de los acarreadores liposomáticos para encapsular antimicrobianos dependen de la interacción entre la membrana del liposoma y la membrana de la célula bacteriana. Se ha visto que la adición de nisina cargada positivamente a un anión fosfolipídico como el fosfatodiglicerol (DG) genera una interacción electrostática en donde al adicionarse liposomas neutros se generan interacciones hidrofóbicas (Colas *et al*, 2007; Xia *et al*, 2007)

1.2.2.4 Diálisis

Las nanopartículas formadas de copolímeros anfifílicos han sido evaluadas como acarreadores de fármacos hidrofóbicos (Xie y Wang, 2005). La coraza que se forma por los compuestos hidrofóbicos sirve como acarreador de medicamentos lipofílicos y estabiliza las partículas en dispersiones acuosas. La formación de partículas depende del método que se utilice. Los más usados son diálisis y diversos procedimientos de evaporación de disolventes (Adams *et al*, 2003). En el método de diálisis, el medicamento es añadido con el copolímero a un disolvente orgánico que tengan en común y sea miscible en agua. Después se repite la diálisis pero contra agua. En este paso es en donde se hace la encapsulación.

Aunque en el campo de los alimentos no hay trabajos que reporten la diálisis como técnica de encapsulación, los fundamentos de esta técnica pueden ser empleados para futuros trabajos como es el caso de Min *et al*, (2008) que obtuvieron nanopartículas de camptotecina, un medicamento hidrofóbico y anti cancerígeno. También se han generado nanocápsulas pero con diferentes tiempos de proceso y secado del producto final (Xie y Wang, 2005; Hornig y Heinze, 2007). Esta metodología es más eficiente y atractiva que otras, debido a que los productos son más estables en el tiempo y en diversos medios (Li y Szoka, 2007).

1.3 MICROENCAPSULACIÓN

La microencapsulación es un proceso en el que sustancias bioactivas (sabores, vitaminas, antioxidantes, antimicrobianos o aceites esenciales) de alto o bajo peso molecular son almacenadas en pequeñas cantidades introduciéndolas en una matriz o sistema pared para impedir su desgaste, para protegerlos de reacciones con otros compuestos presentes en el alimento o para impedir que sufran reacciones de oxidación debido a la luz o al oxígeno. Otra ventaja que ofrece la encapsulación es que un compuesto encapsulado se liberara gradualmente de la pared o matriz que lo ha englobado o atrapado y se obtienen productos alimenticios con mejores características sensoriales y nutricionales (Gharsallaoui *et al*, 2007; Champagne y Fustier 2007). La mayoría de procesos de encapsulación provienen de una emulsión.

1.3.1 Métodos de microencapsulación

Se han desarrollado diferentes técnicas para la producción y obtención de microcápsulas. En general, todas estas metodologías se pueden dividir en tres grandes grupos: A) Procesos físicos: secado por aspersión, extrusión y recubrimiento por aspersión. B) Procesos fisicoquímicos: coacervación simple o compleja y atrapamiento en liposomas. C) Procesos químicos: polimerización interfacial e inclusión molecular. La selección del proceso de encapsulación según la aplicación que se le vaya a dar tiene en cuenta el tamaño medio de la partícula requerida y las propiedades fisicoquímicas del agente encapsulador y la sustancia a encapsular; las aplicaciones para el material microencapsulado, el mecanismo de liberación deseado y el costo (Jafari *et al*, 2008b).

1.3.1.1 Aspersión por enfriamiento o congelamiento

En esta técnica, el material a encapsular es mezclado con el acarreador y es atomizado en aire frío. Las microcápsulas son producidas por atomización de la emulsión o suspensión que contiene el material pared y la sustancia activa sólida o líquida. Las sustancias que se usan como coberturas en la mayoría de los casos son aceites vegetales (Teunou y Poncelet, 2005). La reducción de la temperatura produce una solidificación del lípido pared y el atrapamiento de la sustancia activa en el centro de la cápsula, consiguiendo casi siempre microcápsulas insolubles en agua (Madene *et al*, 2006).

1.3.1.2 Extrusión

La microencapsulación por extrusión, involucra el paso de una emulsión del material activo y el material pared (más la adición de algún lípido) a través de un dado a alta presión. La extrusión constituye el segundo proceso más usado, después del secado por aspersión; específicamente es utilizado para la encapsulación de sabores. Un proceso típico involucra la mezcla de sabores con jarabe de maíz o almidón

modificado caliente, extrudiendo la mezcla en forma de esferitas (pellets) dentro de un baño con un disolvente frío como el isopropanol. El disolvente frío solidifica el jarabe en un sólido amorfo, envolviendo los compuestos que imparten sabor. Los sabores extrudidos proporcionan una mayor vida de almacenamiento comparados con los que no son encapsulados. Las condiciones de temperatura, flujo de alimentación y volumen a encapsular son los parámetros más importantes en el resultado; aún así, presenta muchos inconvenientes en el producto tales como hendiduras, paredes delgadas o poros en la estructura de la coraza (Yuliani *et al*, 2006).

1.3.1.3 Cobertura por lecho fluidizado

Esta tecnología es caracterizada por tener buenas propiedades de mezclado así como una eficiente transferencia de calor y masa además de una distribución de temperatura uniforme en el lecho. En esta operación se suspenden las partículas sólidas que se quieren encapsular en una corriente de aire a alta velocidad dentro de una cámara con temperatura y humedad controladas, donde el material pared es atomizado. La cantidad de partículas cubiertas depende de la longitud de la cámara y del tiempo de residencia dentro de ésta. La técnica es aplicable a coberturas que funden fácilmente como aceites vegetales hidrogenados, estearinas, ácidos grasos, emulsificantes, ceras o coberturas solubles como almidones, gomas y maltodextrinas (Rosenkranz *et al*, 2007). En la encapsulación de sólidos pequeños, las partículas se fluidizan con un gas o un líquido.

1.3.1.4 Atrapamiento en liposomas

Como se mencionaba en la sección 1.2.2.3 el principio básico para la formación de liposomas es la interacción hidrofóbica / hidrofílica entre lípido/lípido y lípido moléculas del agua (Mozafari, 2005). Se han utilizado en la liberación de medicamentos y se conforman de una o más capas de lípidos permitidos en el procesamiento de alimentos; la permeabilidad, estabilidad, actividad superficial pueden variar con el tamaño y la composición del lípido pared.

Existen tres tipos de liposomas: multilamelar, vesículas de un compartimiento y macrovesículas. La sonicación permite la formación de las primeras, mientras que las macrovesículas son formadas por inyección de soluciones de lípido en una solución reguladora de fosfatos. Los liposomas pueden obtenerse con cargas positivas por la adición de aminas o con cargas negativas por la adición de fosfatidil serina o diacetil fosfato. Sustancias hidrofílicas e hidrofóbicas pueden ser encapsuladas en liposomas; los compuestos hidrofílicos se disuelven en agua y se mezclan con una película lipídica para formar liposomas, mientras que los materiales hidrofóbicos se embeben en una película delgada de lípido. La liberación del principio activo se realiza por difusión a través de la pared que puede ser de una o dos capas de lípidos; por destrucción de la vesícula, dada una concentración crítica de iones o por un cambio

de pH. Se pueden añadir algunas sustancias para reducir la permeabilidad de la membrana e incrementar la estabilidad de los lípidos en la bicapa tales como el colesterol y tocoferoles (Taylor *et al*, 2007).

1.3.1.5 Coacervación

En una solución coloidal, las cargas pueden orientarse formando puentes que dan origen a una disminución de la solubilidad del coloide; como consecuencia una parte del coloide puede separarse en una nueva fase, convirtiendo al sistema en bifásico. La fase rica en coloide es un estado disperso que aparece como gotas de líquido amorfo, a las que se les denomina gotas de coacervado. La coacervación puede iniciarse de diferentes formas: cambios de pH, temperatura o adición de una segunda sustancia como una sal iónica; este método es eficiente pero costoso. Para el proceso de microencapsulación se han usado algunos biopolímeros como coberturas (goma arábiga y grenetina). La microencapsulación por coacervación requiere que el material a encapsular y el material pared se mezclen; la cobertura se deposita sobre el material activo (Madene *et al*, 2006).

1.3.1.6 Polimerización interfacial

Este método involucra la disolución de un monómero hidrofóbico polimerizable en un material activo hidrofóbico. La mezcla se dispersa en una fase polar y un catalizador provoca la polimerización del monómero; el polímero es insoluble en la sustancia activa hidrofóbica y se deposita como pared alrededor de la sustancia activa (Kobaslija, 2006). Los polímeros que forman coberturas adecuadas son poliéster, poliamidas, poliuretanos y poliureas. La polimerización interfacial ocurre entre monómeros disueltos en sus respectivas fases inmiscibles; los monómeros solubles se dispersan en la fase acuosa por medio de agitación, la membrana de la cápsula se forma por la adición de un monómero orgánico soluble en la fase continua u orgánica. Las membranas poliméricas de poliaminas, nylon, poliéster o polifeniléster se producen por la reacción entre un monómero soluble en agua, como poliamina, L-lisina, 1,6-hexametilendiamina, piperidina, o polifenol y un monómero soluble en medio orgánico como sebacoil cloruro, 2,2- dicloroéter (Park y Chang, 2000).

1.4 LOS ANTIOXIDANTES

Se denominan antioxidantes a todos aquellos compuestos que tienen como función eliminar los radicales libres. Los radicales libres son átomos o moléculas que tienen uno o más electrones no apareados; éstos son inestables y tratan de llenar las vacantes electrostáticas. Los radicales de oxígeno centrados bajo metabolismo normal aeróbico son llamados especies reactivas de oxígeno. Bajo condiciones normales el 1% de estas especies escapa del control metabólico y puede atacar cualquier componente bioactivo de la célula (Berger, 2005). Los antioxidantes actúan a través de diferentes mecanismos; neutralizan los

radicales, reducen la concentración de peróxidos y reparan membranas oxidadas entre otras formas. Pueden ser definidos como cualquier sustancia capaz de retardar o prevenir el desarrollo de rancidez u otros sabores deteriorativos durante la oxidación (Rodríguez *et al*, 2007). La prevención de esta clase de reacciones se ha estudiado extensivamente a través de la microencapsulación; sin embargo, se ha encontrado que para poder asignar un control en la liberación de los compuestos es mucho más eficiente el uso de tecnologías de nanoencapsulación o encapsulación de sustancias nano (Mozafari *et al*, 2006). Dentro de los antioxidantes más importantes están los tocoferoles.

1.4.1 α -Tocoferol (AT)

La definición química de la vitamina E es relativamente compleja ya que incluye dos grupos grandes de moléculas: los tocoferoles y los tocotrienoles, cada uno de ellos como treinta y dos esteroisómeros. La familia de los tocoferoles esta compuesta por incluye cuatro sustancias: AT (vitamina E en el sentido estricto de la palabra), β -tocoferol, γ -tocoferol y δ -tocoferol. La estructura química de los tocoferoles se caracteriza por una cadena de carbonos que se une a un anillo aromático, llamado cromano, con un grupo hidroxilo y una cadena polipropenoide saturada. En los tocotrienoles, la cadena de carbonos es insaturada. Mientras que el AT tiene tres grupos metilo y es el más activo, el β -tocoferol y γ -tocoferol tienen dos grupos metilo y el δ -tocoferol sólo un grupo metilo, este último es el más potente, pero el menos efectivo (Ubaldi *et al*, 2005).

El AT es uno de los componentes más efectivos de la Vitamina E y es un antioxidante que se encuentra en su mayoría en alimentos de origen vegetal. Este compuesto evita la oxidación de las lipoproteínas o transportadores en sangre del colesterol y de otras sustancias vinculadas con el desarrollo de ciertos tipos de cáncer (Brunelleschi *et al*, 2007).

El AT es liposoluble y esencial para el organismo, es un antioxidante que ayuda a proteger los ácidos grasos. Así mismo, cuida al organismo de la formación de moléculas tóxicas resultantes del metabolismo normal como de las ingresadas por vías respiratorias o bucales. Evita la destrucción anormal de glóbulos rojos, evita trastornos oculares, anemias y ataques cardíacos. Se encuentra principalmente en la yema de huevo, aceites vegetales germinados (soya, cacahuete, arroz, algodón y coco). Vegetales de hojas verdes, cereales y panes integrales (Lunn, 2007; Blacke, 2007). La estructura del AT se presenta en la Figura 4.

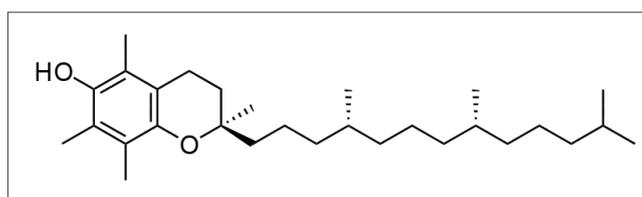


Figura 4. Estructura molecular del α -Tocoferol.

1.5 CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES ENCAPSULADOS

La caracterización de polvos se basa en la descripción de propiedades físicas y químicas involucrando factores como: composición (contenido de humedad, actividad de agua); tamaño y distribución de tamaños de partícula; forma y textura entre otros (Barletta y Barbosa, 1993; Barbosa *et al.*, 2005a). El tamaño de partícula es uno de los principales factores en la caracterización de polvos. Aunque los tamaños comunes oscilan entre 50 a 1000 μm (Marabi *et al.*, 2007), la nanotecnología ha conseguido desarrollar tamaños menores a una μm en el campo de los alimentos a través de diferentes técnicas como la microfluidización (Quintanilla-Carvajal *et al.*, 2009). Caracterizar partículas de este tipo no es fácil e implica describirlas en términos de sus propiedades a través de técnicas espectroscópicas o microscópicas (Perea-Flores *et al.*, 2010). Las características físicas de las partículas individuales son principalmente determinadas a través del material de origen (Peleg and Normand, 1987) y posteriormente por el procesamiento al que se les haya sometido (Meraz-Torres *et al.*, 2011). El tamaño (de nm a mm) y la forma están relacionadas con las propiedades físicas y funcionales de los polvos que finalmente afectan otro tipo de propiedades como el flujo o la humectabilidad (Dumoulin, 2008; Meraz-Torres *et al.*, 2011).

1.5.1 Factores determinantes en la caracterización de polvos

1.5.1.1 Tamaño y distribución de la partícula

En las últimas décadas la caracterización microscópica ha sido altamente utilizada para relacionar parámetros microestructurales de los alimentos (Muñoz-Herrera *et al.*, 2010). Alamilla *et al.*, (2005), sugirieron que la caracterización de la irregularidad de polvos obtenidos por secado por aspersión puede darse a través del análisis fractal. Aunque la microestructura de partículas deshidratadas se ha estudiado por medio de la microscopia, la aplicación de Microscopia Electrónica de Barrido ha resultado ser una herramienta útil, que permite la observación de estas estructuras a mayor detalle (Aguilera *et al.*, 1999; Chanona *et al.*, 2003; Alamilla *et al.*, 2005; Acevedo *et al.*, 2008). De la misma manera otras técnicas como la Microscopia Electrónica de Barrido ambiental o la Microscopia Confocal han permitido mayores aplicaciones para el análisis de materiales biológicos como los alimentos (Quintanilla-Carvajal *et al.*, 2009; Perea-Flores *et al.*, 2010). La morfología y la composición de la superficie de los polvos se debe caracteriza como uno de los principales factores que determinan propiedades funcionales. (Kim *et al.*, 2003; Acevedo *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2008; Meraz-Torres *et al.*, 2011).

1.5.1.2 Humedad

La humedad afecta las propiedades físicas de los polvos afectando la composición química, características sensoriales y propiedades de flujo de los alimentos. Alimentos con bajo contenido de humedad presentan

una mayor estabilidad microbiológica (Tewa *et al*, 2007). En el caso de polvos, el contenido de humedad es lo suficientemente bajo que no permite la proliferación de microorganismos y proporciona estabilidad al producto durante su almacenamiento (Lekago y Dunford, 2010). Otros trabajos como el de Flores-Andrade *et al*, (2009) sugieren que la mayor estabilidad de un alimento se dará cuando los mecanismos de difusión del agua sean controlados por la entropía integral del sistema.

1.5.1.3 Actividad de agua (A_w)

La actividad de agua de un alimento relaciona la presión de vapor del agua en el alimento con la presión de vapor del agua pura. Es muy útil para indicar la estabilidad de un producto y también es considerada una medida indirecta del agua disponible en un producto para participar en diferentes reacciones deteriorativas y de crecimiento microbianos (Laroche *et al*, 2005).

1.5.1.4 Potencial Z

Es uno de los parámetros fundamentales que controla la interacción de las partículas en suspensión; cuando partículas cargadas se aproximan entre ellas el que se repelan o no depende del equilibrio entre las fuerzas de atracción experimentadas en todos los cuerpos y de las fuerzas de repulsión determinadas por la magnitud del potencial. En otras palabras, el potencial Z es la medida de la fuerza eléctrica que existe entre átomos, moléculas y partículas en un líquido. Cuanto mayor sea esta fuerza dispersora, mayor estabilidad tendrá la solución y mayor será su capacidad para acarrear partículas en suspensión; o capacidad de carga (González *et al*, 2007; Luo y Gu, 2007; Kaszuba *et al*, 2008).

1.5.2 Herramientas para la caracterización de materiales encapsulados

1.5.2.1 Microscopia

La caracterización de alimentos como técnica de estudio ha ido creciendo a la par de diferentes tipos de técnicas como lo son la microscopia y el análisis de imágenes (Perea-Flores *et al*, 2010). Algunas de las técnicas más utilizadas en el campo de los alimentos a partir de la estandarización de técnicas en materiales o histología, son la Microscopia de Luz, la Microscopia Confocal de Barrido Laser y la Microscopia Electrónica de Barrido Ambiental (James y Smith, 2009).

El microscopio de luz fotónica es un instrumento que permite el paso de luz visible transmitida a través de la muestra por medio de uno o más lentes para permitir una vista ampliada de la muestra. El nivel de observación supera al de los humanos en un factor de 10^3 . Su resolución máxima puede ser de unos 200nm en condiciones adecuadas y con ayuda del aceite de inmersión (Abramowitz y Davidson, 2007).

La Microscopía Confocal de Barrido Láser (“*CLSM*” por sus siglas en inglés) es una técnica relativamente nueva. En este caso la fuente de luz es un rayo láser, una unidad de escaneo y un agujero en el plano focal posterior que mejora la profundidad de enfoque. El “*CLSM*” de nuevo desarrollo es particularmente adecuado para la adquisición de imágenes para conseguir una exploración a diferentes planos focales (Dürrenberger *et al*, 2001). Por lo tanto, moviendo el plano focal del instrumento por los pasos de distancia definida (alcance) a través de la profundidad de la muestra, se pueden grabar una pila de secciones ópticas. La aplicación de “*CLSM*” a los materiales de alimentos ha sido particularmente fructífera en el área de los componentes de los lípidos o grasas ya que son susceptibles de tinción fluorescente (Aguilera *et al*, 2000). La posibilidad de combinar “*CLSM*” con otros tipos de mediciones y análisis técnicos en los mismos experimentos con etapas diseñadas, ofrece la posibilidad de obtener información estructural detallada de los sistemas alimentarios complejos (Dürrenberger *et al*, 2001).

En la Microscopía Electrónica, un haz de electrones, se utiliza para formar una imagen magnificada de muestras e incrementan mil veces el poder de resolución respecto a las Microscopía de Luz Fotónica o la Microscopía Confocal. Cuando un haz de electrones interactúa con la muestra, se generan una variedad de señales que pueden ser capturadas para obtener las imágenes. Los dos tipos básicos de microscopios electrónicos son el microscopio electrónico de transmisión (“*TEM*” por sus siglas en inglés) y el microscopio electrónico de barrido (“*SEM*” por sus siglas en inglés). Hoy en día, la técnica de microscopía electrónica ha sido un herramienta útil para la investigación de las microestructuras de los granos de cereales, pasta, carne entre otros (Witek *et al*, 2010). Uno de los últimos avances en microscopía electrónica es el microscopio electrónico de barrido ambiental (“*ESEM*” por sus siglas en inglés), que permite ver objetos suaves y húmedos, materiales no conductivos, sin tratamiento previo diferenciándose de la Microscopía Electrónica de Barrido, en el que las muestras deben ser sólidas, secas y por lo general conductoras de electricidad (Stokes, 2003).

1.5.2.2 Análisis de imágenes

El análisis de imágenes se ha aplicado en las diferentes ciencias biológicas y de materiales para evaluar cuantitativamente la morfología, la estructura y la microestructura de los alimentos (Chanona *et al*, 2008). El análisis de imágenes, consiste en extraer información de dibujos o fotografías que proporcionen datos cuantitativos para el análisis y diseño de la microestructura de alimentos (Campos *et al*, 2007). Una imagen digital no es nada más una colección bidimensional de datos; de una manera más profunda se entiende que una imagen es la distribución espacial de la respuesta espectral de los elementos que componen una escena. Por consiguiente, el tratamiento o análisis de imágenes se puede concebir como un conjunto bien definido y clasificado de técnicas y operaciones que permiten manipular una imagen con el objeto de describir cuantitativamente diversas propiedades tales como las morfométricas y colorimétricas

(Quintanilla-Carvajal, 2007), sin la necesidad de la manipulación humana (Gutiérrez *et al*, 2008), disminuyendo o aumentando la escala o resolución (Quevedo *et al*, 2002;).

El conocimiento sobre un objeto se obtiene a través de su caracterización, información que se utiliza posteriormente para la elaboración de modelos descriptivos; la clasificación de un objeto específico perteneciente a una imagen es la decisión por la cual se determina la categoría a la cual pertenece; tales decisiones son delimitadas por lo que se conoce como “descriptores”. El conocimiento de un objeto, por ende, implica su clasificación (Pedreschi *et al*, 2004).

1.5.2.2.1 Adquisición de imágenes

Se sugiere seguir una metodología específica que consta de cinco pasos de los cuales el primero es la adquisición de la imagen. Ésta puede obtenerse a través de cámaras digitales, escáneres o microscopios. Es importante cuidar la estandarización de los factores que pueden influir en la imagen como la iluminación o la distancia entre los objetos y la luz (Pedreschi *et al*, 2004).

1.5.2.2.2 Procesamiento

En este paso se mejora la información de la imagen realizando los valores que más información aportarán al análisis a través del cambio a escala de grises y de la utilización filtros que mejoran la transformación de los datos (Aguilera, 2001).

1.5.2.2.3 Segmentación de la imagen

La segmentación divide la imagen en regiones o categorías que corresponden a distintos objetos o partes, clasificando todos los píxeles (0 es blanco y 1 negro) para así poder extraer la parte de la imagen donde se encuentra la información de interés para el estudio (Pedreschi *et al*, 2004).

1.5.2.2.4 Extracción de parámetros de la imagen

Hace referencia a la extracción de las características estructurales de los objetos en las imágenes como tamaño, forma, color y textura (Pedreschi *et al*, 2004).

En el análisis de imágenes se pueden evaluar diferentes características morfométricas, conocidas también como descriptores; los descriptores se pueden dividir en tres grupos: los de dimensionalidad, que permiten a través de los programas de cómputo específicos, la medición de diversas características del objeto tales como área, perímetro, diámetro de Feret, longitud máxima entre otros; los de forma que

describen la representación gráfica del objeto de estudio con referencia aproximada a una figura geométrica Euclidiana; entre éstos se encuentran los factores de forma circular y elíptica, excentricidad, esfericidad y convexidad y finalmente los de textura que proporcionan la información suficiente para describir la regularidad de un objeto; por ejemplo la compacidad, rugosidad y sinuosidad (Lira, 2002).

Se han aplicado numerosos descriptores para interpretar los cambios en la textura de alimentos cuando son procesados; en la biotecnología vegetal y en el cultivo de células vegetales para determinar la relación entre agregados celulares, en la producción de flavonoides (Jiménez *et al*, 2005) entre otros (Alamilla *et al*, 2005; Chanona *et al*, 2008; Perea-Flores *et al*, 2010; Camacho *et al*, 2010) y en la cuantificación de pigmentos en los que se reportan resultados significativos utilizando las coordenadas RGB (Miyayama *et al*, 2000).

Generalmente el conocimiento más preciso en cuanto a la morfología del objeto que se está analizando, se obtiene con el uso de por lo menos uno o más descriptores de cada una de las categorías. A continuación se definirán algunos de los descriptores de mayor utilidad:

- Área: número de píxeles (bajo cierta conectividad) que forman un objeto por la escala a la cual se le observa (Meraz-Torres *et al*, 2011).
- Compacidad o compactación: Si la medida se aproxima a 4π se asemeja a un círculo y es mayor para objetos elongados.
- Factor de Forma: generalización de la idea que se tiene a través de la psicovisión para figuras geométricas regulares (Barbosa *et al*, 2005a; Barbosa y Juliano, 2005). Si es irregular se recurre a la dimensión fractal.
- Perímetro: para definir el perímetro es importante establecer la conectividad que guardan los píxeles que lo componen. Cuando la conectividad es de 4, el perímetro es el número de lados que tienen los píxeles del borde del objeto; en conectividad 8, el perímetro es la distancia entre los puntos concéntricos de cada uno de los píxeles que bordea el objeto multiplicando también por la escala a la cual se observa este.
- Rugosidad del perímetro: se calcula por la distribución de curvaturas de la frontera de un objeto y se emplea para caracterizar un aspecto geométrico de la forma del mismo (Quintanilla-Carvajal, 2007)
- Longitud máxima: Es la distancia entre los dos puntos más alejados del objeto (Quintanilla-Carvajal, 2007)

1.5.2.2.5 Clasificación

Finalmente se utiliza la información cuantitativa para clasificar los objetos identificados de las imágenes) (Pedreschi *et al*, 2004)

1.5.2.3 Dimensión fractal

Por otro lado, en algunos campos del conocimiento, los cambios morfológicos que sufren los sujetos de estudio, no han podido ser explicados satisfactoriamente debido a que se han intentado resolver a la luz de la Teoría Euclidiana sin tener presente que la mayoría de éstos, como en el caso de los objetos que existen en la naturaleza, son fractales (Chanona *et al*, 2001). Tal es el caso de hojas en vegetales, estructuras coralíferas, formas de nubes, los alvéolos pulmonares, la forma de las flores, etc.; incluso algunos procesos tales como el movimiento browniano, ciertas reacciones enzimáticas, fenómenos de transición vítrea y procesos de encogimiento en secado de alimentos son de naturaleza fractal. La dimensión fractal puede ser utilizada como medio de evaluación, comparación y caracterización de productos ya encapsulados o compuestos a encapsular bajo diferentes condiciones de elaboración (Meraz-Torres *et al*, 2011)

En la mayoría de los campos del conocimiento han surgido situaciones que al ser analizadas no han podido ser explicadas satisfactoriamente debido a que se han intentado resolver a la luz de la teoría Euclidiana, sin tener presente que la mayoría de las figuras existentes son fractales y los fenómenos no lineales (Chanona *et al*, 2001). La palabra fractal viene del latín “*fractus*” que significa roto, y el correspondiente verbo en latín “*frangere*” significa romper para crear fragmentos irregulares; fue introducida por Mandelbort en 1975 para caracterizar aquellos fenómenos espaciales y temporales que son continuos pero no definidos.

En la geometría Euclidiana un punto tiene una dimensión de orden 0, una línea dimensión de uno, un área de dos y finalmente un volumen tiene una dimensión de tres. La teoría fractal propone diferentes métodos para describir la irregularidad inherente de cualquier objeto o fenómeno de la naturaleza, sin importar que tan lejano o cercano pueda estar a una figura geométrica regular o un movimiento armónico. Este proceso de descripción es caracterizado por un parámetro conocido como dimensión fractal (D_f) (Kenkel y Walker, 1996).

Existen diversas maneras de estimar la dimensión fractal de un objeto; la selección del método a utilizar dependerá del conocimiento que se quiera alcanzar. Los métodos más utilizados son los de: Conteo de cajas y Relación área-perímetro (Jiménez *et al*, 2005). A continuación se presentan algunos ejemplos:

- a) Dimensión fractal de contorno (D_{fc}) que se puede determinar con diversos algoritmos por el método de conteo de cajas (“*box-counting*”). Para ello, a imágenes binarizadas (2 bits) se les separa del contorno y se evalúa con un tamaño de cajas tal que se vaya incrementando en una progresión geométrica (Lira, 2002).

- b) Dimensión fractal de perímetro (Dfp) que se puede determinar a través del gráfico del logaritmo natural del área contra el logaritmo natural del perímetro máximo del objeto a estudiar; a la regresión lineal obtenida se le determina la pendiente (m) y la Dfp se obtiene con $1 + m$ determinando al perímetro como la variable dependiente y al área como la independiente (Jiménez *et al*, 2005).

La morfología de la superficie de algunas partículas de origen biológico puede describirse en términos de su dimensión fractal. La aplicación se da en productos deshidratados y en los procesos que causan rugosidad o aislamiento de las partículas cuando son tratadas con alguna sustancia que modifique su superficie. Lo anterior puede aplicarse a la descripción y caracterización de cápsulas sometidas a un proceso de extracción. El tener índices cuantitativos para la descripción de materiales biológicos en polvo; proporciona parámetros que permite mejorar las características del producto y mejorar el control de procesos (Chanona *et al*, 2001).

2. JUSTIFICACIÓN

La microencapsulación de compuestos nano en el campo de los alimentos, permite la creación de productos con mejores características sensoriales y nutricionales. Sin embargo la encapsulación de componentes estructurados a escalas nano no ha sido aún estudiado, ni tampoco la relación que se entre los diferentes parámetros que influyen en este proceso, es por esto que través del estudio de procesos como la encapsulación de compuestos a partir de nanoemulsiones por secado por aspersión, se podrá determinar la distribución de los componentes encapsulados. Asimismo se conseguirá entender la influencia de las diferentes etapas que conlleva la encapsulación (elaboración de emulsión, homogenización y secado), en la eficiencia de los productos obtenidos evaluando parámetros como retención superficial o matricial.

Con esta investigación se podrá estudiar el proceso de encapsulación de AT para evaluar la influencia de las variables del proceso tales como la formación emulsiones de tamaño nano, el análisis de las propiedades morfométricas de los polvos obtenidos a partir de estas y su relación con la eficiencia de encapsulación a través de parámetros como tamaño medio de partícula, forma y color con la ayuda de herramientas espectroscópicas, químicas y físicas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la distribución de AT en microcápsulas obtenidas a partir de nanoemulsiones secadas por aspersión.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la influencia de parámetros como el material pared y el tamaño de emulsión en la distribución del AT en las cápsulas obtenidas en el secado por aspersión.
- Evaluar el efecto de la atomización en la distribución del AT en las microcápsulas obtenidas por secado por aspersión.
- Relacionar el efecto de la atomización con la eficiencia de la encapsulación según la distribución del AT.
- Evaluar la distribución y el acomodamiento del AT mediante técnicas de Microscopia Fotónica y Electrónica.
- Diferenciar el AT extraíble del AT encapsulado en las cápsulas obtenidas a través de secado por aspersión.
- Evaluar el efecto de la microfluidización en la distribución del AT en las microcápsulas.

4. HIPÓTESIS

Se puede determinar la cantidad y distribución de AT en cápsulas obtenidas a través de secado por aspersión y determinar la influencia de la atomización y la microfluidización en dicha distribución a través de técnicas microscópicas y analíticas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MATERIALES

5.1.1 Reactivos

- (\pm) α - Tocoferol (AT) grado HPLC de Sigma Aldrich (Estados Unidos Americanos)
- Goma arábica de Alfred L. Wolf S.A de C.V. (México, Miguel Hidalgo)
- Maltodextrina 20 DE de Qulmica LEFE S.A de C.V. (México, d.f)
- Cloroformo J. T, Sigma Aldrich
- Anisol
- Cloroformo Deuterado J. T Baker
- Sulfato de Sodio
- Isopropanol J. T Baker
- Hexano J. T Baker
- Agua destilada
- Agua Tipo I
- Metanol grado HPLC J. T Baker

5.1.2 Equipos

- Boquilla de aspersión neumática de doble fluido marca Spraying Systems Co., Estados Unidos Americanos.
- Secador por Aspersión experimental SPA-GA960, México (Alamilla *et al*, 2001).
- Homogenizador Broun, México.
- Microfluidizador M110Y marca Microfluidics, Reino Unido.
- Malvern Zetasizer Nano 90S, Reino Unido.
- Rotovaporador R250, Buchi, Suiza.
- RMN de 500 MHz Varian NMR System, Estados Unidos Americanos.
- Aqualab, modelo Decagon, marca Pullman, Estados Unidos Americanos.
- Balanza Analítica marca Ohaus, modelo Explorer, Estados Unidos Americanos.
- Estufa, marca Equipar, modelo Precision, Estados Unidos Americanos.
- Microscopio electrónico de barrido ambiental XL30 ESEM Phillips, Estados Unidos Americanos.
- Microscopio óptico, marca Nikon, modelo Eclipse 50 I, Japón.
- Microscopio de barrido confocal laser LSM 710. Carl Zeiss, Alemania.

5.1.3. Programas de cómputo

- Corel Photo-Paint v. 10.41 (Corel Corporation y Corel Corporation Limited, USA)
- ImageJ v. 1.34s (National Institutes of Health, Bethesda, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>)
- SigmaScan Pro 5.0 (SPSS Science, Chicago, Ill. Inc.)

- Design Expert v.8.0 (Minneapolis, USA)

5.2 METODOLOGÍA

La metodología desarrollada, se presenta en el diagrama de flujo de la Figura 5.

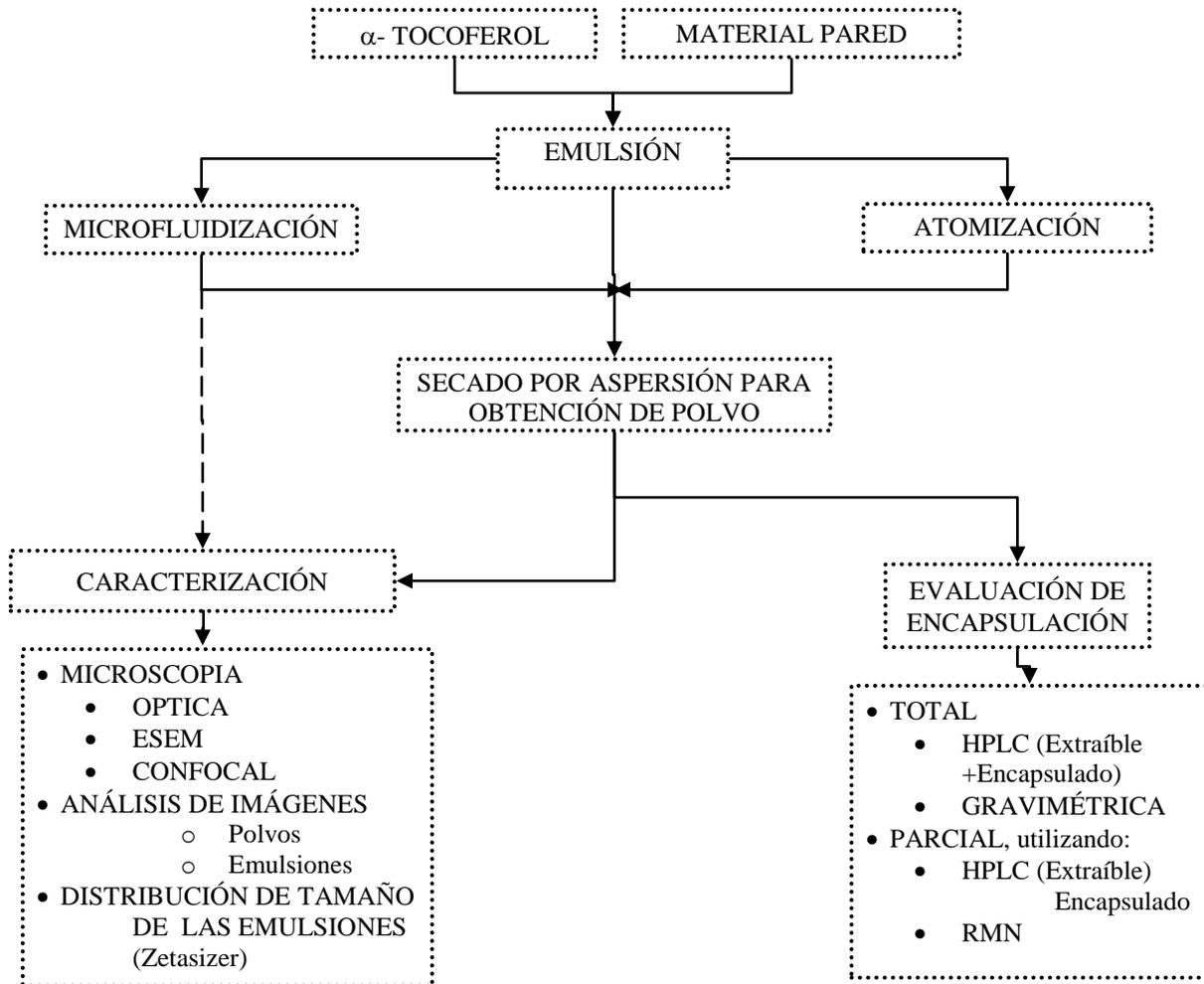


Figura 5. Diagrama de flujo del trabajo experimental

5.3 EFECTO DE LA ATOMIZACIÓN EN LA DISTRIBUCIÓN DEL α -TOCOFEROL

5.3.1 Preparación de las emulsiones

Se prepararon diferentes emulsiones variando la composición entre los materiales de pared (maltodextrina 20 DE y goma arábiga) y el AT como lo muestra el Cuadro 2. Inicialmente se preparó una solución en agua tipo I, posteriormente se agregó el AT y se completó una disolución al 20% en solutos que se homogenizó con un mezclador de cuchillas Braun (D.F, México), durante 360 segundos. Todas las emulsiones se elaboraron completando la misma cantidad de volumen y a temperatura ambiente. Las 5 combinaciones de material pared y material a encapsular que se desarrollaron, cumplen con lo que sugiere

la literatura: relaciones de materiales de pared: material lipídico 5:1-2.5:1 (González *et al*, 2007; Pérez *et al*, 2003). Al producto de este proceso se le llamó Pre-Emulsión (PE).

Cuadro 2. Diferentes proporciones utilizadas para elaboración de emulsiones

Partes de Maltodextrina	Partes de Goma Arábica	Partes de α -Tocoferol
3	2	1
3	2	2
3	1	1
2	2	1
2	1	1

5.3.2 Homogenización por medio de Atomización

A este proceso se le llamó Etapa 1. Se alimentó la PE a una boquilla de aspersión de doble fluido 1/8JN-SS (Spraying Systems Co, USA) con aguja limpiadora, utilizando un flujo de 1.14 L/h y una presión de aire de 0.00012 Kg/m² (Alamilla *et al*, 2005). El proceso se efectuó a una temperatura promedio de 8°C. Al producto de este proceso se le llamó Emulsión A (EA1). Como este proceso se planteó con el fin de evaluar el efecto que tiene la atomización como proceso de homogenización en el polvo obtenido (Coulter, 1951) se comparó con un segundo procedimiento en el que las PE no pasaron por esta etapa, este segundo proceso se denominó B.

5.3.3 Secado por aspersión

A este proceso se le llamó Etapa 2. La emulsión EA1 y una segunda emulsión PE, que no pasó por el proceso previo de atomización, se alimentaron al secador por aspersión a una temperatura de entrada de 190°C y de salida de 100°C; el secador SPA-GA960 está equipado con una bomba peristáltica para alimentar el líquido y un ciclón para la recolección de polvos. El secado por aspersión bajo estas características se ha estudiado ampliamente (Akagi *et al*, 2007; Alamilla-Beltrán *et al*, 2001; Jafari *et al*, 2007; Jafari *et al*, 2008a; Jinapong *et al*, 2007; Luo and Gu, 2007; Luo and Zhoe, 2004; Su *et al*, 2007; Moinard-Chécot *et al*, 2008; Tonon *et al*, 2008; Takashima *et al*, 2007). Las emulsiones asperjadas en esta etapa se llamaron por lo tanto EA2 y EB2. La Figura 6 ilustra los dos procesos.

5.3.4 Contenido de humedad

La humedad de los polvos de los procesos A y B (PA y PB respectivamente) se determinó mediante el método termogravimétrico utilizando una termobalanza (Brainweigh), de acuerdo al método AOAC 32.1.02 (AOAC, 1995).

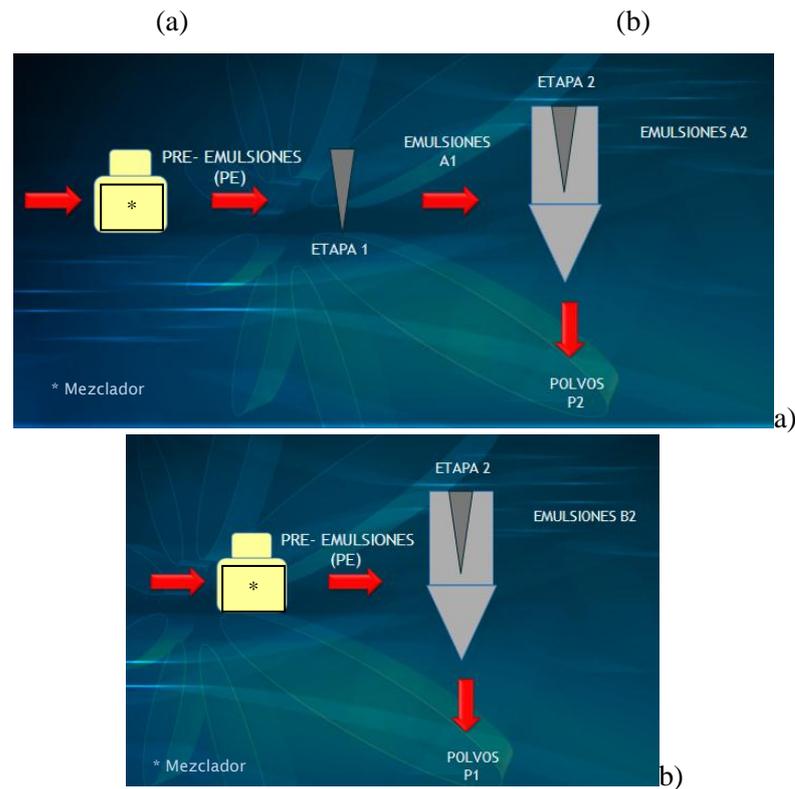


Figura 6. Diagrama de los procesos A (a) y B (b)

A: (Pre-emulsión, homogenización fuera del secador y aspersión dentro del secador)

B: (Pre-emulsión y aspersión dentro del secador)

5.3.5 Determinación de actividad de agua (a_w)

La determinación de la actividad de agua (a_w) de los polvos se realizó por medio del Equipo Aqualab (Decagon, Pullman, USA). Se tomaron lecturas por triplicado de cada uno de los polvos (Yu *et al*, 2008).

5.3.6 Evaluación de la encapsulación

Se desarrollaron diferentes metodologías con el fin de fortalecer los resultados y validar la técnica propuesta y así mismo, diferenciar por balance de materia la cantidad de AT en la superficie e interior de la cápsula. La eficiencia de encapsulación (EE) se determinó como la relación entre el AT cuantificado en los polvos y el AT teórico de las emulsiones como lo representa la ecuación.

$$EE = \frac{(AT \text{ cuantificado}) \times 100}{AT \text{ total}} \quad (1)$$

5.3.6.1 Resonancia Magnética Nuclear

Inicialmente se realizó una extracción del AT para los polvos analizados por esta técnica. La extracción del AT absorbido en la matriz de maltodextrina y goma arábiga se hizo usando 100 mg de muestra y 10

mL de cloroformo, extrayendo bajo agitación a temperatura ambiente durante 2 min. El proceso de extracción se realizó dos veces con 5 mL de cloroformo en cada ocasión, la suspensión resultante se filtró con algodón, para evitar el paso de material pared y se lavó agregando 2 mL más de cloroformo. Posteriormente se evaporó el disolvente a sequedad en el rotavapor Bucchi R 205 (Suiza) a presión reducida y a una temperatura de 50 °C. Para determinar la proporción relativa de AT en cada muestra, se utilizó una cantidad fija (10 μ L) de anisol como estándar interno, pesado directamente en el matraz donde se concentró el AT extraído. Cada mezcla se disolvió en 0.8 ml de CDCl_3 y enseguida se obtuvieron los espectros de RMN 1H correspondientes (Drush *et al*, 2006).

Posteriormente los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN 1H) se realizaron en un espectrómetro Varian modelo NMR System a una frecuencia de 500 MHz, usando CDCl_3 como disolvente y a una temperatura de 26 °C. Los desplazamientos químicos (δ) fueron dados en partes por millón (ppm) con respecto a la señal del tetrametilsilano (TMS), el cual se usó como referencia interna. Todas las muestras se analizaron por triplicado y los valores de integración descritos se obtuvieron del promedio de los tres espectros. Se adquirieron 8 transientes (NT) por cada muestra con un tiempo de adquisición (AT) de 2.05 s y un tiempo de espera de 20 s, ésto, para minimizar los efectos de relajación y obtener una mayor precisión en la integración.

La cantidad de AT presente en las muestras se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$W = \frac{Mn_eW_e}{I_enM_e} \quad (2)$$

M = Peso molecular de la muestra problema

M_e = Peso molecular del estándar

I = Intensidad de la integral de la muestra problema

I_e = Intensidad de la integral de estándar

n = No. De protones de la muestra problema

n_e = No. De protones del estándar

W_e = Peso del estándar

Posteriormente, el algodón que se utilizó para la filtración se lavó con 10 mL de agua y 2 mL de cloroformo. Se separaron las fases añadiendo 20 mL más de cloroformo y retirando humedad con 1 g de Na_2SO_4 . Finalmente, se cuantificó el AT restante por la misma técnica de rotoevaporación.

5.3.6.2 HPLC

Se evaluó la extracción del AT superficial y encapsulado utilizando la misma técnica de extracción descrita en el apartado 5.3.6.1. Se procedió, entonces, a evaporar el disolvente a sequedad en el rotavapor a presión reducida (33406.2 kPa) y a una temperatura de 50 °C. Se agregó 1 mL de metanol y se leyó en columna C18 con dimensiones de 4.6 x 250 mm con fase móvil de metanol a un flujo de 1 mL/min. El volumen de inyección fue de 20 μ L y un tiempo de retención de 5 min (Ubaldi *et al*, 2005).

5.3.6.3 Cuantificación total del α -tocoferol en los polvos

Se agregó un gramo de polvo a 4 mL de agua caliente (50 °C) y agitó por 2 min. A las soluciones resultantes se les adicionaron 45 mL de hexano/isopropanol (3:1v/v). La suspensión se agitó por 15 min y posteriormente se centrifugó otros 15 min a 1000 g. La fase orgánica se colectó y se llevó a sequedad en el rotavapor a presión reducida y a una temperatura de 50 °C hasta que el residuo de AT se mantuviera en peso constante y su total se determinó como cantidad de g de AT / g polvo (Kim *et al*, 2009^a; Kim *et al*, 2009b; Kim *et al*, 2009c).

5.3.6.4 Índice de atrapamiento

Para el análisis de los resultados obtenidos se propuso el cálculo del índice de atrapamiento (IA) de los polvos entendido como la relación entre el AT extraíble y el AT encapsulado.

$$IA = \frac{AT \text{ Extraíble}}{AT \text{ Encapsulado}} \quad (3)$$

5.3.6.5 Penetrabilidad (P)

Se determinó la distribución del AT en las polvos (Muestra 3:2:1) antes y después de la extracción del AT superficial. El polvo resultante de la extracción superficial del AT se recolectó en el algodón anteriormente mencionado de la sección 5.3.6.1. Se utilizó un Microscopio de Barrido Confocal Laser (LSM 710. Carl Zeiss). Los polvos se colocaron de forma homogénea en un portaobjetos y se les puso un cubreobjetos. Se seleccionó un aglomerado y se analizó en el equipo. Se excitaron a 405 nm con 4.0% de poder del laser, observándose así la auto-fluorescencia del AT con un objetivo 40X/10.8M27. Posteriormente se realizó un “*scan mode*” de “*z-stack*”. Se planteó el cálculo de la penetrabilidad (P) que relaciona el valor de la coordenada de color *Lab* “a”, de los diferentes cortes obtenidos en el z-stack, con el valor de la coordenada de color *Lab* “a máximo” que representa la mayor presencia de AT dentro de la cápsula. Posteriormente los valores de P se graficaron y se obtuvo un perfil del posicionamiento del AT.

$$P = \frac{\text{color "a"}}{\text{color "a" máximo}} \quad (4)$$

Se utilizó la coordenada de color “a” por ser la correspondiente al croma verde-rojo, y por ende la indicada para medir la cantidad de color verde.

5.3.7 Caracterización de las emulsiones y el polvo

Se tomaron alícuotas de 20 μ L de PE, de EA1 asperjada en la boquilla fuera del secador y de EA2 y EB2 asperjadas en la boquilla del secador; estas alícuotas se colocaron en un portaobjetos y evaluaron en microscopio óptico (Fery y Weinkamer, 2007; Zhao *et al*, 2008). Otros 2 mL al 20% de sólidos en peso, se analizaron en el Zetasizer Malvern Instruments 2000, con sus respectivas diluciones al 10 y 5%, encontrándose que la última fue la más adecuada para evaluar el diámetro hidrodinámico.

Los diferentes polvos obtenidos a partir de las emulsiones que pasaron 1 y 2 veces por boquilla (PB y PA respectivamente) se recolectaron y almacenaron a temperatura ambiente protegidos de la luz y del aire.

5.3.7.1 Estudio Microestructural

Microscopía Óptica

El polvo y las emulsiones se colocaron en portaobjetos para ser observadas en el microscopio óptico Nikon, Eclipse 50 I con iluminación halógena y apertura máxima. La captura de la imagen se realizó con una cámara digital (Nikon Digital Sight DS-2Mv, TV Lens 0.55X DS) conectada a una Computadora Personal (Intel Pentium R4, 2.666Hz, 2.679 Hz, 1.0GB y un disco duro de 140 GB.), en la que por medio del Software NIS-Elements F2.30 se capturaron 5 imágenes con un objetivo de 40X para obtener más de 1000 aglomerados. Las imágenes se adquirieron en blanco y negro a una resolución de 1600x1200 pixeles y finalmente se almacenaron en formato bmp.

Microscopia Electrónica de Barrido Ambiental

Para la evaluación del grosor de la pared de las cápsulas se realizó Microscopia electrónica de barrido ambiental con el Microscopio XL30 ESEM Phillips USA (Jian *et al*, 2007). Inicialmente se inmovilizó el polvo sobre cinta de carbono (Nem Tape. Double sized 12mm/2m Nijshin EM. Co., Ltda) en un portaobjetos y posteriormente se pegó otro trozo de cinta transversalmente para ser separada y finalmente adherida a otro portaobjetos para su posterior análisis en ESEM (Drusch y Berg, 2008). De la misma manera se obtuvieron micrografías de los polvos de los dos procesos (A y B) antes y después de la extracción superficial del AT a 500 y 2000X para la determinación de la dimensión fractal de textura.

También se tomaron micrografías a 3000X para determinar el grosor de las cápsulas (Soottitantawat *et al*, 2005). Este se determinó a las microcápsulas de 10 μm de tamaños promedio en los dos puntos más gruesos de la pared matricial.

Los polvos también se evaluaron en el microscopio óptico (**ceprobi**) con un filtro w-blue de longitud de onda de 430 nm para verificar la presencia del AT por la auto fluorescencia del mismo en las cápsulas (Mayer *et al*, 2001).

5.3.7.2 Estandarización de la imagen

Con el software Image J, se seleccionó el nivel de Threshold de manera manual con un intervalo de intensidad de 95-111, para definir el contorno de los aglomerados y emulsiones proporcionando una imagen binarizada con definición precisa. Ésto consistió en realizarles un cambio a escala de grises (8 bits). Posteriormente se les realizó el “fill holes” y finalmente se guardaron en formato *bmp. A estas imágenes se les realizó el procesamiento con el software Corel Photo-Paint, para eliminar el “ruido” a las imágenes. Éste proceso se realizó para todas las imágenes obtenidas de cada uno de los polvos de los dos procesos antes y después de la extracción del AT no encapsulado.

5.3.7.3 Morfometría

Las imágenes procesadas fueron evaluadas a través del software SigmaScan Pro v.5.0. Las imágenes se calibraron con una referencia tomada de la cámara de Neubauer (regla), capturada a la misma resolución (40X). Las mediciones lineales se obtuvieron en μm , mientras que las de área fueron en μm^2 . Los descriptores morfométricos se seleccionaron también de “settings”; fueron los siguientes: área, diámetro de Feret, perímetro, perímetro máximo y factor de forma. A partir de los resultados obtenidos del diámetro de Feret se determinó una distribución del tamaño de partícula muestral, respecto a las frecuencias (Perea-Florez *et al*, 2010).

5.3.7.4 Determinación de la Dimensión fractal

A aquellas formas que presentaron irregularidades en sus parámetros morfométricos (polvos), se les evaluó la relación área-perímetro. Los métodos que relacionan área-perímetro se utilizan generalmente para estimar la dimensión fractal (D) de los objetos (en este caso aglomerados) y evaluar su complejidad. Este método mide el grado en que los perímetros “llenen” un plano de dos dimensiones. La relación perímetro-área para un determinado conjunto de aglomerados está dada por (Kenkel y Walker, 1999):

$$P = kA^{\frac{D}{2}} \quad (5)$$

Donde el área A es el número de píxeles que componen un objeto determinado, el perímetro P es un recuento del número de píxeles de los bordes, y k es una constante de escala. La pendiente de la gráfica log-log área-perímetro de un conjunto de objetos da una “media” de la dimensión fractal (Burrough, 1986). Aglomerados con objetos perfectamente cuadrados tienen una dimensión fractal $D = 1$, mientras que los que contienen objetos de gran complejidad (alta perímetro: relación de área) tienen una dimensión fractal aproxima al 2. El método puede ser usado para determinar la relativa “irregularidad” de una imagen. Por aglomerados, la D se reduce a:

$$D = \frac{2\text{Log}(P)}{\text{Log}(A)} \quad (6)$$

Se determinó la Dimensión Fractal de contorno (DFc) de los polvos para los dos procesos (A y B) antes y después de la extracción.

Dimensión Fractal de textura (DFt). El procesamiento de imágenes consistió en realizar 15 selecciones, conocidas como “*crops*” o cortes de cada una de las imágenes a 500X y 2000X, estos crops se duplicaron y se realizó un cambio a escala de grises (8 bits), y posteriormente se procedió a su análisis. De las imágenes procesadas, se extrajo la dimensión fractal de textura la cual se obtuvo mediante el programa Image J, con el “*plugin*” “SDBC” (Chen *et al.*, 2003). Se evaluó para los polvos antes y después de la extracción del AT y particularmente para partículas lisas y rugosas de los dos procesos sin extracción.

5.4 EFECTO DE LA MICROFLUIDIZACIÓN EN LA DISTRIBUCIÓN DEL μ -TOCOFEROL

Para determinar el efecto de la microfluidización en la distribución del AT en las cápsulas se planteó un diseño experimental de superficie de respuesta de optimización con el programa Design Expert 8.0.5. Se utilizó un modelo de superficie de respuesta para determinar las diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. Los valores se consideraron significativamente diferentes ($p > 0.05$) para dos factores. La concentración del AT se determinó como el primer factor cuantitativo. Los ciclos de microfluidización se determinaron como el segundo factor categórico a 3 niveles: 0 ciclos, 1 ciclo y 2 ciclos. El cuadro 3 presenta las diferentes corridas que se desarrollaron del diseño experimental.

Finalmente, se propuso una ecuación para cada variable de respuesta y se propusieron diferentes niveles de optimización según estas. Las variables de respuesta que se analizaron fueron: eficiencia del % de encapsulación total del AT (% extraíble más % encapsulado), eficiencia del % de encapsulación total del AT (por técnica de Kim *et al.*, 2009c) % AT extraíble, % de AT encapsulado, coordenada de color “a”

máxima obtenida del análisis de imágenes de los polvos y tamaño de emulsión. Para los experimentos se utilizó un Microfluidizador M-110Y (Microfluidics, USA) con cámara de interacción “Y” de 7 μm y una cámara auxiliar de geometría “Z” en contracorriente. Las emulsiones se procesaron a una presión máxima de 10,000 psi en cada etapa.

Cuadro 3. Diseño experimental para determinar el efecto de la microfluidización en la distribución del α -Tocoferol en las cápsulas.

Experimento	Corrida	% α -Tocoferol	% Maltodextrina	% Goma arábica	Ciclos del microfluidizador
3	1	21.85	39.08	39.08	0
8	2	17.00	41.50	41.50	1
19	3	25.25	37.38	37.38	2
13	4	28.00	36.00	36.00	1
7	5	17.00	41.50	41.50	1
18	6	22.50	38.75	38.75	2
1	7	17.00	41.50	41.50	0
6	8	28.00	36.00	36.00	0
2	9	17.00	41.50	41.50	0
5	10	28.00	36.00	36.00	0
17	11	19.75	40.13	40.13	2
10	12	21.90	39.05	39.05	1
21	13	28.00	36.00	36.00	2
20	14	28.00	36.00	36.00	2
11	15	24.98	37.51	37.51	1
16	16	17.00	41.50	41.50	2
15	17	17.00	41.50	41.50	2
12	18	24.98	37.51	37.51	1
14	19	28.00	36.00	36.00	1
9	20	19.46	40.27	40.27	1
4	21	24.92	37.54	37.54	0

5.4.1 Preparación de las emulsiones

Las emulsiones se prepararon siguiendo las proporciones del diseño experimental. Inicialmente se preparó una solución en agua tipo I, posteriormente se agregó el AT y se completó una disolución al 20% en solutos que se homogenizó con un mezclador durante 360 segundos. Todas las emulsiones se elaboraron completando la misma cantidad de volumen y a temperatura ambiente.

5.4.2 Secado por aspersión

Las emulsiones previamente elaboradas se alimentaron al secador por aspersión utilizando un flujo de 1.14 L/h y una presión de aire de 0.00012 Kg/m² (Alamilla *et al*, 2005) a una temperatura de entrada de 190°C y de salida de 100°C (Jafari *et al*, 2007; Jafari *et al*, 2008a; Jinapong *et al*, 2008).

5.4.3 Caracterización de las emulsiones y de los polvos

Se tomaron muestras de las emulsiones en todos los pasos propuestos para cada corrida. 1 mL al 20% de sólidos, se analizaron en el Zetasizer Malvern Instruments 90S, a su respectiva dilución (Fery y Weinkamer, 2007; Zhao *et al*, 2008; ISO 13320:2009; Vignolles *et al*, 2009).

5.4.4 Evaluación de la encapsulación

5.4.4.1 Cuantificación parcial por HPLC

Extracción. La extracción del AT absorbido en la matriz de maltodextrina y goma arábiga se hizo usando 100 mg de muestra y 10mL de cloroformo, extrayendo bajo agitación vigorosa a temperatura ambiente durante 2 min. El proceso de extracción se realizó 2 veces con 5 mL de cloroformo en cada ocasión, la suspensión resultante se filtró con algodón, para evitar el paso de material pared y se lavó agregando 2 mL más de cloroformo. Posteriormente se evaporó el disolvente a sequedad en el rotavapor a presión reducida y a una temperatura de 50 °C. Se agregó 1 mL de metanol y se leyó en columna C18 con dimensiones de 4.6 x 250 mm con fase móvil de metanol a un flujo de 1 mL/min. El volumen de inyección fue de 20 μ L y un tiempo de retención de 5 min (Ubaldi *et al*, 2005).

Posteriormente, el algodón que se utilizó para la filtración se lavó con 10 mL agua y 2 mL de cloroformo. Se separaron las fases añadiendo 20 mL más de cloroformo y retirando humedad con 1 g de Na₂SO₄. Finalmente, se cuantificó el AT restante por la misma técnica de HPLC.

5.4.4.2 Cuantificación total

Se agregó un gramo de polvo a 4 mL de agua caliente (50 °C) y se agitó por 2 min. A las soluciones resultantes se agregaron 45 mL de hexano/isopropanol (3:1v/v). La suspensión se agitó por 15 min y posteriormente se centrifugó otros 15 min a 1000g. La fase orgánica se colectó. La fase orgánica se llevó a sequedad en el rotavapor a presión reducida y a una temperatura de 50 °C hasta que el residuo de AT se mantuviera en peso constante y su total se determinó como cantidad de g de AT / g polvo (Kim *et al*, 2009a; Kim *et al*, 2009b; Kim *et al*, 2009c).

5.4.4.3 Microscopia Confocal de Barrido Láser

Los polvos obtenidos del secado se evaluaron en un Microscopio de barrido confocal laser LSM 710. Carl Zeiss. Los polvos obtenidos antes y después de la extracción, se colocaron de forma homogénea, con ayuda de un pincel, en un portaobjetos y se les puso un cubreobjetos. Se seleccionó un aglomerado y se analizó en el *CLSM*. Se excitaron a 405 nm con 4.0% de poder del laser, observándose así la autofluorescencia del AT con un objetivo 40X/10.8M27. Posteriormente se realizó un “*scan mode*” de z-stack a los polvos obteniendo de corte de cada 1.7 μ m.

5.4.4.4 Procesamiento de la imágenes

Con el software Image J, se separaron cada uno de los planos focales del z-stack guardando cada imagen en formato TIFF. Posteriormente, cada imagen fue analizada con el plugin “*color*” y “*color space converter*” para transformar las coordenadas de color RGB a cada una de las coordenadas *Lab*. Finalmente con la opción “*histogram*” se obtuvieron los valores de la coordenada de color “a” (verde-rojo) de cada plano focal.

5.4.4.5 Determinación de la penetrabilidad y el Índice de Atrapamiento

Para el análisis de los resultados obtenidos se propuso el cálculo del Índice de Atrapamiento (IA) de los polvos como la relación entre el AT extraíble y el AT encapsulado.

En este trabajo se propuso el cálculo de la Penetrabilidad (P) que relaciona la cantidad de color “a” de diferentes cortes con el color “a” máximo que representa la mayor presencia de AT dentro de la cápsula. Posteriormente los IP se graficaron y se obtuvo un perfil del posicionamiento del AT. Esta metodología se planteó posteriormente para ver el efecto de la microfluidización en la distribución del AT y se pudo aplicar a todos los polvos obtenidos.

5.4.4.6 Análisis estadístico

Todas las pruebas analíticas y experimentos de microencapsulación se realizaron como mínimo por duplicado y en orden aleatorio. Los valores reportados son el resultado del promedio, y fueron analizados por medio de análisis de varianza (ANOVA) con $\alpha=0.05$.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 EFECTO DE LA ATOMIZACIÓN EN LA DISTRIBUCIÓN DEL α -TOCOFEROL

6.1.1 Contenido de humedad y Actividad de Agua

El contenido de humedad y la a_w de los polvos se presentan en el Cuadro 4. El contenido de humedad de las microcápsulas secadas por aspersión en boquilla de doble fluido fue el adecuado según lo recomendado en la literatura (3-6%) (Masters, 1985). Aunque no se determinaron diferencias significativas entre los polvos después del análisis estadístico no se presentó ninguna tendencia específica.

La actividad de agua (a_w) es uno de los factores más críticos en la determinación de la calidad de los alimentos al afectar la vida de anaquel, textura, sabor o aroma. Como era de esperarse todas las muestras presentaron valores bajos de actividad de agua, los resultados concuerdan con los reportados en la literatura (Klinkesorn *et al*, 2006; Lekago y Dunford, 2010).

Cuadro 4. Humedad y Actividad de Agua de los polvos para PA y PB
A: (Pre-emulsión, homogenización fuera del secador y aspersión dentro del secador)
B: (Pre-emulsión y aspersión dentro del secador)

POLVOS	PA		PB	
	a_w	Humedad (b.s%)	a_w	Humedad (b.s%)
3:2:1	0.1097 \pm 0.0147	5.33 \pm 0.2517	0.0877 \pm 0.0021	5.93 \pm 0.3512
3:2:2	0.2811 \pm 0.0062	6.90 \pm 0.1000	0.2857 \pm 0.0060	6.90 \pm 0.0000
3:1:1	0.2848 \pm 0.0100	6.30 \pm 0.6110	0.2775 \pm 0.0055	6.57 \pm 0.2082
2:2:1	0.2647 \pm 0.0066	6.63 \pm 0.2082	0.2690 \pm 0.0080	6.47 \pm 0.2082
2:1:1	0.2735 \pm 0.0058	6.50 \pm 0.1000	0.2774 \pm 0.0025	6.50 \pm 0.2000

6.1.2 Cuantificación del α -Tocoferol en los encapsulados

6.1.2.1 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

El Cuadro 5 presenta los porcentajes de eficiencia de encapsulación como resultado de la relación entre el contenido real (el que da el equipo) y el contenido teórico del lavado superficial, determinando así el AT disponible en los polvos evaluados. Los términos en la tabla son los referidos en la sección Materiales y Métodos.

Estos resultados, indican la importancia que tiene la proporción entre los materiales pared y el material a encapsular; el que se agregue mayor cantidad de material pared no garantiza un mayor atrapamiento en la encapsulación o menor cantidad de AT en la superficie. Ese es el caso del polvo 3:2:1 que aunque tiene la menor proporción de AT, es el que menos atrapa en la cápsula pues fue del que mayor cantidad de antioxidante se pudo extraer.

Cuadro 5. % de lectura de α -Tocoferol en RMN en los diferentes polvos del proceso A y B

	3:2:1A ATDSC	3:2:1A ATE	3:2:1B ATDSC	3:2:1B ATE	3:2:2A ATDSC	3:1:1A ATDSC	2:2:1A ATDSC	2:1:1A ATDSC
M	430.72	430.72	430.72	430.72	430.72	430.72	430.72	430.72
Me	108.14	108.14	108.14	108.14	108.14	108.14	108.14	108.14
I	5.6033	1.41	4.85	1.2333	6.3100	7.5800	7.3600	3.83
Ie	100	100	100	100	100	100	100	100
n	81	81	81	81	81	81	81	81
ne	16	16	16	16	16	16	16	16
We	0.0098	0.0094	0.0096	0.0093	0.0098	0.0095	0.0098	0.0103
W	0.00043	0.0001	0.00034	0.0000899	0.0004	0.0005	0.0005	0.0003
%	25.87	6.22	22.01	5.38	4.96	5.96	5.79	3.01

A: (Pre-emulsión, homogenización fuera del secador y aspersión dentro del secador)

B: (Pre-emulsión y aspersión dentro del secador)

ATDSC: AT Disponible en la Superficie de la Cápsula

ATE: AT Encapsulado

Los valores más altos de AT extraído se obtuvieron en los que la proporción de maltodextrina- AT fue mayor (3:1) y los menores valores se obtuvieron cuando la proporción goma- AT fue menor (1:1) resultados que coinciden con el trabajo reportado por Soottitantawat *et al*, (2005). Las relaciones 3:1 y 2.5:1 de material pared y AT fueron las que atraparon mayor cantidad de AT, lo que coincide con lo reportado por González *et al*, (2007) y Pérez-Alonso *et al*, (2003) al utilizar los mismos materiales de pared. La Figura 7, presenta uno de los espectros de las lecturas del AT y los picos de lectura del anisol y AT que debieron compararse para determinar la cantidad de AT en la muestra. Cabe resaltar que PA esta encapsulando menor cantidad de AT al dejar disponible una mayor cantidad respecto a PB, ésto se puede deber al doble paso por boquilla en donde los glóbulos de las emulsiones podrían presentar coalescencia. Aunque la cuantificación de AT no se completó por ser una técnica muy costosa y difícil de evaluar, las tendencias se mantuvieron para los otros tipos de evaluación de encapsulación y se comprobó el no rompimiento de las cápsulas posterior a la extracción. Los espectros también demostraron la estabilidad química del AT durante el secado por aspersión.

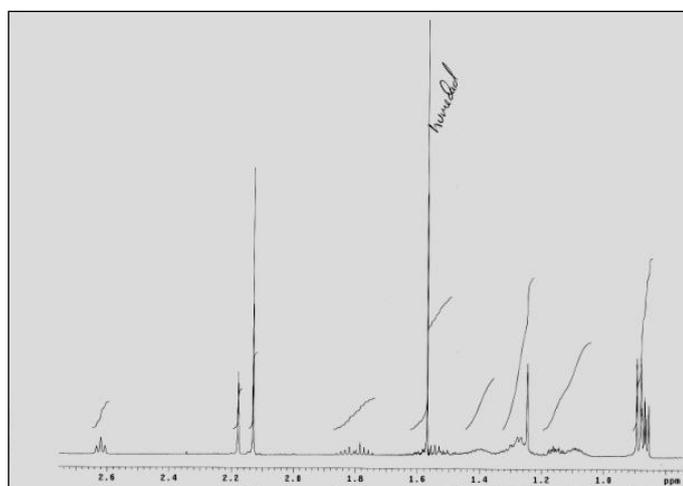


Figura 7. Espectro de RMN para α -Tocoferol

La figura 8 presenta las imágenes de polvos a los que se les realizó la extracción superficial con diferentes disolventes utilizados para este tipo de técnicas. Estas imágenes demuestran que el cloroformo es el solvente que menos alteraciones genera en la superficie de los polvos ya que los materiales de pared no son solubles en el (USP, 2000).

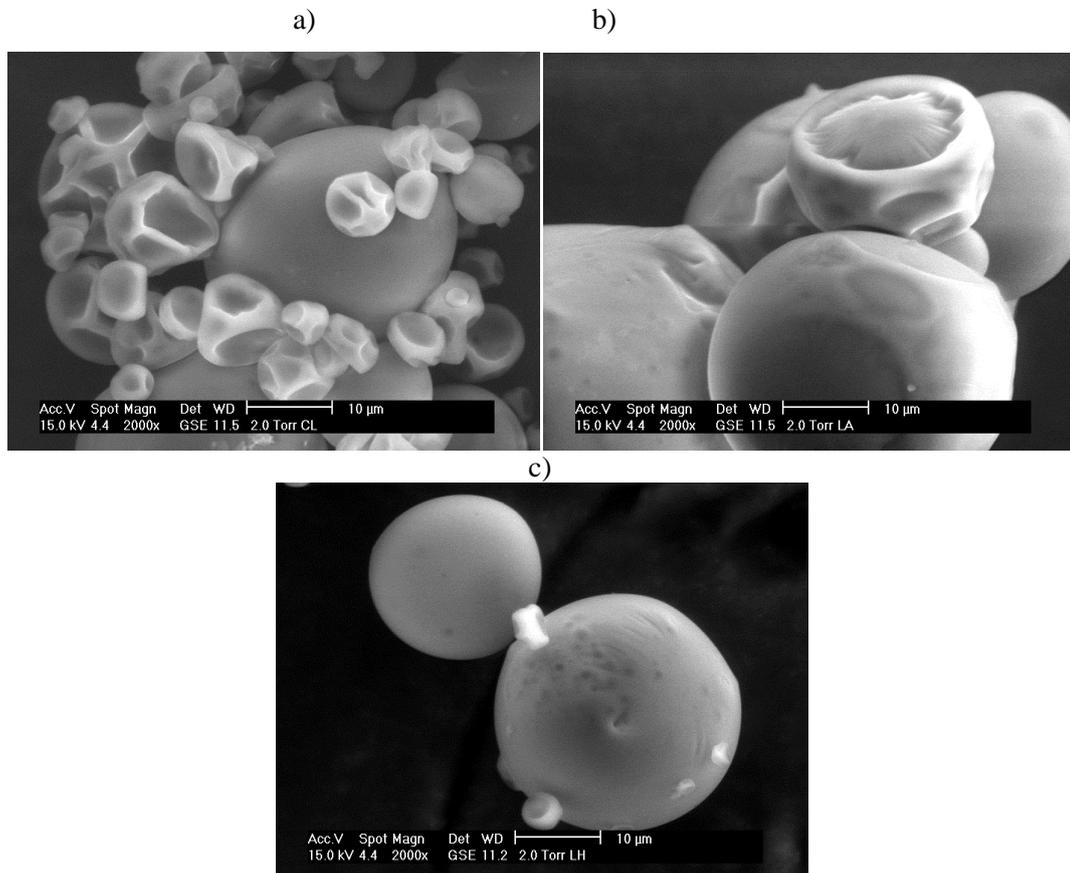


Figura 8. Imágenes de polvos sometidos a técnicas de extracción de α -Tocoferol superficial con diferentes disolventes. A) Cloroformo. b) Acetona. c) Hexano

6.1.2.2 Cuantificación parcial y total del α -Tocoferol por HPLC e Índice de Atrapamiento

La línea de calibración del AT se presenta en la Figura 9 así como su ecuación y el valor de R^2 correspondientes.

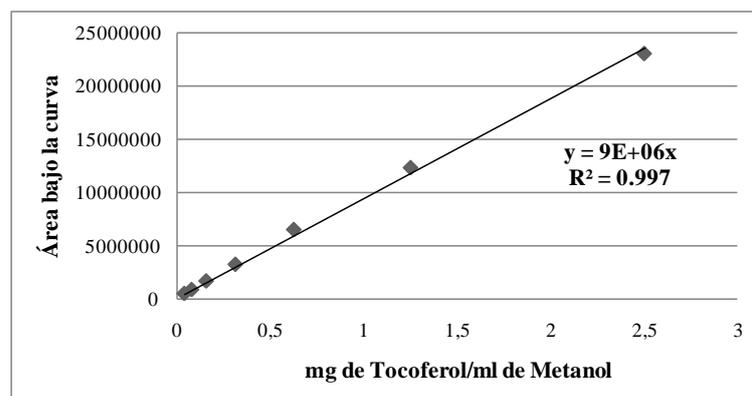


Figura 9. Curva tipo del α -Tocoferol en metanol

El Cuadro 6, presenta los valores de eficiencia de AT (EE) (extraíble y encapsulado) y cuantificación total de acuerdo a Kim *et al*, (2009c). Las fracciones se evaluaron y cuantificaron por HPLC según la curva tipo para diferentes concentraciones. En el cuadro, también se reporta el Índice de Atrapamiento (IA) de los polvos como la relación entre el AT extraíble y el AT encapsulado.

Se obtuvieron eficiencias de encapsulación entre el 46 y 76% (Farias *et al*, 2007) para todos los casos; sin embargo, si se presentó diferencia significativa entre los polvos productos de las emulsiones que se sometieron al proceso de homogenización (PA) y no (PB) ($p > 0.05$). Ahora bien, el AT cuantificado como extraíble varió significativamente entre los dos procesos mientras que la cuantificación del AT encapsulado se mantuvo constante siendo en promedio la tercera parte del AT extraíble. No se evidenciaron contrastes entre los valores de cuantificación global y la suma del AT extraíble y encapsulado de los polvos. En todos los casos los polvos obtenidos de la doble atomización (homogenización) presentaron un mayor valor de cuantificación que coincide con lo reportado por González *et al*, 2007 y Pérez-Alonso *et al*, 2003 al utilizar los mismos materiales de pared en dichas proporciones (Bruckner *et al*, 2007).

Es importante resaltar que aunque fueron los polvos producto de las emulsiones homogenizadas aquellos que presentaron mayores eficiencias de encapsulación total, no presentaron los mayores IA; aunque la presencia de AT es mayor en los polvos producto de las emulsiones que pasan dos veces por boquilla, la exposición de AT es mayor y por ende el AT encapsulado menor. El mejor IA se presentó para el polvo PB producto de la emulsión no homogenizada 2:2:1 (0.6). Los polvos PB con mayor cantidad de AT inicial presentaron mayores IA que los PA. Los PA con mayores IA los presentaron aquellos con menor AT inicial. Es posible que las condiciones de homogenización modifiquen las propiedades o el acomodamiento de los polisacáridos y por ende la matriz se conforme de una manera más eficiente. También es probable que las cinéticas tanto del secado como del proceso de homogenización sean tan rápidas que aunque las tasas de corte sean las mismas en los dos procesos (homogenización y atomización), el tiempo de residencia sea muy corto y los materiales no se alcancen a absorber debidamente. Una combinación de estas hipótesis también son referidas por Vignolles *et al*, 2009.

Aunque el análisis puntual de los polvos varía considerablemente en la figura 10 se presentan las ecuaciones de linealidad entre el AT cuantificado y el extraíble para los dos procesos (Sottitantawat *et al*, 2003). A partir de estos dos últimos supuestos se puede concluir que la cantidad inicial de AT rige la cantidad de AT extraíble, pero es el acomodamiento y relaciones de los materiales de pared durante el proceso de atomización los que determinan la cantidad de AT encapsulado.

Cuadro 6. Contenido de α -Tocoferol en los polvos de los procesos A y B

A: (Pre-emulsión, homogenización fuera del secador y aspersión dentro del secador)

B: (Pre-emulsión y aspersión dentro del secador)

POLVOS	Cuantificación de α -Tocoferol por HPLC						Técnica de KIM <i>et al</i> , 2009	
	EE SIN HOMOGENIZACIÓN			EE CON HOMOGENIZACIÓN			PB	PA
	PB		IA	PA		IA		
%Extraíble	%Encapsulado	IA	%Extraíble	%Encapsulado	IA	% AT Total		
3:2:1	31.15 \pm 1.8256 ^a	11.06 \pm 0.3429 ^d	0.35 \pm 0.0173 ^f	32.38 \pm 1.1451 ⁱ	14.06 \pm 1.9676 ^d	0.43 \pm 0.0538 ^l	42.7 \pm 1.9799 ^{a*}	45.75 \pm 0.7778 ^{d*}
	42.21 \pm 2.1686 ^{a*}			46.44 \pm 3.1127 ^{d*}				
3:2:2	33.15 \pm 1.4814 ^a	11.97 \pm 2.3810 ^d	0.36 \pm 0.0548 ^f	58.59 \pm 1.8453 ^j	16.39 \pm 0.9209 ^d	0.28 \pm 0.0115 ^g	47.15 \pm 2.1920 ^{a*}	75.70 \pm 1.9799 ^{e*}
	45.12 \pm 3.8623 ^{a*}			74.98 \pm 2.7663 ^{e*}				
3:1:1	41.79 \pm 0.8799 ^b	10.93 \pm 0.5599 ^d	0.26 \pm 0.0158 ^g	48.48 \pm 2.1925 ^k	13.67 \pm 0.7372 ^d	0.28 \pm 0.0084 ^g	51.45 \pm 1.7678 ^{b*}	60.10 \pm 0.9899 ^{f*}
	52.73 \pm 1.6626 ^{b*}			62.15 \pm 3.3829 ^{f*}				
2:2:1	33.7 \pm 2.1760 ^a	20.12 \pm 0.6322 ^c	0.61 \pm 0.0258 ^h	49.58 \pm 0.9576 ^k	13.46 \pm 1.0262 ^d	0.27 \pm 0.0171 ^g	57.00 \pm 2.1213 ^{b*}	63.30 \pm 3.1113 ^{f*}
	53.82 \pm 2.8082 ^{b*}			63.04 \pm 1.9839 ^{f*}				
2:1:1	48.03 \pm 1.0161 ^c	10.32 \pm 0.6465 ^d	0.21 \pm 0.0183 ^g	56.36 \pm 2.5316 ^j	10.73 \pm 0.8513 ^d	0.19 \pm 0.0096 ^g	58.90 \pm 1.8385 ^{c*}	68.05 \pm 2.6163 ^{g*}
	58.36 \pm 1.6626 ^{c*}			67.09 \pm 3.3829 ^{g*}				

Los valores con la misma letra en cada columna y entre columnas no presentaron diferencia significativa
 Los valores con la misma letra y * en cada columna y entre columnas no presentaron diferencia significativa

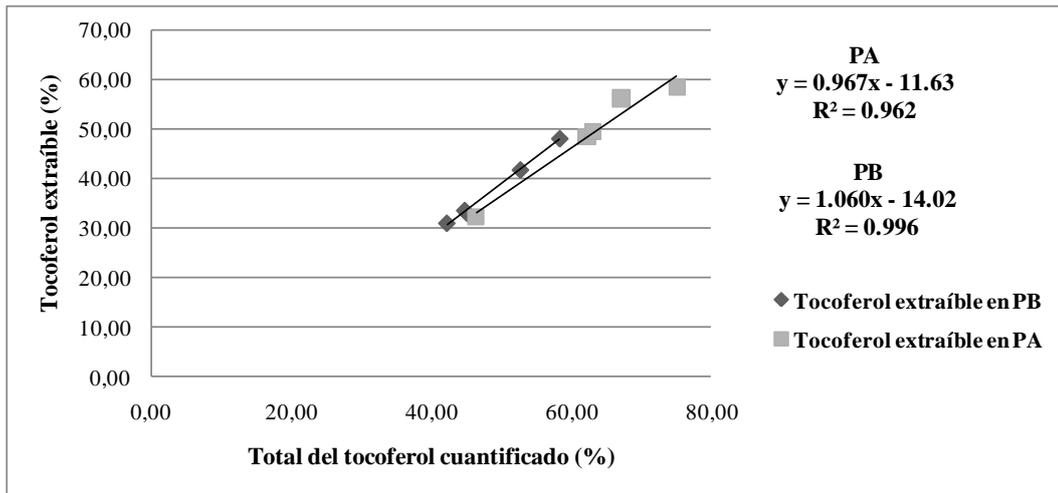


Figura 10. Relación entre el α -Tocoferol cuantificado y extraíble para todos los polvos.

A: (Pre-emulsión, homogenización fuera del secador y aspersión dentro del secador)

B: (Pre-emulsión y aspersión dentro del secador)

Para corroborar la relación entre el AT disponible en la superficie de la cápsula (AT extraíble) y el AT encapsulado evaluada por RMN y HPLC se tomaron imágenes de Fluorescencia para ver la diferencia entre los polvos originales y aquellos que ya no tenían el extraíble. En la Figura 11 se pueden apreciar algunas imágenes de Fluorescencia. Las imágenes de los polvos lavados presentan una disminución en la intensidad de la fluorescencia, fenómeno que se puede explicar bajo las posibles formas de encapsulación en secado por aspersión que sugieren Quintanilla-Carvajal *et al*, 2009.

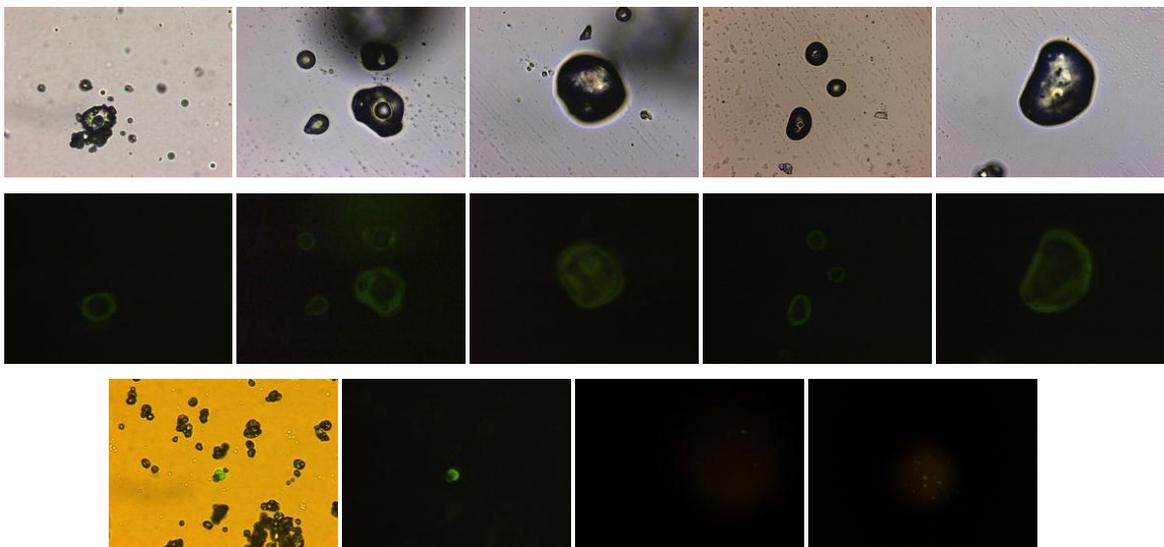


Figura 11. Imágenes de Fluorescencia tomadas con Microscopio Óptico a 40X con filtro W-blue

6.1.2.3 Penetrabilidad

Posteriormente se evaluó por microscopia confocal uno de los polvos (PA3:2.1) con el fin de determinar la localización del AT y confirmar los resultados que se obtuvieron por el análisis químico. En este caso

se planteó el cálculo de la penetrabilidad (P) que relaciona la cantidad del color “a” de diferentes cortes con el color “a máximo” que representa la mayor presencia de AT dentro de la cápsula.

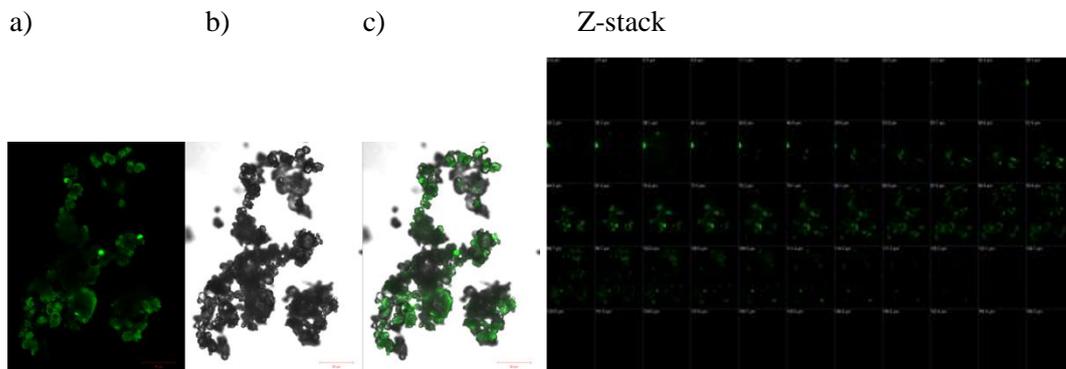


Figura 12. Micrografía de PA3:2:1. A) Fluorescencia b) Luz óptica c) superposición de a y b

La Figura 12 presenta un aglomerado del polvo PA3:2:1 y el z-stack del mismo polvo. La Figura 13 presenta un aglomerado del polvo PA3:2:1 con su respectivo z-stack después de haber retirado el AT extraíble.

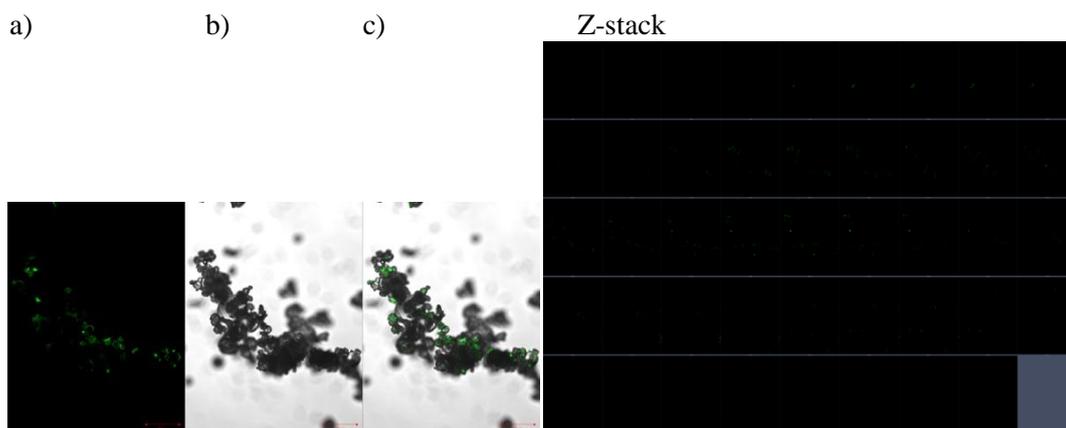


Figura 13. Micrografía de PA3:2:1 después de la extracción superficial de α -Tocoferol a) Fluorescencia b) Luz óptica c) superposición de a y b

Se analizaron los valores Lab de cada uno de los cortes de las Figuras 12 y 13 y se graficaron los valores de P (relación entre “a” y “a máximo” respecto a la longitud correspondiente de cada corte en el barrido del aglomerado para los dos polvos. Ver figura 14.

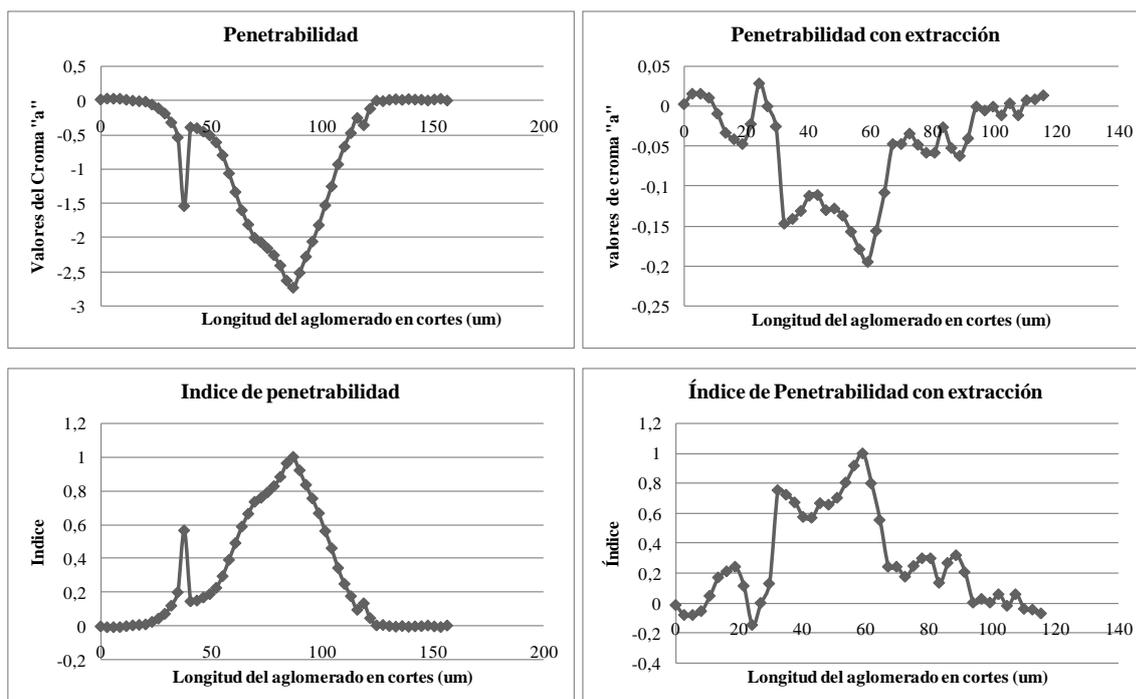


Figura 14. Gráficas de la Penetrabilidad

La primera sección de la Figura 14 representa las gráficas de los diferentes valores del color "a" para cada una de las secciones del aglomerado obtenidas en el z-stack antes y después de la extracción. La segunda sección representa la penetrabilidad como la correlación entre la cantidad de color de cada sección y la cantidad máxima de todo el aglomerado, valores de penetrabilidad más altos significan mayor cantidad de AT en esa zona del aglomerado. Cabe resaltar que el barrido de color para cada corte del aglomerado presenta una tendencia uniforme y resalta el acomodamiento del material encapsulado.

Se pudo observar que la extracción retira el AT superficial de manera uniforme desagregando al polvo en diferentes aglomerados o partículas más pequeñas. Se ha visto como en polvos que contienen compuestos lipídicos, la superficie está cubierta casi completamente por una delgada capa de grasa (Kim *et al*, 2002) y así mismo se ha establecido que las características como la humectabilidad, fluidez o aglomeración se ven altamente afectadas por la cantidad de material no encapsulado que queda en la superficie (Vega y Roos, 2006). Trabajos como el de Martins y Kieckbusch (2008) resaltan la influencia que tienen las fases lipídicas por las fuerzas dinámicas de adhesión que estas generan y su repercusión en la aglomeración (Vega y Roos, 2006).

6.1.3 Caracterización de las emulsiones

En la Figura 15, se presenta un ejemplo de la imagen original y procesada de las preemulsiones (PE), emulsiones atomizadas como técnica de homogenización (EA1) y emulsiones atomizadas dentro del secador (EA2). Como fue explicado en la sección de Materiales y Métodos, todas las imágenes se

procesaron y posteriormente fueron analizadas con los respectivos programas para determinar los parámetros morfométricos que caracterizaron a los productos obtenidos de los experimentos.

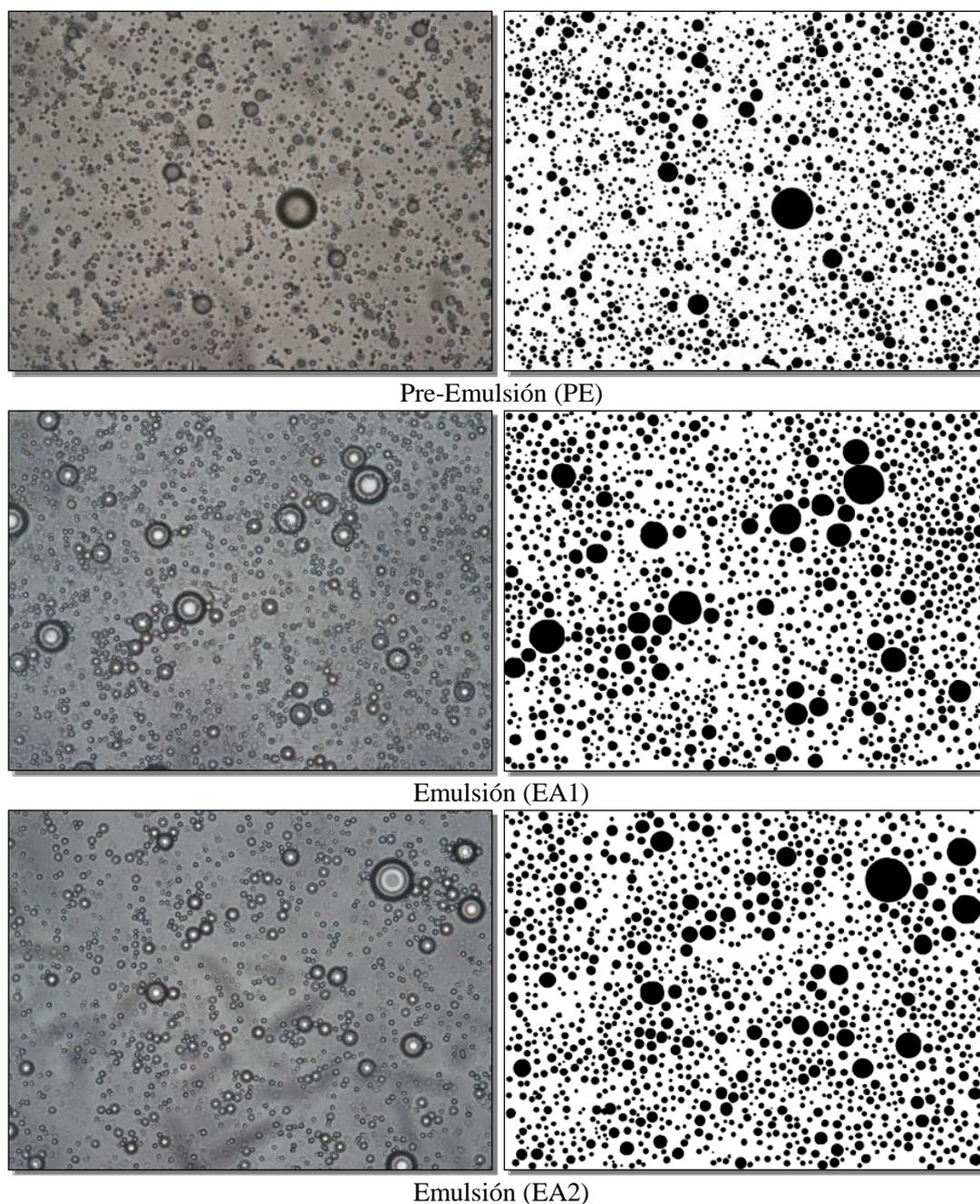


Figura 15. Ejemplo de las diferentes imágenes que se tomaron de las diferentes emulsiones (3:2:1 PE, EA1 y EA2) 40X.

La Figura 16, presenta las distribuciones de tamaño de partícula, obtenidas a través del equipo Zetasizer nano de las diferentes diluciones que se prepararon a partir de PE, EA1 y EA2 correspondientes a la relación maltodextrina: goma arábiga: AT 3:2:1. La mejor disolución para una lectura adecuada del nanosizer fue del 5%, puesto que a esta concentración se evitó la superposición entre las partículas en el momento de la lectura (Windhab *et al*, 2006). El tamaño medio del glóbulo para las emulsiones del proceso A para cada una de las etapas (homogenización y secado) fue de 1231.52, 1182.04 y 873.98 nm

para PE, EA1 y EA2 respectivamente. Para el proceso B los valores medios de tamaños presentados fueron: 1275.5 y 1092 nm para PE y EB2.

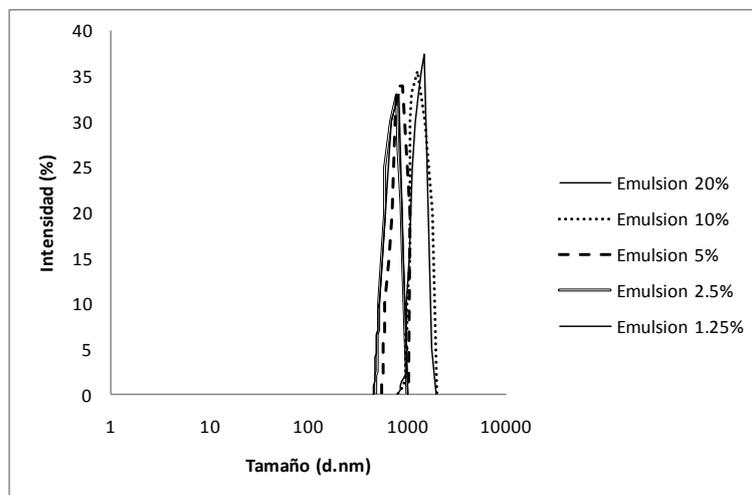


Figura 16. Distribución de Tamaños en Zetasizer de Emulsión 3:2:1 EA2 a diferentes diluciones de la emulsión original.

La Figura 17, muestra la distribución de tamaño de partícula muestral de las emulsiones del proceso A y B a partir de la respectiva distribución de frecuencias. Aparentemente, no se evidencia un cambio significativo a través del paso por las diferentes etapas; en el proceso A, el paso por la Etapa 1 (Homogenización fuera del secador) genera una reducción del tamaño partícula, sin embargo la emulsión de la segunda etapa (Aspersión dentro del secador) presenta un desplazamiento a la derecha superando el tamaño de partícula inicial. En el proceso B se observa un comportamiento similar al pasar por la Etapa 2 (desplazamiento a la derecha), no tan marcado como en el Proceso A.

En el cuadro 7 se pueden observar los valores del diámetro de Feret de las diferentes emulsiones en cada una de las etapas para los dos procesos. Después de la etapa de homogenización la distribución de tamaño para todas las etapas fue monomodal y el tamaño máximo de gota en el caso de las preemulsiones fue de 725 nm. El rango de tamaño de las emulsiones no homogenizadas varió entre 355 y 947 nm y la variación entre las emulsiones atomizadas dentro del secador disminuyó en algunos casos en un 20% para aquellas que no habían sido previamente homogenizadas, características que coinciden por lo reportado por Vignolles *et al.*, (2009). La variabilidad del tamaño de gota de las emulsiones de AT se puede deber a que estas logran ser “estrelladas o interrumpidas”, ya que se someten a una velocidad de deformación durante la etapa de atomización tal y como lo sugieren Walstra y Jenness (1984). Ye y Fernández, (2007) también observaron pequeñas gotas de grasa después de secado por aspersión y encontraron algunas otras más grandes (hasta 80 micras) que atribuyeron a la coalescencia.

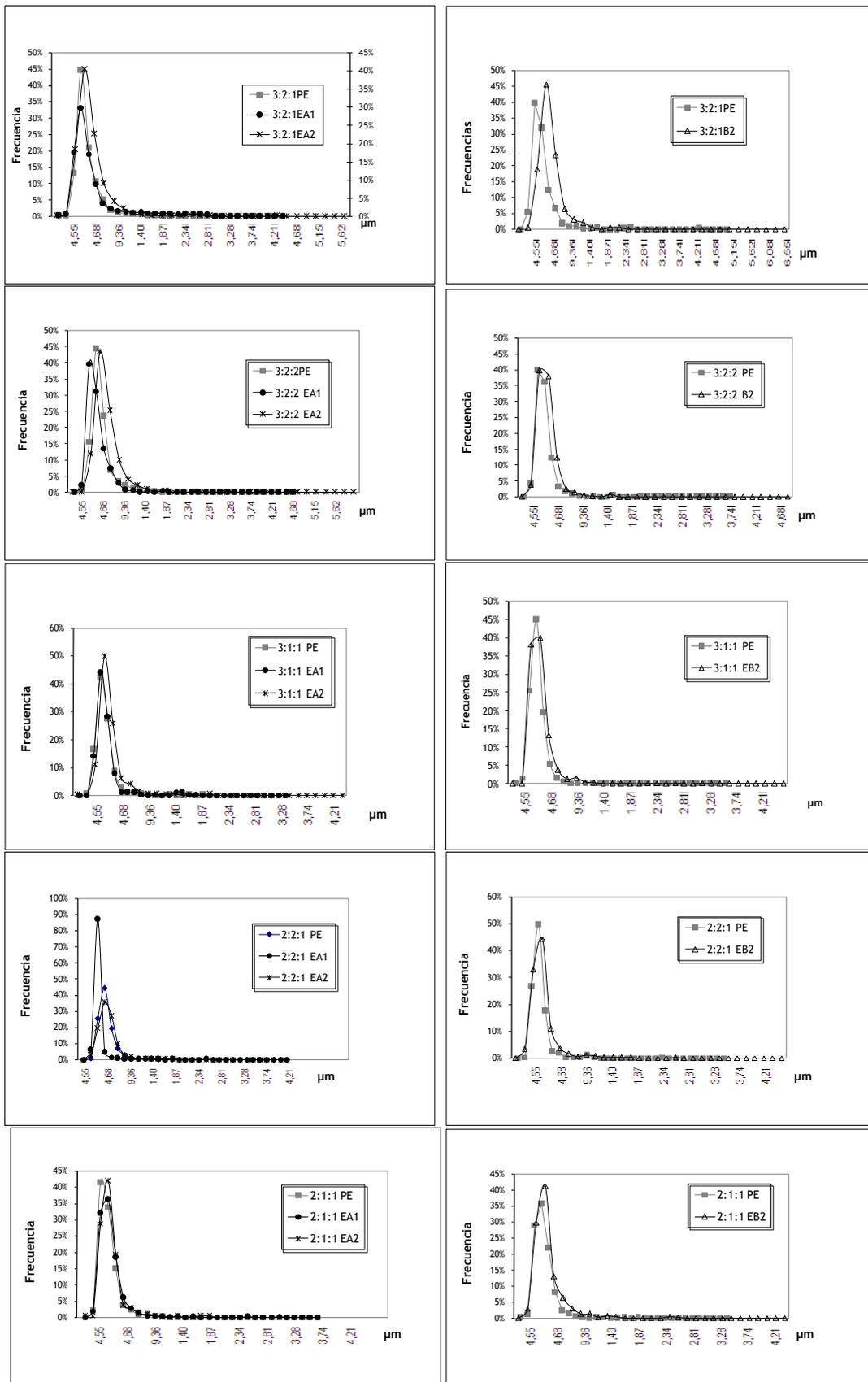


Figura 17. Distribución de Frecuencias de Emulsiones para el proceso A y B (mm).

A: (Pre-emulsión, homogenización fuera del secador y aspersión dentro del secador).

B: (Pre-emulsión y aspersión dentro del secador)

Cuadro 7. Diámetro de Feret de las diferentes emulsiones en cada una de las etapas de los dos procesos.

EMULSIONES	PE(nm)	(EA1) (nm)	(EA2) (nm)	(EB2) (nm)
3:2:1	725.51 ± 45.54 ^a	947.31 ± 80.19 ^a	735.62 ± 40.78 ^a	723.74 ± 30.89 ^a
3:2:2	681.47 ± 35.76 ^a	659.16 ± 41.88 ^b	812.73 ± 38.10 ^b	608.85 ± 42.83 ^c
3:1:1	659.15 ± 29.38 ^a	811.50 ± 52.61 ^c	780.31 ± 37.21 ^d	627.93 ± 39.35 ^e
2:2:1	679.01 ± 35.47 ^a	355.72 ± 20.70 ^d	758.74 ± 36.01 ^f	613.24 ± 38.78 ^g
2:1:1	701.72 ± 33.51 ^a	687.54 ± 44.55 ^b	696.95 ± 38.95 ^a	666.44 ± 44.50 ^a

Los valores con la misma letra en cada columna no presentaron diferencia significativa

A: (Pre-emulsión, homogenización fuera del secador y aspersión dentro del secador)

B: (Pre-emulsión y aspersión dentro del secador)

Para diferenciar estadísticamente el desplazamiento mencionado, los diferentes parámetros morfométricos fueron analizados estadísticamente por medio de análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un $\alpha=0.05$. En el Cuadro 8 y 9, se presentan los valores medios de los diferentes parámetros morfométricos que se obtuvieron del análisis de imágenes del proceso A y B respectivamente.

Cuadro 8. Parámetros Morfométricos evaluados a las emulsiones del proceso A

EMULSIONES	ÁREA μm^2	PERIMETRO MÁX (μm)	PERÍMETRO (μm)	FACTOR DE FORMA	
3:2:1	PE	6.51E-04 ± 2.70E-05 ^a	3.29 ± 5.26E-02 ^a	2.73 ± 4.37E-02 ^a	0.8811 ± 1.44E-03 ^a
	EA1	1.21E-03 ± 8.93E-05 ^b	3.84 ± 1.14-02 ^a	3.17 ± 9.47E-02 ^a	0.8822 ± 1.55E-03 ^a
	EA2	5.56E-04 ± 3.07E-05 ^c	2.98 ± 4.75E-02 ^a	2.47 ± 3.95E-02 ^a	0.8808 ± 1.40E-03 ^a
3:2:2	PE	5.37E-04 ± 2.24E-05 ^c	3.11 ± 4.48E-03 ^a	2.583 ± 3.73E-02 ^a	0.8912 ± 1.30E-03 ^a
	EA1	4.79E-04 ± 3.32E-05 ^d	2.66 ± 5.52E-03 ^b	2.193 ± 4.60E-02 ^b	0.9010 ± 1.64E-03 ^a
	EA2	6.33E-04 ± 2.42E-05 ^a	3.29 ± 4.45E-03 ^a	2.723 ± 3.70E-02 ^a	0.8830 ± 1.29E-03 ^a
3:1:1	PE	5.41E-04 ± 2.62E-05 ^c	3.07 ± 4.33E-03 ^a	2.53 ± 3.60E-03 ^a	0.8818 ± 2.10E-03 ^a
	EA1	7.34E-04 ± 7.74E-05 ^e	3.27 ± 9.98E-03 ^a	2.70 ± 8.27E-03 ^a	0.8877 ± 1.63E-03 ^a
	EA2	5.87E-04 ± 3.57E-05 ^c	3.15 ± 6.12E-03 ^a	2.60 ± 5.07E-03 ^a	0.8885 ± 1.83E-03 ^a
2:2:1	PE	4.35E-04 ± 2.12E-05 ^d	2.77 ± 4.85E-03 ^b	3.29 ± 4.02E-03 ^b	0.8819 ± 1.65E-03 ^a
	EA1	1.30E-04 ± 9.06E-06 ^f	1.45 ± 1.70E-03 ^c	1.19 ± 1.41E-03 ^c	0.9053 ± 1.20E-03 ^a
	EA2	5.54E-04 ± 2.62E-05 ^c	3.07 ± 5.61E-03 ^a	2.53 ± 4.68E-03 ^a	0.8865 ± 1.89E-03 ^a
2:1:1	PE	3.68E-04 ± 1.67E-05 ^g	2.51 ± 4.41E-03 ^b	2.06 ± 3.68E-03 ^b	0.8838 ± 1.77E-03 ^a
	EA1	5.27E-04 ± 5.29E-05 ^c	2.79 ± 5.74E-03 ^b	2.30 ± 4.76E-03 ^b	0.8849 ± 1.62E-03 ^a
	EA2	5.01E-04 ± 3.62E-05 ^c	2.82 ± 5.75E-03 ^b	2.34 ± 4.77E-03 ^b	0.8796 ± 2.01E-03 ^a

A: (Pre-emulsión, homogenización fuera del secador y aspersión dentro del secador)

Los valores con la misma letra en cada columna no presentaron diferencia significativa

Cuadro 9. Parámetros Morfométricos evaluados a las emulsiones del proceso B

EMULSIONES	ÁREA (μm^2)	PERIMETRO MÁX (μm)	PERÍMETRO (μm)	FACTOR DE FORMA	
3:2:1	PA	4.82E-04 ± 6.15E-05 ^a	2.59 ± 7.29E-02 ^a	2.12 ± 6.07E-02 ^a	0.8932 ± 2.21E-03 ^a
	EB2	4.86E-04 ± 2.31E-05 ^a	2.94 ± 5.24E-02 ^a	2.42 ± 4.34E-02 ^a	0.8809 ± 1.8E-03 ^a
3:2:2	PE	3.88E-04 ± 2.36E-05 ^b	2.48 ± 4.16E-02 ^a	2.04 ± 3.47E-02 ^a	0.8749 ± 1.82E-03 ^a
	EB2	4.35E-04 ± 6.31E-05 ^b	2.48 ± 5.46E-02 ^a	2.04 ± 4.54E-02 ^a	0.8829 ± 1.82E-03 ^a
3:1:1	PE	4.15E-04 ± 1.85E-05 ^b	2.70 ± 3.57E-02 ^a	2.22 ± 2.97E-02 ^a	0.8835 ± 1.46E-03 ^a
	EB2	4.31E-04 ± 4.7E-05 ^b	2.55 ± 6.06E-02 ^a	2.10 ± 5.05E-02 ^a	0.8826 ± 1.56E-03 ^a
2:2:1	PE	4.55E-04 ± 4.81E-05 ^a	2.73 ± 6.46E-02 ^a	2.26 ± 5.38E-02 ^a	0.8800 ± 2.06E-03 ^a
	EB2	4.13E-04 ± 3.90E-05 ^b	2.49 ± 6.63E-02 ^a	2.05 ± 5.35E-02 ^a	0.8810 ± 2.47E-03 ^a
2:1:1	PE	4.75E-04 ± 4.90E-05 ^a	2.84 ± 4.33E-02 ^a	2.34 ± 3.61E-02 ^a	0.8834 ± 1.42E-03 ^a
	EB2	5.04E-04 ± 4.90E-05 ^c	2.70 ± 7.48E-02 ^a	2.22 ± 6.24E-02 ^a	0.8941 ± 2.22E-03 ^a

B: (Pre-emulsión y aspersión dentro del secador)

Los valores con la misma letra en cada columna no presentaron diferencia significativa

Al comparar EA2 y EB2 para determinar si la homogenización (Etapa 1) influía sobre alguna característica morfométrica en las emulsiones se observaron desplazamientos del tamaño de partícula (incremento o decremento) sin un patrón específico. La Figura 18 representa las Distribuciones de frecuencias del diámetro de las Emulsiones EA2 y EB2. Para los parámetros Área, Diámetro de Feret, Perímetro máximo y Perímetro se encontró diferencia significativa entre las emulsiones de los dos procesos con relaciones Maltodextrina: Goma: AT 3:2:2, 3:1:1 y 2:2:1. En la evaluación del Factor de Forma las emulsiones con relaciones 3:1:1 y 2:1:1 presentaron diferencia significativa.

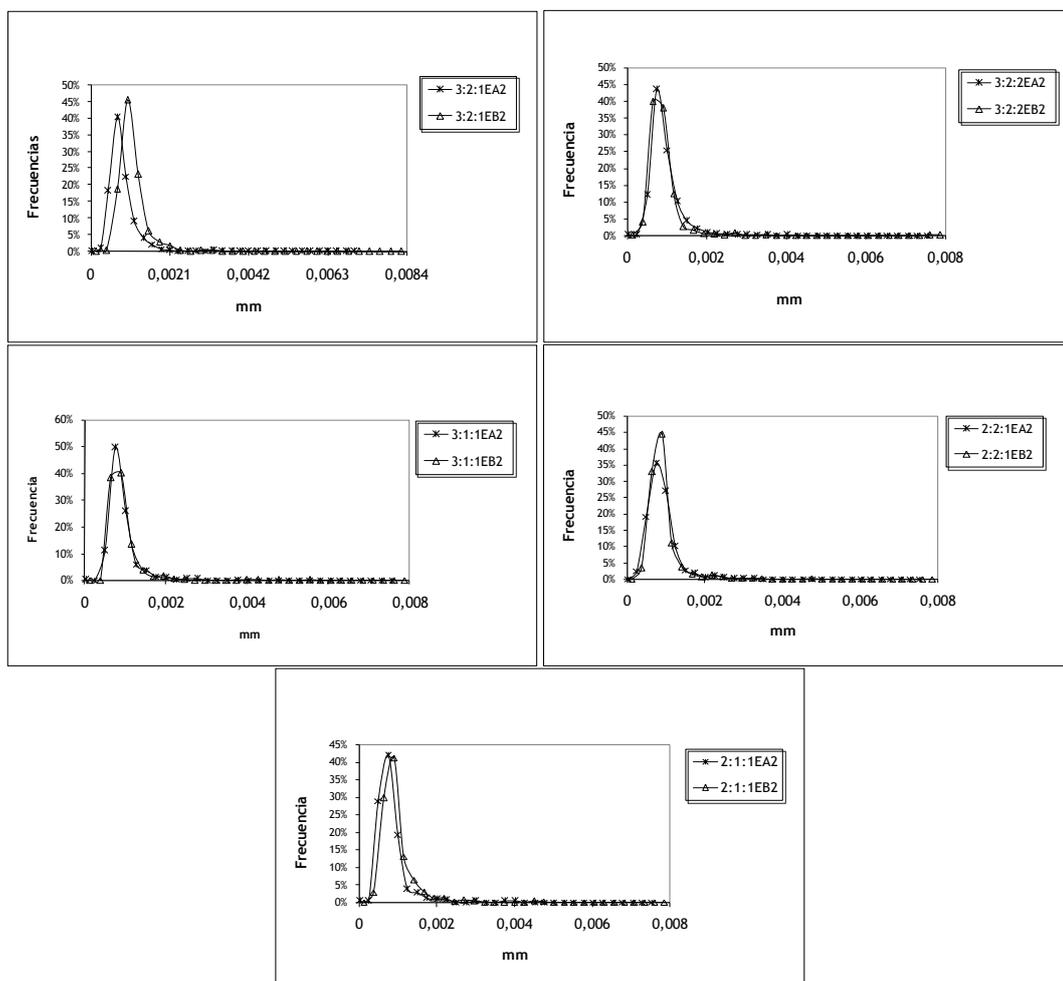


Figura 18. Distribución de Frecuencias de EA2 vs. EB2 para todas las emulsiones.

A: (Pre-emulsión, homogenización fuera del secador y aspersión dentro del secador).

B: (Pre-emulsión y aspersión dentro del secador)

El Cuadro 10 presenta los diferentes parámetros morfométricos de las emulsiones EA2 y EB2. Estos resultados sugieren que la etapa de homogenización por medio de la atomización si es un factor que influye en las características morfométricas de las emulsiones. Posteriormente se evaluaron las diferentes emulsiones para cada proceso respecto al Diámetro de Feret para evidenciar las diferencias en cada Etapa. Todas las emulsiones en el proceso A presentaron diferencias significativas en el Diámetro de Feret sin

ningún patrón específico de comportamiento. En el proceso B se evidenció diferencia significativa en las muestras 3:2:1, 3:1:1 y 2:2:1, mismas que contienen la menor proporción de AT: 16.7%, 20% y 20% respectivamente. Estos resultados sugieren que las proporciones y relaciones entre los materiales pared y el AT influyen en la variación de los parámetros morfométricos.

Cuadro 10. Parámetros morfométricos evaluados en las Etapas EA2 y EB2

EMULSIONES		ÁREA mm ²	PERIMETRO MÁX (mm)	PERÍMETRO (mm)	FACTOR DE FORMA
3:2:1	EA2	5.56E-04 ± 3.07E-08 ^a	2.98E-03 ± 4.75E-05 ^a	2.47E-03 ± 3.95E-05 ^a	0.8808 ± 1.40E-03 ^a
	EB2	4.86E-04 ± 2.31E-08 ^a	2.94E-03 ± 5.24E-05 ^a	2.42E-03 ± 4.34E-05 ^a	0.8809 ± 1.8E-03 ^a
3:2:2	EA2	6.33E-04 ± 2.42E-08 ^b	3.29E-03 ± 4.45E-05 ^b	2.72E-03 ± 3.70E-05 ^b	0.8830 ± 1.29E-03 ^a
	EB2	4.35E-04 ± 6.31E-08 ^c	2.48E-03 ± 5.46E-05 ^c	2.04E-03 ± 4.54E-05 ^c	0.8829 ± 1.82E-03 ^a
3:1:1	EA2	5.87E-04 ± 3.57E-08 ^d	3.15E-03 ± 6.12E-05 ^d	2.60E-03 ± 5.07E-05 ^d	0.8885 ± 1.83E-03 ^b
	EB2	4.31E-04 ± 4.7E-08 ^e	2.55E-03 ± 6.06E-05 ^e	2.10E-03 ± 5.05E-05 ^e	0.8826 ± 1.56E-03 ^c
2:2:1	EA2	5.54E-04 ± 2.62E-08 ^f	3.07E-03 ± 5.61E-05 ^f	2.53E-03 ± 4.68E-05 ^f	0.8865 ± 1.89E-03 ^a
	EB2	4.13E-04 ± 3.90E-08 ^g	2.49E-03 ± 6.63E-05 ^g	2.05E-03 ± 5.35E-05 ^g	0.8810 ± 2.47E-03 ^a
2:1:1	EA2	5.01E-04 ± 3.62E-08 ^a	2.82E-03 ± 5.75E-05 ^a	2.34E-03 ± 4.77E-05 ^a	0.8796 ± 2.01E-03 ^d
	EB2	5.04E-04 ± 4.90E-08 ^a	2.70E-03 ± 7.48E-05 ^a	2.22E-03 ± 6.24E-05 ^a	0.8941 ± 2.22E-03 ^e

Los valores con la misma letra en cada columna no presentaron diferencia significativa

A: (Pre-emulsión, homogenización fuera del secador y aspersión dentro del secador)

B: (Pre-emulsión y aspersión dentro del secador)

6.1.4 Caracterización de los polvos

Tal y como se explicó en la metodología, todas las imágenes se procesaron y posteriormente fueron analizadas con los respectivos programas para poder determinar los parámetros morfométricos con los que se caracterizaron a todos los productos. En la Figura 19 se presenta un ejemplo de la imagen original y procesada de las muestras PB y PA.

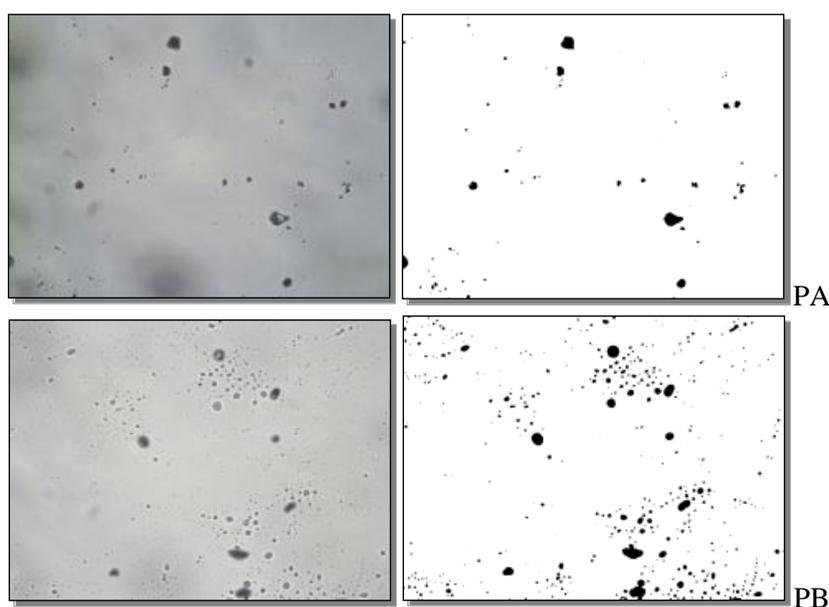


Figura 19. Ejemplo de las diferentes imágenes tomadas de los polvos (3:2:1 PA y PB) a 40X

La Figura 20 muestra la Distribución de tamaño de partícula muestral de los polvos obtenidos en los procesos A y B a partir de la respectiva Distribución de frecuencias.

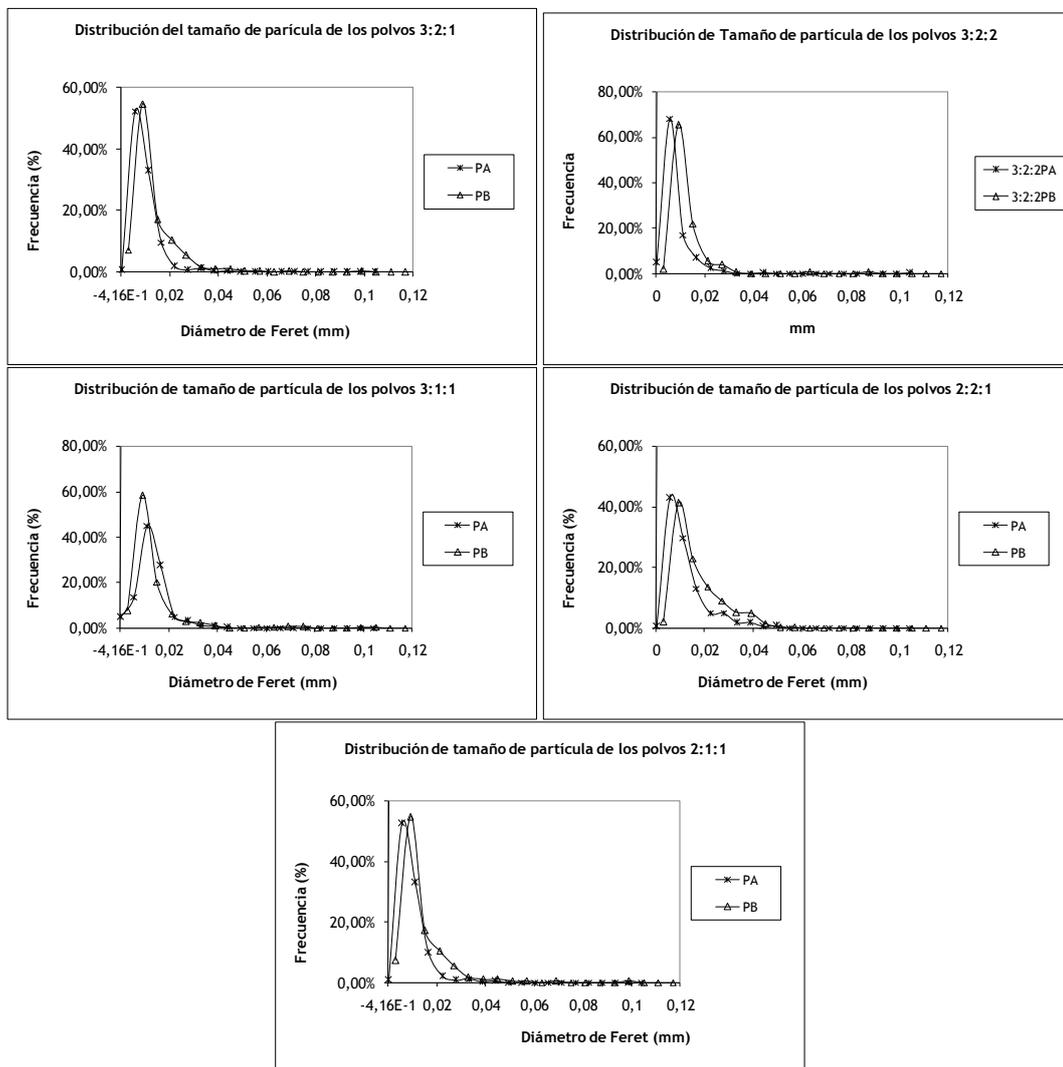


Figura 20. Distribución de Tamaño de partícula muestral de PA vs. PB.
 PA: (Pre-emulsión, homogenización fuera del secador y aspersión dentro del secador).
 PB: (Pre-emulsión y aspersión dentro del secador)

Aparentemente, en las distribuciones, no se evidenció un cambio significativo entre los dos procesos, sin embargo para verificar dicho supuesto, los diferentes parámetros morfométricos fueron analizados estadísticamente por medio de análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un $\alpha = 0.05$. En el Cuadro 11 se presentan los valores medios de los diferentes parámetros morfométricos obtenidos del análisis de imágenes de los polvos A y B respectivamente. El Cuadro 12, presenta el Diámetro de Feret. Estos resultados sugieren que la etapa de homogenización sí es un factor que influye en las características morfométricas de los polvos, particularmente en la forma. Es importante resaltar que los tamaños de partícula muestrales de los polvos varían significativamente sin presentar una tendencia específica. En todos los polvos del proceso B hubo un ligero incremento en el área, sólo significativo para PB2:1:1. Los tamaños oscilan entre $3 \mu\text{m}$ y $10 \mu\text{m}$.

Cuadro 11. Parámetros Morfométricos evaluados a los polvos PA y PB.

POLVOS		ÁREA (μm^2)	PERÍMETRO MÁXIMO (μm)	PERÍMETRO (μm)	FACTOR DE FORMA
3:2:1	PA	1.35E-01 \pm 2.30E-02 ^a	50.8 \pm 3.70 ^a	42.4 \pm 3.14 ^a	0.7442 \pm 1.37E-02 ^a
	PB	9.99E-05 \pm 1.57E-02 ^a	37.4 \pm 2.66 ^b	31.0 \pm 2.23 ^b	0.7509 \pm 1.10E-02 ^a
3:2:2	PA	5.67E-03 \pm 2.10E-02 ^a	22.5 \pm 1.94 ^c	18.6 \pm 1.68 ^c	0.8472 \pm 1.15E-02 ^a
	PB	8.10E-03 \pm 2.99E-02 ^a	29.9 \pm 3.51 ^d	24.7 \pm 2.93 ^c	0.8130 \pm 1.43E-02 ^a
3:1:1	PA	1.10E-01 \pm 7.14E-02 ^a	48.7 \pm 2.09 ^e	40.4 \pm 1.75 ^d	0.7686 \pm 1.18E-02 ^b
	PB	1.24E-01 \pm 2.99E-02 ^a	31.4 \pm 3.34 ^f	26.2 \pm 2.82 ^e	0.8448 \pm 1.37E-02 ^c
2:2:1	PA	1.25E-01 \pm 1.43E-02 ^a	46.3 \pm 3.02 ^g	38.6 \pm 2.54 ^c	0.7475 \pm 1.10E-02 ^d
	PB	1.37E-01 \pm 8.18E-03 ^a	45.1 \pm 1.71 ^g	37.6 \pm 1.43 ^c	0.7730 \pm 7.23E-03 ^e
2:1:1	PA	6.07E-02 \pm 6.59E-03 ^b	33.4 \pm 1.81 ^g	27.7 \pm 1.52 ^c	0.7607 \pm 9.20E-03 ^f
	PB	1.04E-01 \pm 2.35E-02 ^c	32.2 \pm 3.14 ^g	26.7 \pm 2.65 ^c	0.8131 \pm 1.67E-02 ^g

Los valores con la misma letra en cada columna no presentaron diferencia significativa.

A: (Pre-emulsión, homogenización fuera del secador y aspersión dentro del secador)

B: (Pre-emulsión y aspersión dentro del secador)

Cuadro 12. Diámetro de Feret de los polvos PA y PB.

Polvos	PA (μm)	P B (μm)
3:2:1	10.8 ^{a*} \pm 0.623	7.87 ^{a*} \pm 0.498
3:2:2	4.82 ^{b*} \pm 0.343	6.47 ^{a*} \pm 0.619
3:1:1	10 ^{a*} \pm 0.310	6.46 ^{a*} \pm 0.568
2:2:1	3.8b [*] \pm 0.497	9.61b [*] \pm 0.334
2:1:1	6.84c \pm 0.270	6.51 ^a \pm 0.556

Valores con * son diferentes significativamente ($P > 0.05$)

A: (Pre-emulsión, homogenización fuera del secador y aspersión dentro del secador).

B: (Pre-emulsión y aspersión dentro del secador)

Los parámetros morfométricos diámetro de Feret, perímetro máximo y perímetro presentaron diferencias significativas para las relaciones maltodextrina, goma arábica y AT 3:2:1, 3:2:2 y 3:1:1 respectivamente entre los polvos de los dos procesos. Estos resultados sugieren diferentes contornos de los parámetros a pesar de la similitud en las áreas que no presentaron diferencias significativas pero si diferentes diámetros y perímetros. El factor de forma para la mayoría de los casos fue mayor en aquellos polvos que no tuvieron proceso de homogenización (PB), resultados esperados por un único paso por la boquilla. Los polvos que pasaron dos veces por la boquilla (PA) presentaron mayor irregularidad. En general todos los polvos presentaron diferencias significativas por lo menos en un parámetro morfométrico lo que resalta la influencia de los procesos y la composición de la cápsula.

Vignolles *et al*, 2009 reportan también un incremento significativo en los tamaños de partícula de los polvos. Por otro lado, Ye *et al*, 2007 publicaron que el tamaño de partícula del polvo es independiente al tamaño de glóbulo de la emulsión lo que coincide con nuestros resultados, sin embargo este encogimiento o expansión pueden deberse a la combinación de diferentes proporciones de material pared y AT tal y como lo sugieren Klaypradit y Huang (2008), ellos encontraron una disminución del tamaño de cápsula cuando el material de pared maltodextrina estaba presente en mayor proporción, resultados que coinciden con los obtenidos en este trabajo.

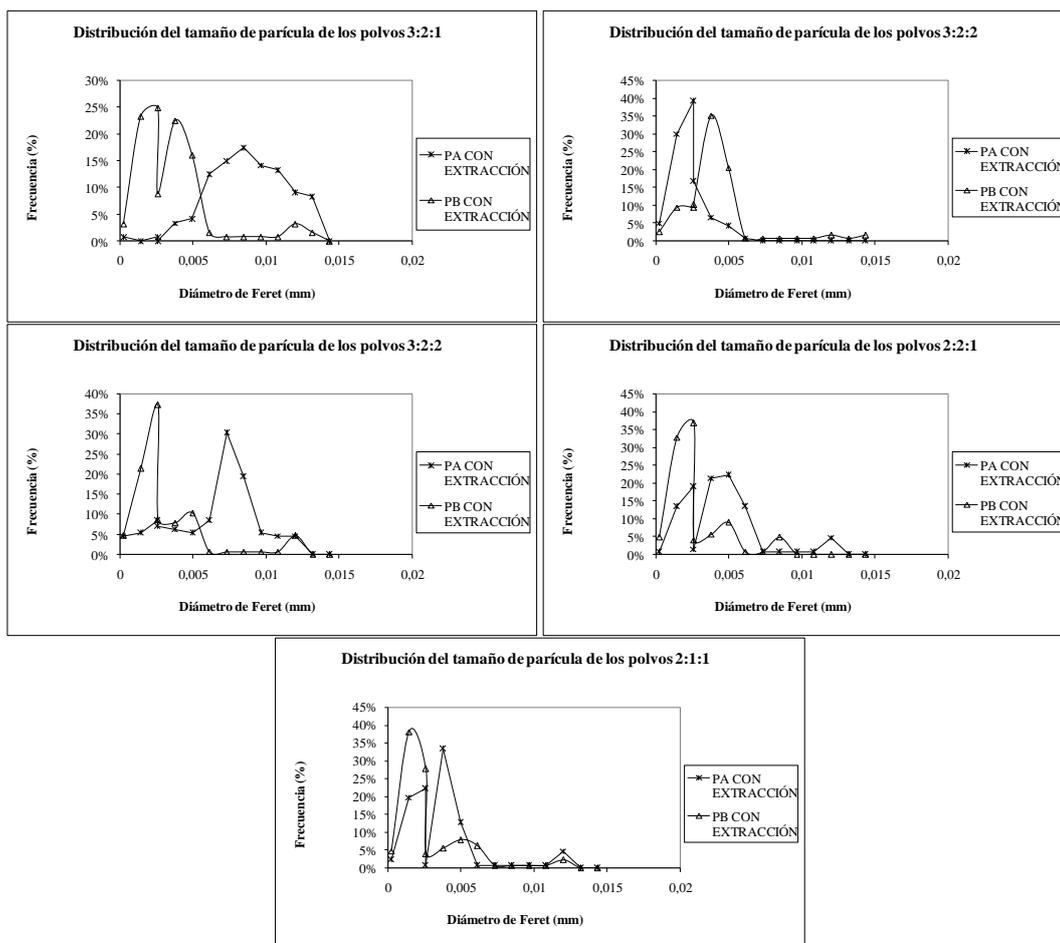


Figura 21. Distribución de Tamaño de partícula muestral de PA vs. PB después de la extracción del α -Tocoferol no encapsulado.

A: (Pre-emulsión, homogenización fuera del secador y aspersión dentro del secador).

B: (Pre-emulsión y aspersión dentro del secador)

El proceso de extracción del AT no encapsulado generó muchas diferencias en comparación con los polvos originales. Las distribuciones de tamaño de partícula dejaron de ser monomodales (Figura 21). En la mayoría de los polvos se presentaron hasta 3 picos característicos (parecidos a los perfiles del IP) sin ninguna tendencia específica, sin embargo para verificar dicho supuesto, los diferentes parámetros morfométricos fueron analizados estadísticamente por medio de análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un $\alpha = 0.05$. En el Cuadro 13 se presentan los valores medios de los diferentes parámetros morfométricos obtenidos del análisis de imágenes de los polvos A y B respectivamente después del proceso de extracción. El Cuadro 14, presenta el Diámetro de Feret. Estos resultados sugieren que la etapa de homogenización al ser un factor que influye en la cantidad de AT que queda en la superficie de los polvos, modifica también las características morfométricas de los polvos al ser extraído el AT no encapsulado. Es importante resaltar que aunque los tamaños de partícula de los polvos variaron significativamente, siempre se mantuvo un mayor tamaño de partícula para los polvos obtenidos a partir de las emulsiones homogenizadas en boquilla. En todos los polvos del proceso B hubo una disminución del tamaño significativa. Los tamaños oscilan entre 2 μm y 8 μm disminuyendo del tamaño original de los polvos aproximadamente en un 20%.

Cuadro 13. Parámetros Morfométricos evaluados a los polvos PA y PB después de la extracción del α -Tocoferol no encapsulado

POLVOS CON EXTRACCIÓN		ÁREA (μm^2)	PERÍMETRO MÁXIMO (μm)	PERÍMETRO (μm)	FACTOR DE FORMA
3:2:1	PA	5.87E-02 \pm 3.47E-03 ^a	35.8 \pm 0.0014 ^a	29.7 \pm 1.15 ^a	0.786 \pm 0.140 ^a
	PB	1.13E-02 \pm 2.37E-03 ^a	12.8 \pm 1.17 ^b	10.5 \pm 0.97 ^b	0.804 \pm 0.213 ^b
3:2:2	PA	7.14E-02 \pm 2.29E-03 ^b	8.2 \pm 1.0 ^c	6.6 \pm 0.872 ^c	0.913 \pm 0.233 ^c
	PB	2.31E-03 \pm 4.79E-03 ^c	17.7 \pm 1.71 ^d	14.5 \pm 1.43 ^d	0.865 \pm 0.195 ^d
3:1:1	PA	3.03E-02 \pm 2.33E-03 ^d	23.8 \pm 1.1 ^e	19.7 \pm 0.98 ^e	0.829 \pm 0.209 ^e
	PB	9.01E-03 \pm 2.26E-03 ^e	10.8 \pm 1.07 ^f	8.80 \pm 0.89 ^f	0.857 \pm 0.224 ^e
2:2:1	PA	1.40E-02 \pm 2.17E-03 ^f	15.3 \pm 1.1 ^g	12.7 \pm 0.9 ^g	0.835 \pm 0.166 ^e
	PB	8.10E-03 \pm 2.21E-03 ^g	9.64 \pm 1.03 ^h	7.90 \pm 0.86 ^h	0.855 \pm 0.223 ^e
2:1:1	PA	1.03E-02 \pm 2.14E-03 ^h	12.3 \pm 1.1 ⁱ	10.1 \pm 0.91 ⁱ	0.857 \pm 0.209 ^e
	PB	9.72E-03 \pm 2.31E-03 ⁱ	10.8 \pm 1.15 ^j	8.82 \pm 0.96 ^j	0.815 \pm 0.254 ^e

Los valores con la misma letra en cada columna no presentaron diferencia significativa.

Cuadro 14. Diámetro de Feret de los polvos PA y PB después de la extracción del α -Tocoferol no encapsulado

A: (Pre-emulsión, homogenización fuera del secador y aspersión dentro del secador.)

B: (Pre-emulsión y aspersión dentro del secador)

POLVOS CON EXTRACCIÓN	Diámetro Feret (mm) PA	Diámetro Feret (mm) PB
3:2:1	0.0082* \pm 2.77E-04	0.0029* \pm 2.49E-04
3:2:2	0.0019* \pm 2.35E-04	0.0040* \pm 3.63E-04
3:1:1	0.0056* \pm 2.78E-04	0.0024* \pm 2.35E-04
2:2:1	0.0035 \pm 2.33E-04	0.0022 \pm 2.34E-04
2:1:1	0.0028 \pm 2.29E-04	0.0024 \pm 2.60E-04

Valores con * son diferentes significativamente ($P > 0.05$)

A: (Pre-emulsión, homogenización fuera del secador y aspersión dentro del secador.)

B: (Pre-emulsión y aspersión dentro del secador)

Todos los parámetros morfométricos presentaron diferencias significativas para la mayoría de los polvos de los dos procesos. En este caso se presentaron contornos y áreas muy diversas con diferentes diámetros y perímetros. El factor de forma no presentó un comportamiento específico. Los polvos que pasaron una vez por la boquilla (PB) presentaron mayor irregularidad ya que el factor de forma fue menor que el de los PA. En general todos los polvos presentaron diferencias significativas por lo menos en un parámetro morfométrico lo que resalta la influencia de los procesos y la composición de la cápsula.

En la Figura 22 se pueden apreciar las imágenes tomadas en ESEM de todos los polvos, con sus respectivas partículas cortadas por la técnica de la cinta de Carbono. Se consiguió determinar el grosor para los polvos sin la extracción de AT. El grosor de la pared de los polvos a los que se les retiró el AT superficial no se pudo determinar ya que la reducción del tamaño de partícula impidió que la técnica de la cinta de carbono alcanzara a romper las cápsulas.

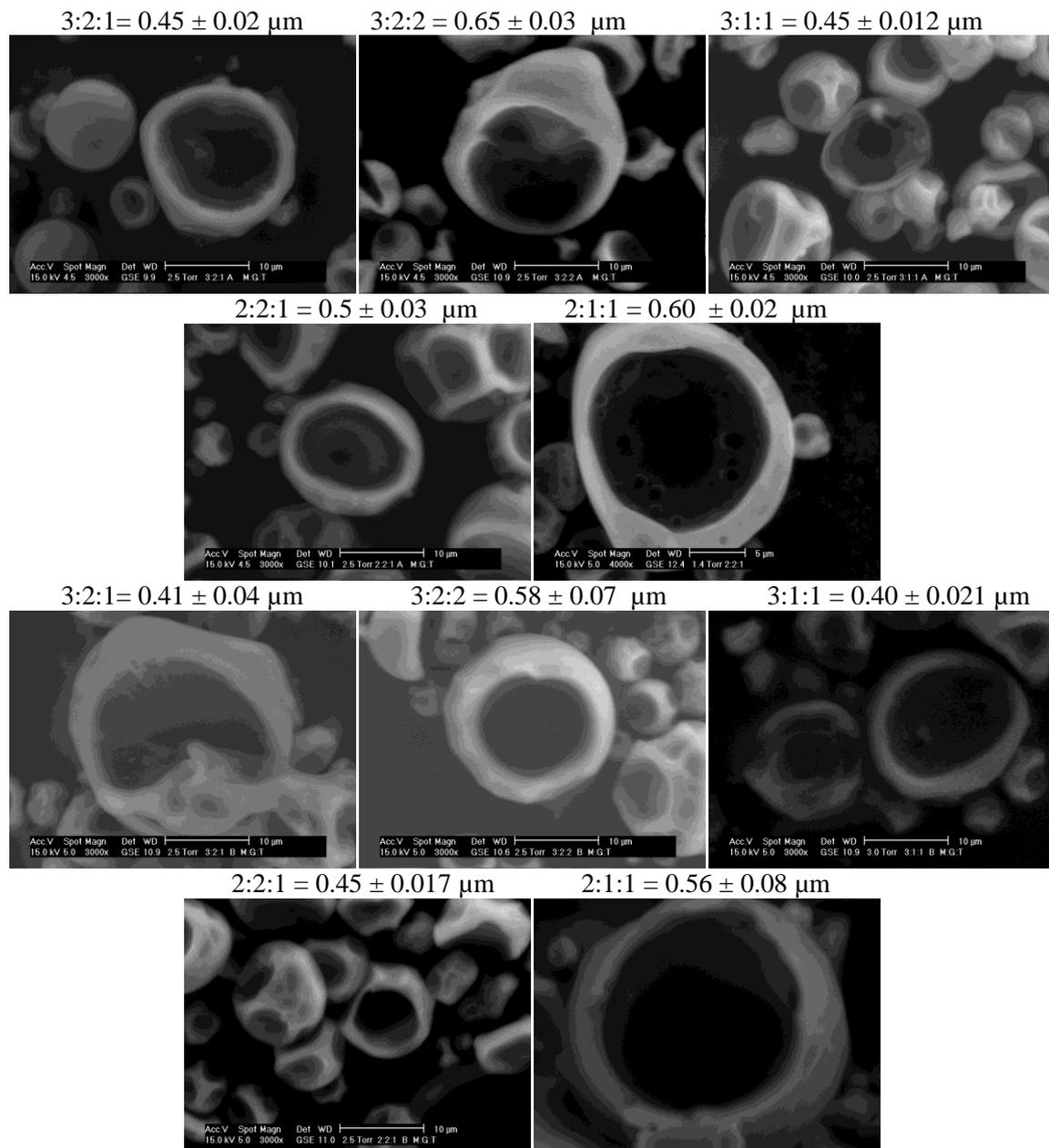


Figura 22. Grosor de los diferentes polvos obtenidos en los dos procesos a partir de micrografías de ESEM a 3000X de PA y PB cortados con técnica de cinta de carbono

6.1.4.1 Dimensión fractal

6.1.4.1.1 Dimensión fractal de contorno

Cuando se analizaron los diferentes parámetros morfométricos se evidencio una irregularidad marcada por el factor forma, fue por esto que se procedió a analizar la Dimensión Fractal de contorno como la relación entre el perímetro y el área. La dimensión fractal de contorno fue ligeramente mayor en los PA, los valores obtenidos son los característicos de las dimensiones de contorno, ver Figura 23.

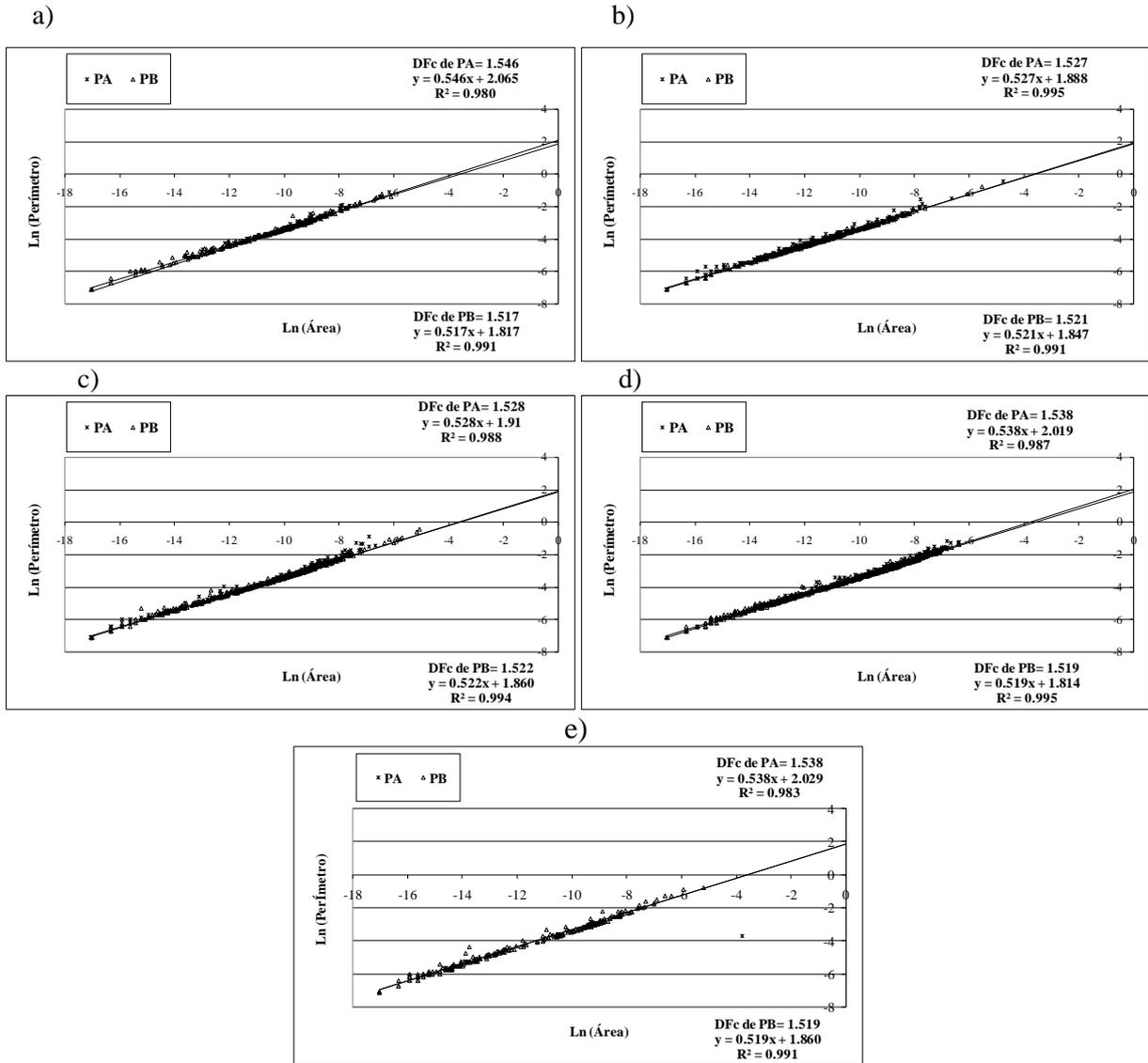


Figura 23. Determinación de la Dimensión Fractal de Contorno de los polvos de los procesos A y B. a) Polvo 3:2:1, b) Polvo 3:2:2, c) Polvo 3:1:1, d) Polvo 2:2:1 y e) Polvo 2:1:1
 A: (Pre-emulsión, homogenización fuera del secador y aspersión dentro del secador).
 B: (Pre-emulsión y aspersión dentro del secador)

La DFC para todos los polvos confirmó la naturaleza fractal de los aglomerados. Es importante resaltar que la dimensión fractal de contorno es una relación entre propiedades geométricas (área y perímetro) que evidencia que tan liso, rugoso, convolucionado, tortuoso o sinuoso es el perímetro respecto al área (Lira, 2002). Estos resultados demuestran que tan sensible es la DFC a los cambios en uno de los parámetros, lo que hace que cada uno de los polvos presente su propio valor característico.

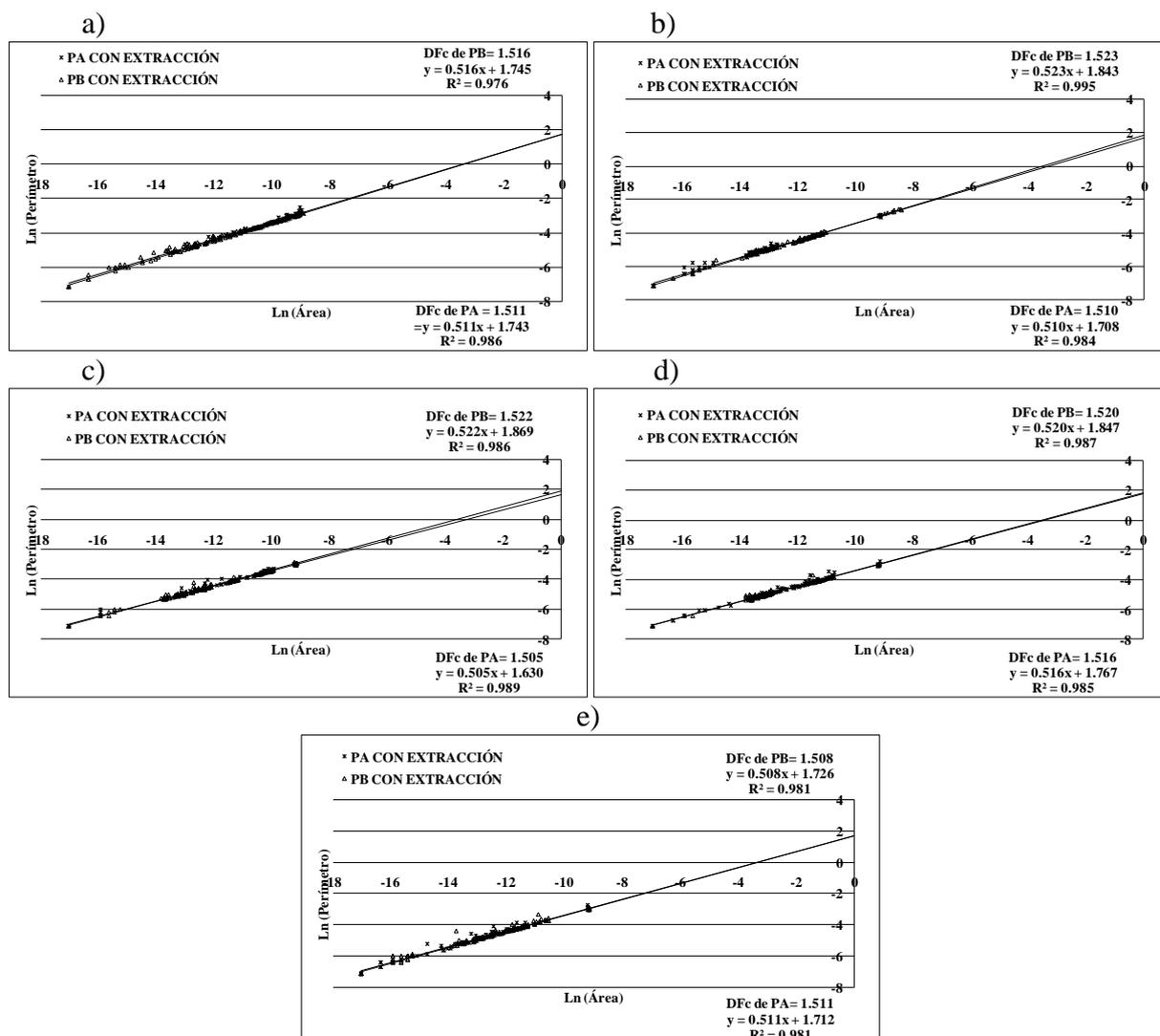


Figura 24. Determinación de la Dimensión Fractal de Contorno de los polvos de los procesos A y B después de la extracción del α -Tocoferol superficial a) Polvo 3:2:1, b) Polvo 3:2:2, c) Polvo 3:1:1, d) Polvo 2:2:1 y e) Polvo 2:1:1

A: (Pre-emulsión, homogenización fuera del secador y aspersión dentro del secador).

B: (Pre-emulsión y aspersión dentro del secador)

Por otro lado, los valores de la DFc de los polvos analizados después de la extracción del AT no encapsulado presentaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) y una disminución en el valor de la DFc para todos los casos respecto a la DFc de los polvos no sometidos a extracción, pero manteniéndose mayor en aquellos polvos productos de las emulsiones que no fueron homogenizadas. Ésto se puede explicar por la reducción del perímetro de cada polvo y la diversidad de aéreas que se presentaron, la extracción de los polvos ayudó a la desaglomeración de los mismos. Martins y Kieckbusch (2008) resaltaron la influencia de las fases lipídicas en los mecanismos de aglomeración de carbohidratos. En estudios previos Vignolles *et al*, 2009 reportaron que el material superficial no influía en la integridad de la cápsula pero si afectaba el nivel de agregación de los polvos (Figura 24).

6.1.4.1.2 Dimensión fractal de textura

Se encontraron diferencias significativas en la dimensión fractal de textura para todos los polvos, entre aquellos obtenidos a partir de las emulsiones homogenizadas (PA) y los obtenidos a partir de las emulsiones no homogenizadas (PB), a los dos niveles de magnificación (500x y 2000X), antes y después de la extracción del AT no encapsulado y para todas las relaciones de materiales pared- AT. La Figura 25 presenta las imágenes de todos los polvos con su respectiva Dimensión Fractal de textura.

Es importante resaltar que todos los valores de DFt a una magnificación de 2000X fueron mayores para los polvos sin ser tratados por la extracción de AT superficial como se puede observar en las imágenes. Menores valores se obtuvieron a 500X en el que las aglomeraciones eran más evidentes. Se puede observar como la extracción del AT resalta las formas de las cápsulas pero tienden a llenar menos un volumen. Así mismo se puede apreciar una disminución en la aglomeración de las partículas, lo que inicialmente parecía un aglomerado casi continuo por una sola fase, se diferencia más fácilmente al retirar el AT extraíble resaltando las partículas individuales de todos los polvos.

Aunque no se encontró una tendencia específica, en la mayoría de los polvos la DFt fue mayor para los polvos obtenidos a partir de las emulsiones homogenizadas (PA). Estas diferencias se pueden deber a las diferencias en tamaño, forma y relaciones de material pared- AT que se referían anteriormente. Los resultados obtenidos a partir del análisis de imágenes aportaron información que resalta una vez más la relación que existe entre los materiales pared de las cápsulas y la microestructura (Perea-Flores *et al*, 2010).

MUESTRA	ANTES DE LA EXTRACCIÓN		DESPUÉS DE LA EXTRACCIÓN	
	500X	2000X	500X	2000X
PA	3:2:1 2,0473		2,0598	2,0499
	3:2:2 2,0773		2,1183	2,0322
	3:1:1 2,1664		2,1744	2,1024
	2:2:1 2,1070		2,2060	2,1143
	2:1:1 2,0699		2,0860	2,0570
	3:2:1 2,0842		2,1260	2,0944
PB	3:2:2 2,1050		2,1391	2,0794
	3:1:1 2,1097		2,1615	2,0566
	2:2:1 2,0820		2,1369	2,0895
	2:1:1 2,0950		2,1295	2,1337
	3:2:1 2,2642			
	3:2:2 2,2883			

Figura 25. Imágenes de ESEM a 500X y 2000X de los polvos PA y PB tomadas antes y después de la extracción del α -Tocoferol superficial y su respectiva Dimensión Fractal de Textura.

A: (Pre-emulsión, homogenización fuera del secador y aspersión dentro del secador).
 B: (Pre-emulsión y aspersión dentro del secador)

6.2 EFECTO DE LA MICROFLUIDIZACIÓN EN LA DISTRIBUCIÓN DEL α -TOCOFEROL

6.2.1 Análisis de las emulsiones

La mayoría de trabajos que se han reportado, se basan en emulsiones mayores a una micra, hasta ahora ha comenzado a reportarse el efecto del uso de nanoemulsiones en la literatura (Jafari *et al*, 2007; Jafari *et al*, 2008a;) al conseguir la encapsulación de nanopartículas en matrices de polvos micrométricos.

En este trabajo, se obtuvieron 21 nanoemulsiones a las que se les evaluó el tamaño medio de emulsión en cada una de las etapas del experimento, por medio del Zetasizer. El cuadro 15 presenta los valores del tamaño de emulsión para cada uno de los experimentos.

Cuadro 15. Tamaño medio de las emulsiones del diseño en todas las etapas del proceso (nm)

Corrida	% α -Tocoferol	PRE-EMULSION (nm)	1 ciclo (nm)	2 ciclos (nm)	Atomización (nm)
1	21.85	1190	-	-	685.7
2	17.00	1089	305.8	-	473
3	25.25	1072	273.1	422.2	390.8
4	28.00	1593	419.1	-	424.5
5	17.00	976	362.7	-	312.8
6	22.50	867.2	658.9	449	416.3
7	17.00	1560	-	-	957.5
8	28.00	974.9	-	-	704.3
9	17.00	1034	-	-	735.6
10	28.00	1400	-	-	735.8
11	19.75	886.1	391.9	385.4	348.1
12	21.90	1007	447.1	-	441.3
13	28.00	1027	324.6	375	312.8
14	28.00	806.2	370.1	419.2	399.5
15	24.98	588.7	239	-	447.6
16	17.00	720.4	407.2	329.8	444.9
17	17.00	756.9	392.8	370.6	267.3
18	24.98	1634	-	-	447.6
19	28.00	1593	419.1	-	424.5
20	19.46	844.8	328.1	-	306
21	24.92	2268	-	-	705.5

Los resultados coincidieron con el efecto mencionado en la sección 6.1 de este trabajo, la atomización en la boquilla afecta el tamaño de las emulsiones consiguiendo disminuir su tamaño de gota como lo haría un homogenizador regular; en este caso, al haber mantenido constantes los materiales de pared de la cápsula (1:1 maltodextrina y goma arábica), la tendencia de disminución del tamaño de partícula se presentó en todas las emulsiones, específicamente en esas que no pasaron por etapas de microfluidización. Un efecto

contrario se presentó en las etapas de microfluidización, aunque en todos los casos las emulsiones sometidas a un primer ciclo de microfluidización presentaron un menor tamaño de gota, en algunos casos el segundo ciclo incrementó el tamaño promedio de gota (corridas 3, 13 y 14) coincidiendo con aquellas emulsiones con mayor cantidad de AT inicial, 25.25, 28 y 28% respectivamente (Ye *et al*, 2007).

Finalmente el efecto “homogenizador” de la boquilla se reflejó al obtener emulsiones atomizadas de mayores tamaños, a pesar de haber sido microfluidizadas (corridas 2, 4, 15, 16 y 19), el esfuerzo de corte sigue siendo lo suficientemente grande como para promover la recoalescencia de las partículas al interior de la boquilla. Trabajos como el de Vignolles *et al*, 2009 reportan el efecto que tienen las presiones de homogenización y la atomización en tamaño de gota de las emulsiones y la agregación de estas.

Trabajos como el de Jafari *et al*, (2007) y Lobo y Svereika, (2004) mencionan que la ausencia de recoalescencia es imposible de obtener en la microfluidización debido al alto grado de turbulencia que se presenta durante el proceso y es por esto, que se recomienda la utilización de agentes tensoactivos que ayuden a prevenir dicho proceso. En este trabajo, con el fin de evaluar el efecto *per se* de la microfluidización y boquilla, no se utilizaron surfactantes, encontrando los resultados ya referidos por otros investigadores.

Sin embargo, a partir del diseño experimental de superficie de respuesta que se planteó en la sección de materiales y métodos, se obtuvieron ecuaciones de primer orden que se ajustaban a los resultados de tamaño final de la emulsión con un R^2 de 0.758. Se determinó que el factor que afecta los resultados e influye en el tamaño final de la gota es el número de ciclos en la microfluidización. Las ecuaciones que describen el modelo se presentan a continuación, estas se dan respecto a la variable categórica (ciclos de microfluidización).

Sin ciclos de Microfluidización

$$\text{Tamaño de la emulsión} = 733.11 + 0.245 \times (\% \text{ AT}) \quad (7)$$

1 Ciclo de Microfluidización

$$\text{Tamaño de la emulsión} = 427.37 + 0.245 \times (\% \text{ AT}) \quad (8)$$

2 Ciclos de Microfluidización

$$\text{Tamaño de la emulsión} = 358.77 + 0.245 \times (\% \text{ AT}) \quad (9)$$

El efecto del número de veces que pasa una emulsión por el microfluidizador, también se ha evaluado en temas como el de la alteración de bacterias o, como en esta tesis doctoral, la minimización del tamaño de la gota de las emulsiones (Jafari *et al*, 2007). En la cámara de interacción del microfluidizador, que es la

pieza fundamental del equipo, dos corrientes de emulsión de canales opuestos son proyectados a altas velocidades (Shultz, 2004; Olson *et al*, 2004). La corriente del proceso es controlada por una bomba neumática que es capaz de presurizar el aire de entrada (150-650 KPa) a unos 150 MPa (Microfluidics, 1996) forzando el flujo de la corriente por alta presión a través de micro canales de áreas minúsculas (7 μ m) generando enormes esfuerzos de corte y por ende emulsiones muy finas. En general, las fuerzas inerciales en fluidos turbulentos y la cavitación son los principales responsables de la alteración del tamaño de la gota en el microfluidizador (Shultz, 2004; Maa y Hsu, 1999). Todos estos antecedentes coinciden con los resultados obtenidos de recoalescencia en este diseño experimental ya que todas las emulsiones sometidas al proceso de microfluidización se produjeron a 275.78 MPa aproximadamente. Finalmente se estableció un mayor número de pasos en el microfluidizador disminuirá el tamaño de la nanoemulsión con concentraciones iniciales bajas (17-20%) de AT.

6.2.2 Análisis de los polvos

6.2.2.1 Cuantificación parcial

Las micrografías tomadas con microscopia confocal de barrido permitieron observar una gran proporción de AT en la superficie de los polvos. La figura 26 presenta algunas de las imágenes tomadas antes y después de la extracción.

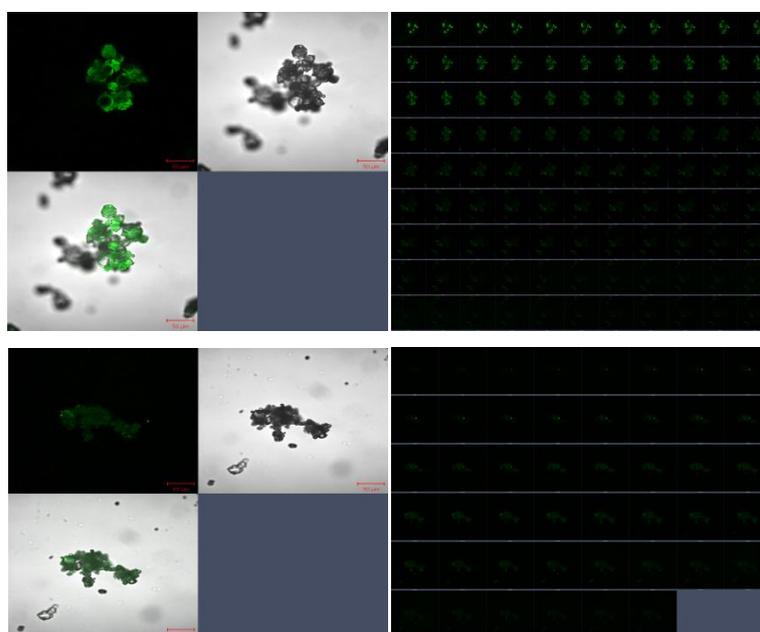


Figura 26. Imagen del Polvo (8) antes y después de la extracción superficial de α -Tocoferol en fluorescencia, luz óptica y superposición de fluorescencia y luz óptica con su respectivo z-stack (40X).

Material libre o extraíble es el nombre que se le ha dado a aquel material que queda en la superficie de los polvos. Éste casi siempre se ha evaluado a través de extracción con disolventes. Hay trabajos que no evalúan la totalidad del material encapsulado asumiendo que todo el material inicial es retenido en el

polvo por no ser volátil e ignoran las deposiciones del material en las paredes del secador durante el secado por aspersión (Jafari *et al*, 2007). Dicho supuesto no se asume en la realización de este trabajo, al contrario, se comprueba la importancia de un análisis completo de todos los componentes del polvo antes y después de la extracción del AT con solventes. Es así como se determinó la cantidad de AT en la superficie de las cápsulas y el AT encapsulado por la técnica de extracción con cloroformo y cuantificación por HPLC descritas en la sección Materiales y Métodos. El Cuadro 16 presenta los resultados de dichos procesos además de la cuantificación total de AT siguiendo la técnica de Kim *et al*, (2009c).

En el cuadro se pueden apreciar los resultados de las diferentes técnicas utilizadas para la cuantificación del AT. La extracción con cloroformo permitió la diferenciación del AT extraíble y encapsulado, entre las dos técnicas de cuantificación no se presentaron diferencias significativas. Se obtuvieron eficiencias de encapsulación total entre 40 y 90%.

Cuadro 16. Cuantificación del α -Tocoferol superficial, encapsulado y total por Kim *et al*, 2009

Corrida	% α -Tocoferol	Ciclos del microfluidizador	% Eficiencia total por método de Kim	% total (extraíble + encapsulado)	% Extraíble	% Encapsulado	IA
1	21.85	0	58	61	45	16	0.36
2	17.00	1	83	85	66	19	0.29
3	25.25	2	69	73	46	26	0.57
4	28.00	1	77	79	67	11	0.16
5	17.00	1	79	81	59	22	0.37
6	22.50	2	49	43	31	12	0.39
7	17.00	0	62	66	40	26	0.65
8	28.00	0	58	57	45	11	0.24
9	17.00	0	57	59	33	25	0.76
10	28.00	0	61	60	36	24	0.67
11	19.75	2	60	63	48	16	0.33
12	21.90	1	86	81	53	28	0.53
13	28.00	2	86	88	57	31	0.54
14	28.00	2	86	88	55	32	0.58
15	24.98	1	56	58	55	3	0.05
16	17.00	2	87	90	73	17	0.23
17	17.00	2	88	87	73	17	0.23
18	24.98	1	54	58	55	3	0.05
19	28.00	1	81	79	67	11	0.16
20	19.46	1	52	45	40	5	0.13
21	24.92	0	79	83	67	16	0.24

Cabe resaltar que aunque los resultados de cuantificación total (Kim *et al*, 2009c) y total como la suma del AT extraíble y encapsulado, se ajustaron al modelo, la diferenciación entre el AT extraíble y

cuantificado no siguió ningún patrón específico, la cantidad de AT extraído fue indistinta para todos los polvos, aunque en las repeticiones si presentaron las mismas proporciones. Se determinó que la eficiencia máxima de encapsulación depende de la cantidad inicial de AT en la emulsión y variará en una relación de segundo orden según los ciclos de microfluidización que se utilicen.

A partir del diseño experimental de superficies de respuesta que se planteó en la sección de materiales y métodos, se obtuvieron ecuaciones de tercer orden según los resultados obtenidos de la técnica de cuantificación total (%AT extraíble + % AT encapsulado) con un R^2 de 0.91. El valor de F fue de 19.41, este valor significa que el modelo es significativo, sólo existe un de posibilidad de 0.004% que los datos no se ajustaran al modelo. Los valores de P menores a 0.5 son términos significativos en el modelo, es decir que son factores que afectan los resultados e influyen en la eficiencia de encapsulación total, estos son: los ciclos de la microfluidización, (la concentración inicial del AT)², (la concentración de AT inicial)² por los ciclos de microfluidización y (la concentración del AT)³. Las ecuaciones que describen el modelo se presentan a continuación, estas se dan respecto a la variable categórica (ciclos de microfluidización).

Sin ciclos de Microfluidización

$$EE = 3257.61 - 463.70 \times (\% \text{ AT}) + 21.92 \times (\% \text{ AT})^2 - 0.33808 \times (\% \text{ AT})^3 \quad (10)$$

1 Ciclo de Microfluidización

$$EE = 4046.77 - 535.14 \times (\% \text{ AT}) + 23.52 \times (\% \text{ AT})^2 - 0.33808 \times (\% \text{ AT})^3 \quad (11)$$

2 Ciclos de Microfluidización

$$EE = 5063.59 - 628.29 \times (\% \text{ AT}) + 25.60 \times (\% \text{ AT})^2 - 0.33808 \times (\% \text{ AT})^3 \quad (12)$$

También se obtuvieron ecuaciones de tercer grado que describen los resultados de % de AT extraíble con un R^2 de 0.710. El valor de F fue de 5.31, este valor significa que el modelo es significativo, sólo existe un de posibilidad de 1.89% de que los datos no se ajusten al modelo. Los valores de P menores a 0.5 son términos significativos en el modelo, es decir que son factores que afectan los resultados e influyen en la cantidad de AT extraíble, estos son: los ciclos de la microfluidización por la concentración inicial de AT, (la concentración inicial del AT)², (la concentración de AT inicial)² por los ciclos de microfluidización y (la concentración del AT)³. Las ecuaciones que describen el modelo se presentan a continuación, éstas se dan respecto a la variable categórica (ciclos de microfluidización).

Sin ciclos de Microfluidización

$$\% \text{ Extraíble} = 1839.46 - 269.10 \times (\% \text{ AT}) + 13.06 \times (\% \text{ AT})^2 - 0.20535 \times (\% \text{ AT})^3 \quad (13)$$

1 Ciclo de Microfluidización

$$\%Extraíble = 2548.98 - 332.68 \times (\% AT) + 14.46 \times (\%AT)^2 - 0.20535 \times (\%AT)^3 \quad (14)$$

2 Ciclos de Microfluidización

$$\%Extraíble = 3059.28 - 377.81 \times (\% AT) + 15.43 \times (\%AT)^2 - 0.20535 \times (\%AT)^3 \quad (15)$$

Estas ecuaciones reflejan el efecto que tiene los ciclos de microfluidización en la cantidad de AT extraíble, a más ciclos de microfluidización, mayores son los coeficientes de las variables (Jafari *et al*, 2007).

Se obtuvo un modelo cúbico que se ajustó a los resultados de % de AT encapsulado con un R^2 de 0.956. El valor de F fue de 39.48, este valor significa que el modelo es significativo, sólo existe una de posibilidad de 0.01% de que los datos no se ajusten al modelo. Los valores de P menores a 0.5 son términos significativos en el modelo, es decir que son factores que afectan los resultados e influyen en la cantidad de AT encapsulado; para la determinación del AT encapsulado los factores que afectan los resultados son los ciclos de microfluidización, los ciclos de la microfluidización por la concentración inicial de AT, (la concentración inicial del AT)², (la concentración de AT inicial)² por los ciclos de microfluidización y (la concentración del AT)³. Las ecuaciones que describen el modelo se presentan a continuación, estas también se dan respecto a la variable categórica (ciclos de microfluidización).

Sin ciclos de Microfluidización

$$\% Encapsulado = 1386.43 - 190.67 \times (\% AT) + 8.71 \times (\%AT)^2 - 0.13081 \times (\%AT)^3 \quad (16)$$

1 Ciclo de Microfluidización

$$\% Encapsulado = 1484.52 - 200.18 \times (\% AT) + 8.93 \times (\%AT)^2 - 0.13081 \times (\%AT)^3 \quad (17)$$

2 Ciclos de Microfluidización

$$\% Encapsulado = 1978.77 - 246.97 \times (\% AT) + 10.02 \times (\%AT)^2 - 0.13081 \times (\%AT)^3 \quad (18)$$

Se obtuvieron ecuaciones de tercer grado ajustándose a los resultados de % Eficiencia de encapsulación total siguiendo la metodología de extracción de Kim *et al*, (2009c) con un R^2 de 0.9759. El valor de F fue de 72.85, este valor significa que el modelo es significativo, sólo existe un de posibilidad de 0.01% de que los datos no se ajusten al modelo. Los valores de P menores a 0.5 son términos significativos en el modelo, es decir que son factores que afectan los resultados e influyen en la cantidad total de AT, estos son: la concentración inicial de AT, los ciclos de microfluidización, (los ciclos de la microfluidización)², (los ciclos de la microfluidización)² por la concentración inicial de AT, microfluidización y (la concentración del AT)³. Las ecuaciones que describen el modelo se presentan a continuación, estas también se dan respecto a la variable categórica (ciclos de microfluidización).

Sin ciclos de Microfluidización

$$\%EE_{(Kim)} = 2886.42 - 440.90 \times (\% AT) + 19.78 \times (\%AT)^2 - 0.30698 \times (\%AT)^3 \quad (19)$$

1 Ciclo de Microfluidización

$$\%EE_{(Kim)} = 3626.91 - 480.73 \times (\% AT) + 21.24 \times (\%AT)^2 - 0.30698 \times (\%AT)^3 \quad (20)$$

2 Ciclos de Microfluidización

$$\%EE_{(Kim)} = 4806.08 - 588.86 \times (\% AT) + 23.65 \times (\%AT)^2 - 0.30698 \times (\%AT)^3 \quad (21)$$

En diversos trabajos, se ha reportado la influencia que tiene el tamaño de partícula en la eficiencia de encapsulación de diferentes materiales a encapsular durante el secado por aspersión (Soottitantawat *et al.*, 2003; Soottitantawat *et al.*, 2005). Estos resultados demuestran que la reducción del tamaño de la emulsión genera cápsulas con mejores eficiencias de encapsulación y menores contenidos de aceites no encapsulados en la superficie de las partículas. Como se ha mencionado anteriormente la presencia de esta capa de grasa en las partículas no sólo afecta propiedades de fluidez o humectabilidad en los polvos (Vega *et al.*, 2005), también acelera la oxidación de los compuestos (Kim *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005; Vega y Roos 2006). Aunque en este trabajo no se encontró una tendencia específica entre los tamaños de gota y las diferentes cuantificaciones de AT, si se encontró que a ciertos niveles de eficiencia el tamaño de partícula promedio disminuía. Es así como para eficiencias de encapsulación de 53, 61 y 85% se determinaron valores promedio de diámetro de gotas de 509.57, 566.7 y 419.64 nm respectivamente. así mismo para las cantidades de AT extraíble y encapsulado no se encontró una relación entre los parámetros de eficiencia y tamaño de emulsión. Finalmente se comprobó que algunos de los parámetros que afectan la eficiencia de encapsulación son la técnica de emulsificación, el material de pared, y el tamaño de gota de la emulsión, resultados que coinciden con otras investigaciones (Jafari *et al.*, 2008a).

6.2.2.2 Índice de atrapabilidad

A pesar de que el índice de Atrapabilidad (IA) varió para todos los polvos sin ninguna tendencia específica, se obtuvo un modelo cuadrático que se ajustó a los resultados del IA con un R^2 de 0.7262. El valor de F fue de 8.07, este valor significa que el modelo es significativo, sólo existe un de posibilidad de 0.23% de que los datos no se ajusten al modelo. Los valores de P menores a 0.5 son términos significativos en el modelo, es decir que son factores que afectan los resultados e influyen en la relación entre la cantidad de AT extraíble y encapsulado; para la determinación del IA los factores que afectan los resultado son los ciclos de microfluidización, los ciclos de la microfluidización por la concentración inicial de AT y (la concentración inicial del AT)². Las ecuaciones que describen el modelo se presentan a continuación, estas también se dan respecto a la variable categórica (ciclos de microfluidización).

Sin ciclos de Microfluidización

$$IA = 3.28 - 0.22 \times (\% AT) + 0.00415 \times (\%AT)^2 \quad (22)$$

1 Ciclo de Microfluidización

$$IA = 2.57 - 0.20 \times (\% AT) + 0.00415 \times (\%AT)^2 \quad (23)$$

2 Ciclos de Microfluidización

$$IA = 1.63 - 0.150 \times (\% AT) + 0.00415 \times (\%AT)^2 \quad (24)$$

La disminución de los coeficientes a medida que incrementan los ciclos de microfluidización reflejan la importancia que tiene el contenido de % inicial de AT en la relación del IA.

6.2.2.3 Penetrabilidad

Los datos de la coordenada de color "a" máximo también se validaron en el modelo obteniéndose una ecuación de tercer orden para cada ciclo de microfluidización. Los factores que afectan la cantidad del color a diferentes niveles de la cápsula son (la concentración del AT)² y (la concentración del AT)² por los ciclos de microfluidización, las ecuaciones se presentan a continuación.

Sin ciclos de Microfluidización

$$Color "a" \text{ máximo} = -474.12 + 68.96 \times (\% AT) - 3.29 \times (\%AT)^2 + 0.0512 \times (\%AT)^3 \quad (25)$$

1 Ciclo de Microfluidización

$$Color "a" \text{ máximo} = -617.53 + 81.88 \times (\% AT) - 3.58 \times (\%AT)^2 + 0.0512 \times (\%AT)^3 \quad (26)$$

2 Ciclos de Microfluidización

$$Color "a" \text{ máximo} = -820.56 + 100.48 \times (\% AT) - 3.996 \times (\%AT)^2 + 0.0512 \times (\%AT)^3 \quad (27)$$

Posteriormente se identificó la fracción del aglomerado que contenía mayor cantidad de AT equivalente al mayor valor del parámetro "a" en el barrido que se analizó de todos los polvos. Para todos los polvos a los que no se les extrajo el AT superficial el mayor valor de la coordenada de color "a" se presentó en las primeras 2 μ m del aglomerado. También se logró identificar la porción de aglomerado susceptible a la extracción superficial del AT. Esta disminución del color lo presentaron el 80% de los polvos, casi todos los que si pasaron por el proceso de microfluidización. La penetrabilidad en la franja de extracción del AT, valor entendido como la relación entre el valor de la coordenada "a" de la sección del aglomerado evaluada y el valor de la coordenada de color "a" máximo fue mayor a 0.4 para la mayoría de los polvos con AT superficial extraído. Estos resultados indican que la extracción que se hace del AT retira gran cantidad de AT, resultados que coinciden con aquellos obtenidos para la encapsulación de AT extraíble. La Figura 27 presenta los perfiles de penetrabilidad de los polvos.

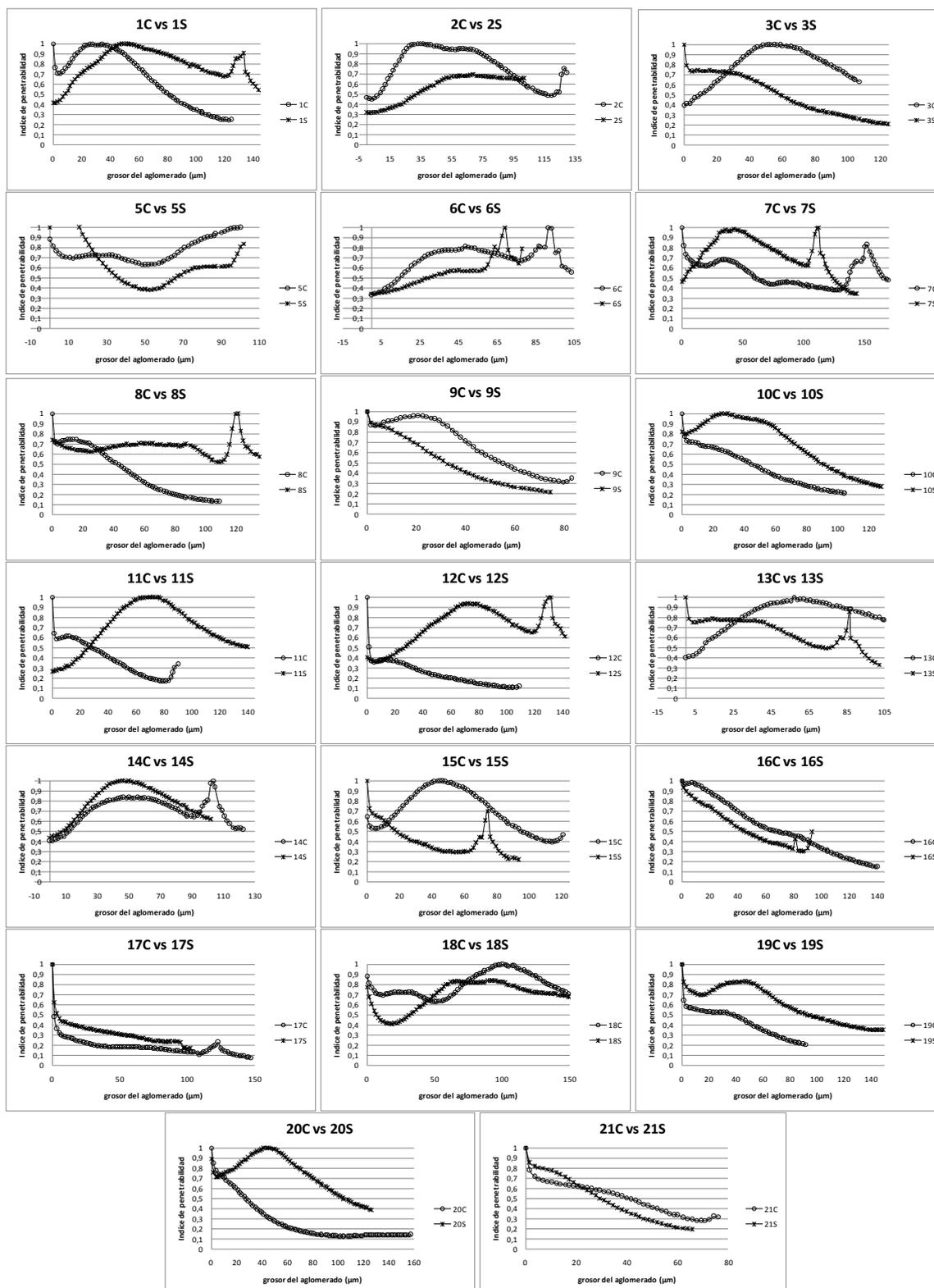


Figura 27. Perfiles de penetrabilidad de los polvos con y sin α -Tocoferol superficial. (C) Con AT superficial (S) Sin AT superficial.

Aunque no se consiguió relacionar las coordenadas de color de los polvos sometidos a la extracción con la cuantificación total de AT, el valor de “a” máximo de los polvos sin extracción presentaron una correlación polinomial de segundo orden con la eficiencia de cuantificación total (Figura 28).

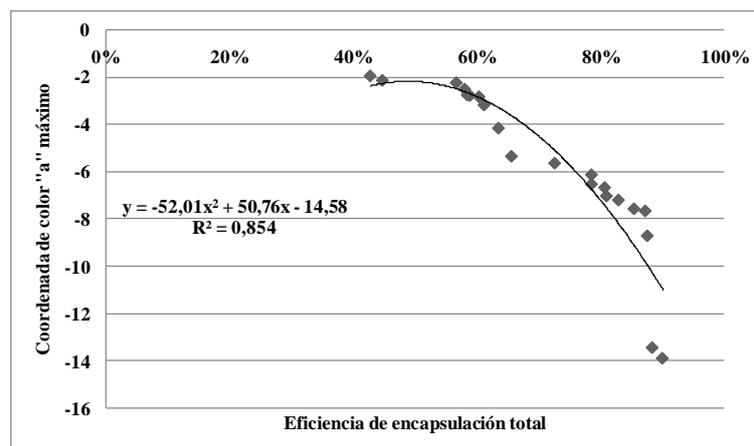


Figura 28. Correlación de la coordenada de color “a” máximo de cada uno de los polvos y la respectiva eficiencia de encapsulación.

Cabe resaltar que esta propuesta de correlación del color con la concentración del AT no se ha reportado en ningún trabajo previo a la realización de estos experimentos, es uno de los aportes más originales de esta tesis doctoral (Figura 28).

Finalmente se propusieron soluciones de optimización sugeridas por el modelo a las variables de respuesta, a continuación se presentan algunas opciones para resultados deseados. Las opciones se presentan en el Cuadro 17. La deseabilidad se define como el grado de cumplimiento de la propuesta a partir de los datos obtenidos en el diseño experimental

Cuadro 17. Posibles soluciones para la optimización de las variables.

OPTIMIZACIÓN	% α -Tocoferol	CICLOS MICROFLUIDIZADOR	RESULTADO	DESEABILIDAD
Maximizar la eficiencia total de encapsulación	17.00	1	86.32%	0.960
Minimizar la cantidad de α -Tocoferol extraíble	17.00	0	29.30%	1.000
Maximizar cantidad de α -Tocoferol encapsulado	28.0	2	32.00%	0.874
Maximizar el IA	17.00	0	0.71	0.968
Maximizar la eficiencia total de encapsulación por técnica de extracción de Kim <i>et al</i> , 2009	17.00	1	85.58%	0.968
Minimizar el tamaño de gota de la emulsion	17	2	356.19 nm	0.933

7. CONCLUSIONES

Todas las emulsiones en el proceso A presentaron diferencias significativas en el Diámetro de Feret sin ningún patrón específico de comportamiento. En el proceso B se evidenció diferencia significativa en 3:2:1, 3:1:1 y 2:2:1. Estos resultados indican que las proporciones y relaciones entre los materiales pared y el AT influyen en la variación de los parámetros morfométricos y en la cantidad de AT encapsulado.

Para el caso de los polvos, se encontró que la etapa de homogenización por la boquilla del secador (atomización) es un factor que influye en las características morfométricas de los mismos. Se puede concluir que la cantidad inicial de AT rige la cantidad de AT extraíble, pero es el acomodamiento y las relaciones de los materiales de pared durante el proceso de atomización los que determinan la cantidad de AT encapsulado.

Los valores más bajos de atrapamiento se obtuvieron en aquellas cápsulas en las que la proporción de maltodextrina- AT fue mayor (3:1) y los mayores valores se obtuvieron en los que la proporción goma-AT fue menor (1:1).

El análisis de penetrabilidad permitió determinar los diferentes efectos de aglomeración que presenta el AT superficial en los polvos analizados a través de microscopía confocal.

El análisis de la dimensión fractal de contorno y textura corroboraron los resultados anteriormente expuestos, la disminución de la D_{Fc} y de la D_{Ft} después de la extracción del AT superficial explican el grado de desaglomeración que se presenta en los polvos al disminuir la cantidad de fase lipídica en la superficie y por ende reducir los tamaños hasta un 20%. Los valores de D_{Fc} y D_{Ft} permitieron caracterizar cuantitativamente la superficie y morfometría de los polvos productos de emulsiones homogenizadas y no homogenizadas antes y después de la extracción presentando diferencias significativas.

Por medio de las microscopías empleadas (óptica, electrónica y confocal) y las técnicas de evaluación de encapsulación a partir de extracción con solventes RMN, HPLC, se pudo diferenciar el AT superficial y encapsulado determinando su acomodamiento en la cápsula a través de la penetrabilidad y el análisis del color de los polvos.

Se determinó el efecto que tiene el tamaño de gota de la emulsión en la eficiencia de encapsulación de los polvos encontrando una relación inversamente proporcional entre los dos parámetros. A menores tamaños se obtuvieron mayores eficiencias de encapsulación.

Se evidenció una diferencia en la eficiencia de encapsulación entre los polvos obtenidos a partir de emulsiones homogenizadas por boquilla y aquellos obtenidos a partir de emulsiones homogenizadas por microfluidizador (46-76% y 43-90% respectivamente). Como era de esperarse la formación de núcleos o cápsulas fue mayor en el polvo producto de las emulsiones sometidas a dos pasos por boquilla, o ciclos del microfluidizador, es decir en donde el proceso de nucleación fue “doble”.

La cantidad de AT expuesto en la superficie de las cápsulas es un efecto de la recoalescencia que generan los esfuerzos de corte y turbulencia a los que se someten las emulsiones durante el proceso de encapsulación.

Finalmente se encontró una correlación de segundo orden entre la coordenada de color “a” máximo de los polvos y el % de eficiencia de encapsulación, una de las propuestas más originales de este trabajo. El uso que se le dé a esta relación cuadrática, ayudará a evitar el uso de disolventes en la determinación de la cantidad de AT a través de técnicas no invasivas como la microscopia confocal, evitando así el uso de técnicas analíticas costosas y menos favorables con el medio ambiente.

8. NOMENCLATURA

α -Tocoferol: Alfa-tocoferol

AT: Alfa-Tocoferol

%: porcentaje

a: Coordenada de color “a” del sistema de coordenadas *Lab*

ΔG : Energía libre de Gibbs.

nm: nanómetros

μm : micrómetros

>: mayor que

<: menor que

\approx : aproximadamente

O/W: Emulsiones de aceite en agua

rpm: revoluciones por minuto

β -caroteno: Beta-caroteno

p: probabilidad

MPa: mega-pascales

mg: miligramos

CI: Cámara de Interacción

MAP: Módulo Auxiliar de Procesamiento

DE: Equivalentes de Dextrosa

LbL: Layer by Layer

β -tocoferol: Beta-tocoferol

γ -tocoferol:

δ -tocoferol:

CLSM: Confocal Laser Scanning Microscopy

TEM: Transmission Electronical Microscopy

SEM: Scanning Electronical Microscopy

ESEM: Environmental Scanning Electronical Microscopy

Fractus: roto en latín

Frangere: romper para crear fragmentos irregulares en latín

Box-counting: conteo de cajas

DFc: Dimensión Fractal de contorno

DFp: Dimensión Fractal de perímetro

m: pendiente

A: Proceso que comprende Pre-emulsión, homogenización fuera del secador y aspersión dentro del secador

B: Proceso que comprende Pre-emulsión y aspersión dentro del secador

PE: Pre-emulsión

EA1: Emulsión del proceso A atomizada en la etapa 1 (homogenización)

EA2: Emulsión del proceso A atomizada en la etapa 2 (secado por aspersión)

EB2: Emulsión del proceso B atomizada en la etapa 2 (secado por aspersión)

PA: Polvo producto del proceso A

PB: Polvo producto del proceso B

a_w : Actividad de agua

EE: Eficiencia de Encapsulación

min: minutos

μ L: micro-litros

mL: mili-litros

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

δ : desplazamientos químicos

ppm: partes por millón

TMS: tetrametilsilano

NT: transientes

s: segundos

M: Peso molecular de la muestra problema

M_e : Peso molecular del estándar

I: Intensidad de la integral de la muestra problema

I_e : Intensidad de la integral de estándar

n: No. De protones de la muestra problema

n_e : No. De protones del estándar

W_e : Peso del estándar

g: gramos

HPLC: por sus siglas en inglés High Performance Liquid Chromatography

mm: mili-metros

$^{\circ}$ C: grados centígrados

v: volumen

g: gramos

Scan mode: modo de escaneo

IA: Índice de Atrapamiento

P: penetabilidad

Fill holes: llenar huecos

Settings: Parámetros

D: Dimensión Fractal

P: perímetro

k: constante de escala para determinación de la dimensión fractal

A: Área

Log: Logaritmo

DFt: Dimensión Fractal de textura

Crops: corte

Plugin:

Kg: Kilo-gramo

m²: metro cuadrado

color: color en inglés

color space converter: convertidor del espacio de color en inglés

RGB: coordenadas de color R Rojo, G verde y B azul

Histogram: histograma

b.s: base seca

TDSC: AT Disponible en la Superficie de la Cápsula

TE: AT Encapsulado

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abramowitz M. y Davidson M. W. 2007. Introduction to Microscopy. En: *Molecular Expressions*. ED. Retrieved. Pp. 08-22.
- Acevedo N., Vilbert B., Buera P. y Aguilera J. M. 2008. Microstructure affects the rate of chemical, physical and color changes during storage of dried apple disc. *Journal of Food Engineering* 85:222-231.
- Adams M., Lavasanifar A. y Kwon G. 2003. Amphiphilic block copolymers for drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Science* 92 (7):1343-1355.
- Aguilera J. M. 2001. Tamaño y forma de partículas. En: *Métodos para Medir Propiedades Físicas en Industrias de Alimentos*. Editores: Juan D. Alvarado., José M. Aguilera. ED. Acribia S.A., Zaragoza España. pp 29-47.
- Akagi T., Baba M., y Mitsuru Akashi M. 2007. Preparation of nanoparticles by the self-organization of polymers consisting of hydrophobic and hydrophilic segments: Potential applications. *Polymer* 48: 6729-6747.
- Aguilera J. M. y Stanley D. W. 1999. Examining food microstructure. En: *Microstructural Principles of Food Processing and Engineering*. Editores: José M. Aguilera y David W. Stanley. ED. Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland. pp 1-70.
- Aguilera J.M., Stanley D.W. y Baker K.W. 2000. New dimensions in microstructure of food products. *Trends in Food Science and Technology* 11: 3-9.
- Alamilla-Beltran L., Hernández-Parada A., Chanona-Pérez J., Jiménez-Aparicio, A., Suárez-Fernández O., Santiago-Pineda T. y Gutierrez-Lopez G. 2001. Design and performance of a spray dryer for food processing, Proceedings of the 8Th International Conference of Engineering and Food. ICEF 8, J. Editores: Welti Chanes, G. V. Barbosa Cánovas and J. M. Aguilera, ED. Technomic Publishing Co., U.S.A, pp 1151-1155.
- Alamilla L., Chanona J., Jiménez, A. y Gutiérrez G. 2005. Description of morphological changes of particles along spray drying. *Journal of Food Engineering* 67:179-184.
- AOAC 1995. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th Ed. Arlington Virginia: *Association of Official Analytical Chemists International* 32.1.02.
- Barbosa G. V. y Juliano P. 2005. Physical and chemical properties of food powders. En: *Encapsulated and Powdered Foods*. Editor: Charles Onwulata. ED. BY Taylor & Francis Group L.L: C. pp 39-68.
- Barbosa G. V., Ortega E., Juliano P. y Yan H. 2005a. Food Powders En: *Physical Properties, Processing, and Functionality*. Editores: Gustavo Barbosa, Enrique Ortega, Pablo Juliano y Hong Yang. ED. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York. pp 19-88.

- Barbosa M.I.M.J., Borsarelli C.D. y Mercadante A.Z. 2005b. Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations. *Food Research International* 38 (8–9): 989–994.
- Barletta B. y Barbosa G. 1993. Fractal analysis to characterize ruggedness changes in tapped agglomerated food powders. *Journal of Food Science* 58:1030-1046.
- Berger M. 2005. Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clinical Nutrition* 24:172–183.
- Bhandari B. 2005. Spray drying- an encapsulation technique for food flavors. En: *Drying of Products of Biological Origin*. Mujumdar, A.S. Editores: Science Publishers: Enfield USA.
- Bhandari B.R., Dumoulin E.D., Richard H.M.J. Noleau I. y Lebert A.M. 1992. Flavor encapsulation by spray drying – application to citral and linalyl acetate. *Journal of Food Science* 57 (1): 217–221.
- Boom R., 2008. Emulsions: En: *Food Materials Science, Principles and Practice*. Principles and Preparation. Editores: Aguilera J. Lillford P. ED. Springer. Helistong, UK pp 305-339.
- Bilensoy E., Gürkaynak O.A. y Atilla A. 2008. Safety and efficacy of amphiphilic β -cyclodextrin nanoparticles for paclitaxel delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 347: 163–170.
- Blake C. 2007. Status of methodology for the determination of fat-soluble vitamins in foods, dietary supplements, and vitamin premixes. *Journal of AOAC International* 90 (4): 897-910.
- Bruckner M., Bade M. y Kunz B. 2007. Investigations into the stabilization of a volatile aroma compound using a combined emulsification and spray drying process. *European Food Research Technology* 226:137–146.
- Brunelleschi S., Bardelli C., Amoruso A., Gunella G., Ieri F., Romani A., Malorni W. y Franconi F. 2007. Minor polar compounds extra-virgin olive oil extract (MPC-OOE) inhibits NF- κ B translocation in human monocyte/macrophages. *Pharmacological Research* 56 (6): 542-549.
- Burrough P.A. 1986. Principles of geographical systems for land resources assessment. En: *Principles of Geographical Information Systems for land resources assessment*. ED. Clarendon Press, Oxford. Pp. 193.
- Cai K., Rechtenbach A., Hao J., Bossert J. y Jandt K. 2005. Polysaccharide-protein surface modification of titanium via a layer-by-layer technique: Characterization and cell behaviour aspects. *Biomaterials* 26: 5960-5971.
- Camacho-Díaz B., Jiménez –Aparicio A., Chanona-Pérez J., Calderón-Domínguez G., Alamilla-Beltrán L., Hernández-Sánchez H. y Gutiérrez-López G. 2010. Morphological characterization of the growing front of *Rhizopus oligosporus* in solid media. *Journal of Food Engineering* 101(3):309-317.
- Campos R., Hernández H., Chanona J., Alamilla L., Jiménez A., Fito P. y Gutiérrez G. 2007. Non-isotropic shrinkage and interfaces during convective drying of potato slabs within the frame of the systematic approach to food engineering systems (SAFES) methodology. *Journal of Food Engineering* 83: 285-292.

- Champagne, P. y Fustier, P. 2007. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology* 18:184-190.
- Chanona J., Alamilla L. y Gutiérrez G. 2001. Caos y geometría de fractales, herramientas auxiliares para evaluar la complejidad del entorno biológico. *Biotecnología* 5:117-126.
- Chanona J., Alamilla L., Farrera R., Quevedo R., Aguilera J.M. y Gutiérrez G. 2003. Description of the convective air-drying of a food model by means of the fractal theory. *Food Science and Technology International* 9:207-213.
- Chanona J., Quevedo R., Jimenez A.R., Gumeta C., Mendoza J.A., Calderón G., Alamilla L. y Gutierrez G.F. 2008. Image processing methods and fractal analysis for quantitative evaluation of size, shape, structure and microstructure in food materials. En: *Food Engineering Integrated Approaches*, Editores: G. F. Gutierrez-López, G. V. Barbosa-Cánovas, J. Welti-Chanes, E. Parada-Arias. ED. Springer Pp. 277-285.
- Charcosset C. 2009. Preparation of emulsions and particles by membrane emulsification for the food processing industry. *Journal of Food Engineering* 92:241-249.
- Chen W., Yuan S., Hsiao H. Y Hsieh C. 2003. Algorithms to estimating fractal dimension of texture images. *IEEE International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing* 3,1541-1544.
- Cheong J., Tan C., Man Y.y Misran M., 2008. α -Tocopherol nanodispersions: Preparation, characterization and stability evaluation. *Journal of Food Engineering* 89: 204-209
- Chi-Fai C., Shiuan-Huei W. y Gow-Chin Y.,2007. The development of regulations for food nanotechnology. *Trends in Food Science & Technology* 18: 269-280 Review.
- Colas J.C., Shi W., Rao V.S.N.M., Omri A., Mozafari M.R. y Singh H. 2007. Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. *Micron* 38(8):841-847
- Coulter S.T., Jenness R. y Geddes W.F. 1951. Physical and chemical aspects of the production, storage and utility of dry milk products. En: *Advances in Food Research*. Editores: M.R Mrak y George F. Stewart. ED. Academic Press Inc., London. Pp 47-106.
- De Luca G., Di Maio F., Di Renzo A. y Drioli E. 2008. Droplet detachment in cross-flow membrane emulsification: comparison among torque- and force-based models. *Chemical Engineering Process* 47: 1150-1158.
- Donsì F., Annunziata M., Sessa M. y Ferrari G. 2011. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT - Food Science and Technology* DOI:10.1016/j.lwt.2011.03.003.
- Drusch S., Serfert Y., Van Den Heuvel A. y Schwarz K. 2006. Physicochemical characterization and oxidative stability of fish oil encapsulated in an amorphous matrix containing trehalose. *Food Research International* 39: 807-815.

- Drusch S. y Berg S.. 2008. Extractable oil in microcapsules prepared by spray-drying: Localisation, determination and impact on oxidative stability. *Food Chemistry* 109: 17–24.
- Dumoulin E. 2008. From powders end use properties to process engineering. En: *Food Engineering Integrated Approaches*. Editores: Gustavo Gutiérrez, Gustavo Barbosa, Jorge Welti y Efrén Parada. Food Engineering Series. ED. Springer. EUA. Pp 243-254.
- Dürrenberger M.B., Handschin S., Conde-Petit B. y Escher F. 2001. Visualization of Food Structure by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). *LWT - Food Science and Technology* 34: 11-17.
- Dziezak J.D. 1988. Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technology* 42(4):136-151.
- Elder A. y Oberdorster G. 2005. Translocation and effects of ultrafine particles outside of the lung. *Clinical Occupational Environmental Medicine* 5(4):785–796.
- Fang X., Shima M. y Adachi S. 2005. Effects of drying conditions on the oxidation of linoleic acid encapsulated with gum arabic by spray-drying. *Food Science and Technology Research* 11 (4): 380–384.
- Farias M., Moura M., Leonardo Andrade L. y Miguez M. 2007. Encapsulation of the Alpha-tocopherol in a Glassy Food Model Matrix. *Materials Research* 10 (1): 57-62.
- Flores-Andrade E., Beristain C., Vernon-Carter J., Gutiérrez G. y Azuara E. 2009. Enthalpy-entropy compensation and water transfer mechanism in osmotically dehydrated agar gel. *Drying technology* 27(9):999-1009.
- Fery A. y Weinkamer R. 2007. Mechanical properties of micro- and nanocapsules: Single-capsule measurements. *Polymer* 48: 7221-7235.
- Geerken M., Lammertink R., Wessling M. 2007. Interfacial aspects of water drop formation at micro-engineered orifices. *Journal Colloid Interface Science* 312:460–471
- Gharsallaoui A., Roudaut G., Chambin O., Voilley A. y Saurel R. 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International* 40: 1107-1121.
- González-Rodríguez M. L., Barros L. B., Palma J., González-Rodríguez P. L. y Tabasco A. M., 2007. Application of statistical experimental design to study the formulation variables influencing the coating process of lidocaine liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 337: 336–345.
- Goya G.F., Marcos-Campos I., Fernández-Pacheco R., Sáez B., Godino J., Asín L., Lambea J. y Tres A. 2008. Dendritic cell uptake of iron-based magnetic nanoparticles. *Cell Biology International* 32:1001–1005
- Gref R., Rodrigues J. y Couvreur P. 2002. Polysaccharides grafted with polyesters: novel amphiphilic copolymers for biomedical applications. *Macromolecules* 35: 9861–9867.

- Hecht J.P. y King, C.J. 2000. Spray drying: Influence of developing drop morphology on drying rates and retention of volatile substances. 2. *Modeling. Industrial & Engineering Chemistry Research* 39 (6): 1766–1774.
- Hogan S.A., O’riordan E.D. y O’sullivan M. 2003. Microencapsulation and oxidative stability of spray-dried fish oil emulsions. *Journal of Microencapsulation* 20 (5):675–688.
- Hornig S. y Heinze T. 2007. Nanoscale structures of dextran esters. *Carbohydrate Polymers* 68:280–286.
- Hu S.H., Liu T.Y., Liu K.H., Liu D.M. y Chen S.Y. 2007. Nano-ferrosponges for controlled drug release. *Journal of Controlled Release* 121(3): 181–189
- ISO 13320:2009, International Organization of Standardization. Particle size analysis by Laser diffraction.
- Izquierdo P., Esquena J., Tadros T. F., Dederen C., Garcia M. J., Azemar N. y Solans C. 2002. *Phase behavior and nanoemulsion formation by the phase inversion temperature method. Langmuir* 18:26–30.
- Jafari S., He Y. y Bhandari B. 2007. Optimization of nano-emulsions production by microfluidization. *European Food Research Technology* 225:733–741.
- Jafari S., Assadpoor E., Bhandari B. y He Y. 2008a. Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying. *Food Research International* 41:172–183.
- Jafari S., Assadpoor E., Bhandari B. y He Y. 2008b. Encapsulation efficiency of food flavors and oils during spray drying. *Drying Technology* 26:816–835.
- James B.J. y Smith B.G. 2009. Surface structure and composition of fresh and bllmed chocolate analysed using X-ray photoelectron spectroscopy, cryoscanning electron microscopy and environmental scanning electron microscopy. *LWT-Food Science and Technology* 42, 929-937.
- Jian Y., Yuang-lin Z., Okamoto T., Ichino R. y Okido M. 2007. A new method for preparing hydrophobic nano-copper powders. *Journal of Materials Science* 42:7638–7642.
- Jiménez M., García H. S., y Beristain C. I., 2004. Spray-drying microencapsulation and oxidative stability of conjugated linoleic acid. *European Food Research and Technology* 219: 588-592.
- Jiménez J.C., Salcedo M.G., Martínez B.B., Chanona P.J., Alamilla B.L., Arenas O.M., Gutiérrez L.G. y Jiménez A.R. 2005. Naturaleza fractal de células en suspensión de *Beta vulgaris* L., sometidas a un proceso de permeabilización. *Biótica* 2: 39-53.
- Jinapong N., Suphantharika M. y Jamnong P. 2008. Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration. *Journal of Food Engineering* 84: 194–205.
- Kanakdane D., Boshale R. y Singhale R. 2007. Stability of cumin oleoresin microencapsulated in different combination of gum arabic, maltodextrin and modified starch. *Carbohydrate Polymers* 67: 536 - 541.

- Kaszuba M., McKnight D., Connah M., McNeil-Watson F. y Nobbmann U. 2008. Measuring sub nanometre sizes using dynamic Light scattering. *Journal of Nanoparticle Research* 10: 823:829.
- Kawatsu T., Trägårdh G., Trägårdh C. 2001. Production of W/O/W emulsions and S/O/W pectin microcapsules by microchannel emulsification. *Colloid Surface* 189 (1-3) 257:264.
- Kenkel N.C. y Walker D.J. 1999. Fractals in the Biological Sciences. Winnipeg R3T 2N2 Canada.
- Keogh M.K. y O’Kennedy B.T. 1999. Milk fat microencapsulation using whey proteins. *International Dairy Journal* 9 (9): 657–663.
- Kim E., Chen X.D. and Pearce D. 2002. Surface characterization of four industrial spray-dried dairy powders in relation to chemical composition, structure and wetting property. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 26:197-212.
- Kim E., Dong D. and Pearce D. 2003. On the mechanisms of surface formation and the surface compositions of industrial milk powders. *Drying Technology* 21: 265-278.
- Kim E., Dong D. and Pearce D. 2005. Melting characteristics of the fat present on the surface of industrial spray-dried dairy powders. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 42:1-8.
- Kim E., Chen, X.D. and Pearce, D. 2009a. Surface composition of industrial spray-dried milk powders. 1. Development of surface composition during manufacture. *Journal of Food Engineering* 94: 163-168.
- Kim E., Chen X.D. and Pearce D. 2009b. Surface composition of industrial spray-dried milk powders. 2. Effects of spray drying conditions on the surface composition. *Journal of Food Engineering* 94, 169-181.
- Kim E., Chen X.D. and Pearce D. 2009c. Surface composition of industrial spray-dried milk powders. 3. Changes in the surface composition during long-term storage. *Journal of Food Engineering* 94: 182–191.
- King A.H. 1995. Encapsulation of Food Ingredients – a Review of Available Technology, Focusing on Hydrocolloids. En: Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients 590: 26–39.
- King, C.J. 1995. Spray-drying – retention of volatile compounds revisited. *Drying Technology* 13 (5-7): 1221–1240.
- Klaypradit W. y Huang Y., 2008. Fish oil encapsulation with chitosan using ultrasonic atomizer. *LWT - Food Science and Technology* 41: 1113- 1139.
- Klinkesorn U., Sophanodora P., Chinachoti P., Decker E.A. y McClements D.J. 2006. Characterization of spray-dried tuna oil emulsified in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition. *Food Research International* 39(4), 449–57.
- Koupantsis T. y Kiosseoglou V. 2009. Whey protein-carboxymethylcellulose interaction in solution and in oil-in-water emulsion systems. Effect on emulsion stability. *Food Colloid* 23:1156–1163.

- Kobaslija M. y Mcquade T. 2006. Polyurea Microcapsules from Oil-in-Oil Emulsions via Interfacial Polymerization. *Macromolecules* 39: 6371-6375.
- Krishnan S., Kshirsagar A. y Singhal R. 2005. The use of gum arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. *Carbohydrate Polymers* 62: 309-315.
- Krol S., Del Guerra S., Grupillo M., Diaspro A., Gliozzi A., y Marchetti P. 2006. Multilayer Nanoencapsulation. New Approach for Immune Protection of Human Pancreatic Islets. *Nano Letters* 6 (9):1933-1939
- Kuo F., Subramanian B., Kotyla T., Wilson T.A., Yoganathan S. y Nicolos R.J. 2008. Nanoemulsions of an anti-oxidant synergy formulation containing gamma tocopherol have enhanced bioavailability and anti-inflammatory properties. *International Journal Pharmaceutical* 363(1-2):206-213.
- Kurozawa L.E., Morassi A.G., Vanzo A.A., Park K.J. y Hubinger, M.D. 2009 Influence of spray drying conditions on physicochemical properties of chicken meat powder. *Drying Technology* 27 (11): 1248-1257.
- Laroche C., Fine F. y Gervais P. 2005. Water activity affects heat resistance of microorganisms in food powders. *International Journal of Food Microbiology* 97:307-315.
- Lee S., Lefèvre T., Subirade M., Paquin P. 2009. Effects of ultra-high pressure homogenization on the properties and structure of interfacial protein layer in whey protein-stabilized emulsion. *Food Chemistry*, 113:191-198.
- Lekago J. y Dunford N. T. 2010. Effect of Spray Nozzle Design on Fish Oil-Whey Protein Microcapsule Properties. *Journal of Food Science* 75(6): E94-E97.
- Leong T.S.H., Wooster T.J., Kentish S.E., Ashokkumar M. 2009. Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. *Ultrasonic Sonochemistry* 16(6):721-727
- Li W. y Szoka F. 2007. Lipid-based Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery. *Pharmaceutical Research* 24 (3):1-12.
- Liang M., Davies N. y Toth I. 2008. Increasing entrapment of peptides within poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles prepared from water-in-oil microemulsions by copolymerization. *International Journal Pharmacy* 362(1-2):141-146.
- Liu X.D., Furuta T., Yoshii H. y Linko P. 2000. Retention of emulsified flavor in a single droplet during drying. *Food Science and Technology Research* 6 (4): 335-339.
- Lira, J., 2002. Descriptores Morfológicos. Introducción al tratamiento digital de imágenes. *Ciencia de la Computación*. México.
- Lobo L. y Svereika A. 2003. Coalescence During Emulsification. 2. Role of Small Molecule Surfactants. *Journal of Colloid Interface Science*.261: 498-507
- López A., Gavara R. y Lagaron J. 2006. Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through biomaterials. *Trends in Food Science & Technology* 17: 567-575.

- López A., Chemtob A., Milton J.L., Manea M., Paulis M., Barandiaran M.J., Theisinger S. y Asua J.M. 2008. Miniemulsification of monomer-resin hybrid systems. *Industrial Engineering Chemical Research* 47(16): 6289–6297.
- Lunn J. 2007. Monounsaturates in the diet Review. *British Nutrition Foundation, Nutrition Boletín* 32: 78-391.
- Luo Y. y Gu H., 2007. Nanoencapsulation Via Interfacially Confined Reversible Addition Fragmentation Transfer (RAFT) Miniemulsion Polymerization. *Polymer* 48: 3262-3272.
- Luo Y. y Zhoe X. 2004. Nanoencapsulation of a Hydrophobic Compound by a Miniemulsion Polymerization Process. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 42: 2145–2154.
- Maa Y.F. y Hsu C.C. 1999. Performance of sonication and microfluidization for liquid –liquid emulsification. *Pharmaceutical Development and Technology* 4:233–240
- Madene A., Jacquot M., Scher J. y Desobry S., 2006. Flavour encapsulation and controlled release – A review. *International Journal of Food Science and Technology* 41: 1-21.
- Maestro A., Sole I., González C., Solans C., Gutiérrez J.M. 2008. Influence of the phase behavior on the properties of ionic nanoemulsiones prepared by the phase inversion composition method. *Journal of Colloids Interface Sciences* 327:433–439
- Marabi A., Mayor G., Burbidge A., Wallach R. y Saguy I. 2007. Assessing dissolution kinetics of powders by a single particle approach. *Chemical Engineering Journal* 139:118-127.
- Martins P. y Kieckbusch T. 2008. Influence of lipid phase on steam jet agglomeration of maltodextrin powders. *Powder Technology* 185:258-266.
- Marotti R., 2007. Del Estado Sólido a los Nanomateriales: Modificando las Propiedades de la Materia. Grupo de Física del Estado Sólido, Instituto de Física, Facultad de Ingeniería, Universidad de la República 1-8.
- Masters K. 1985. An introduction to principles, operational practice and applications. En: *Spray Drying*. ED: Leonard Hill. London. Pp 165-345.
- Matsuno R. y Adachi S. 1993. Lipid encapsulation technology – Techniques and applications to food. *Trends in Food Science and Technology* 4: 256–261.
- Mayer U.M., Müller Y. y Blüthner K. 2001. The vitamins C and E protect cultures of bovine lens epithelia from light toxicity (blue light 430 nm, UV-A-Light 300-400 nm) *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 218 (2): 116-120
- McClements D. 2006. Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. *Biotechnology Advances* 24: 621–625.
- Meraz-Torres L.S., Quintanilla-Carvajal M.X., Hernández-Sánchez H., Téllez-Medina D.I., Alamilla-Beltrán L. y Gutiérrez-López G.F. 2011. Evaluación de la cinética del ángulo de contacto durante la humectación de aglomerados de maltodextrina. *Revista mexicana de Ingeniería Química*, In press.

- Microfluidics, 1996. International Corp. Microfluidizer Processor User Guide.
- Min K., Park K., Kim Y.S., Bae S.M., Lee S., Jo H.G., Park R.W. y Kwon I.C. 2008. Hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles- encapsulated camptothecin enhance the drug stability and tumor targeting in cancer therapy. *Journal of Controlled Release* 127(3):208–218
- Miyanaga K., Seki M. y Furusaki S. 2000. Analysis of Pigment Accumulation Heterogeneity in Plant Cell Population by Image-Processing System. *Biotechnology and Bioengineering* 67(4): 493-497.
- Mongenot N., Charrier S. y Chalier P. 2000. Effect of ultrasound emulsification on cheese aroma encapsulation by carbohydrates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (3):861–867.
- Mozafari R. M. 2005. Liposomes: An Overview of Manufacturing Techniques. *Cellular & Molecular Biology Letters* 10: 711-719
- Moinard-Chécot D., Chevalier Y., Briçon S., Beney L. y Fessi H. 2008. Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion–diffusion process. *Journal of Colloid and Interface Science* 317: 458–468.
- Mozafari R. M. 2006. Recent trends in the lipid based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86 (13):154-160.
- Muñoz-Herrera A.L., Tejeda-Hernández V., Jiménez-Aparicio A., Welti-Chanes J., Chanona Pérez J. J., Alamilla-Beltrán L. y Gutiérrez-López G. 2009. Microstructural, physical and rehydration properties of maltodextrin powders obtained by spray drying. En: *Water Properties in Food, Health, Pharmaceutical and Biological Systems: ISOPOW 10*. Editores: Reid, S. y Sajjaanantakul T. ED. Wiley-Blackwell. Pp 673-680.
- National Nanotechnology Initiative (INN). 2007 Nanotechnology Big Things from a Tiny World. www.nano.gov Accesado el 17 de Septiembre de 2008.
- Nichifor M., Lopes A., Carpov A., y Melo, E. 1999. Aggregation in water of dextran hydrophobically modified with bile acids. *Macromolecules* 32: 7078–7085.
- Nisisako T. 2008. Microstructured devices for preparing controlled multiple emulsions. *Chemical Engineering Technology* 31(8):1091-1098.
- Oliva M., Díez-Pérez I., Gorostiza P., Lastra C., Oliva I., Caramella C. y Marin E. 2003. Self-Assembly of Drug–Polymer Complexes: A spontaneous nanoencapsulation process monitored by atomic force microscopy. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 92 (1):77-83.
- Olson D.W., White C.H. y Richter R.L. 2004. Effect of pressure and fat content on particle sizes in microfluidized milk. *Journal of Dairy Sciences* 87:3217-3223.
- Park J.K. y Chang H.N. 2000. Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnology Advances* 18:303–319.
- Pedreschi F., Mery D., Mendoza F. y Aguilera J. M. 2004. Classification of potato chips using pattern recognition. *Journal of Food Science* 69:264-270.

- Peleg M. y Normand M. D. 1987. Computer simulation of the attrition patterns of particulate and agglomerated foods. *Journal of Food Science* 52:943-947.
- Perea-Flores M.J., Chanona-Pérez J.J., Terres-Rojas E., Calderon-Dominguez G., Garibay-Febles V., Alamilla-Beltran L. and Gutierrez-Lopez G.F. 2010. Microstructure structure characterization of milk powders and their relationship with rehydration properties. En: *Spray Drying Technology*, Editores: M.W. Woo, A.S. Mujumdar y W.R.W. Dau. Editorial Transport Processes Research (TPR), Singapore. Pp 197-219.
- Pérez-Alonso C., Baez-Gonzalez J., Beristain C., Vernon-Carter E. y Vizcarra Mendoza M., 2003. Estimation of the activation energy of carbohydrate polymers blends as selection criteria for their use as wall material for spray-dried microcapsules. *Carbohydrate polymers*, 53, 197–203.
- Pérez-Alonso C., Beristain C., Lobatos-Calleros C., Rodríguez-Huezo M. y Vernon-Carter E., 2006. Thermodynamic analysis of the sorption isotherms of pure and blended carbohydrate polymers. *Carbohydrate polymers* 77: 753–760.
- Pérez-Alonso C., Cruz-Olivares J., Barrera-Pichardo J., Rodríguez-Huezo M., Báez-González J. y, Vernon-Carter E., 2008. DSC thermo-oxidative stability of red chili oleoresin microencapsulated in blended biopolymers matrices. *Journal of Food Engineering* 85: 613–624.
- Pires A., Hegg R., Valduga C.J., Graziani S.R., Rodrigues D.G., Maranhãô R.C. 2009. Use of cholesterol-rich nanoparticles that bind to lipoprotein receptors as a vehicle to paclitaxel in the treatment of breast cancer: pharmacokinetics, tumor uptake and a pilot clinical study. *Cancer Chemical Pharmacology* 63:281–287.
- Quevedo R., Lopez-G C., Aguilera J. M. y Cadoche L. 2002. Description of food surfaces and microstructural changes using fractal image texture analysis. *Journal of Food Engineering* 53: 361–371.
- Quintanilla-Carvajal M.X. 2007. Caracterización morfométrica y colorimétrica de capítulos florales y lígulas de *Tagetes erecta* y *Tagetes patula* a través de Análisis Digital de Imágenes (ADI) y Análisis de Dimensión Fractal (ADF). Tesis de licenciatura. Centro de Desarrollo de Productos Bioticos (CEPROBI). Instituto Politécnico Nacional, Yautepec-Morelos, México.
- Quintanilla-Carvajal M. X., Camacho-Díaz B. H., Meraz-Torres L.S., Chanona-Pérez J.J., Alamilla-Beltrán L., Jiménez-Aparicio A. R y Gutiérrez-López G. F. 2009. Nanoencapsulation: a new trend in food engineering processing. *Food Engineering Reviews* 2(1):39-50.
- Re M.I. y Liu Y. J.1996. In Microencapsulation by spray drying: Influence of wall systems on the retention of the volatile compounds, Proc. 10th International Drying Symposium 1996. pp 541–549.
- Reineccius G.A. 2004. The spray drying of food flavors. *Drying Technology* 22 (6): 1289–1324.
- Ren Y., Wang G. y Huang J. 2007. Preparation of liquid-core nanocapsules from poly[(ethylene oxide-co-glycidol)] with multiple hydrophobic linoleates at an oil-water interface and its encapsulation of Pyrene. *Biomacromolecules* 8(6):1873–1880

- Risch S.J. y Reineccius G.A. 1988. Spray-dried orange oil – effect of emulsion size on flavor retention and shelf stability. *ACS Symposium Series* 370: 67–77.
- Rodríguez A., Losada V., Larraín M. A., Quitral V., Vinagre J y Aubourg S. 2007. Development of Lipid Changes Related to Quality Loss During the Frozen Storage of Farmed Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Journal of the American Oil Chemists' Society* 84 (8): 727-734.
- Rosenberg M. Kopelman I.J. y Talmon Y. 1990. Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38 (5): 1288–1294.
- Rosenkranz K., Kasper M., Werther J. y Brunner G. 2007. Encapsulation of irregularly shaped solid forms of proteins in a high-pressure fluidized bed. *Journal of Supercritical fluids* 46(3):351-357.
- Sankarikutty B. Sreekumar M.M., Narayanan C.S. y Mathew A.G. 1988. Studies on microencapsulation of cardamon oil by spray drying technique. *International Journal of Food Science and Technology* 25 (6): 352–356.
- Serizawa T., Iida K., Matsuno H., Kurita K. 2006. Prolonged degradation of end-capped polyelectrolyte multilayer films. *Polymer Bulletin* 57: 407–413.
- Silva, D.P. y Re M.I. 1996. En: Effect of the Emulsion Viscosity on the Volatiles Retention during Spray Drying Microencapsulation. Proceedings 24th Brazilian Congress on Porous Materials., Brazil. pp 196–201.
- Silva H., Cerqueira M., Souza B., Ribeiro C., Avides M.C., Quintas M., Coimbra J., Carneiro-da-Cunha M. y Vicente A. 2011. Nanoemulsions of β -carotene using a high-energy emulsification–evaporation technique. *Journal of Food Engineering* 102:130-135
- Shahidi F., y Han X. 1993. Encapsulation of ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 75:27-35.
- Schultz S., Wagner G., Urban K. y Ulrich J. 2004. High-Pressure Homogenization as a Process for Emulsion Formation. *Chemistry Engineering Technology* 27:361-368
- Skurtys O. y Aguilera J.M. 2008. Applications of microfluidic devices in food engineering. *Food Biophysics* 3(1):1810–1817
- Soottitantawat A., Yoshii H., Furuta T., Ohkawara M y Linko P. 2003. Microencapsulation by spray drying: influence of emulsion size on the retention of volatile compounds. *Food Engineering and Physical Properties* 68(7):2256-2262.
- Soottitantawat A., Yoshii H., Furuta T., Ohkawara M y Linko P. 2005. Influence of emulsion and powder size on the stability of encapsulated D-limonene by spray drying. *Innovative in Food Science and Emerging Technologies* 6:107-114.
- Stokes D.J. 2003. Recent advances in electron imaging, image interpretation and applications: environmental scanning electron microscopy. *Philosophical Transactions of The Royal Society Londre A*. 361: 2771-2787.

- Su Y.L., Fu Z.Y., Zhang J.Y., Wang W.M., Wang H., Wang Y.C. y Zhang Q.J. 2008. Microencapsulation of Radix salvia miltiorrhiza nanoparticles by spray-drying. *Powder Technology* 184: 114–121.
- Sui Z. 2004. Characterization and applications of pH-responsive polyelectrolyte complex and multilayers. Florida State University. <http://etd.lib.fsu.edu/theses/available/etd-07072004-171316/> Accesado el 10 Sept 2010
- Tan L.H. Chan L.W. y Heng P. W.S. 2005. Effect of oil loading on microspheres produced by spray drying. *Journal of Microencapsulation* 22 (3): 253–259.
- Tadros T., Izquierdo R., Esquena J. y Solans C. 2004. Formation and stability of nano-emulsions. *Advance Colloid Interface Science* 108–09:303–318.
- Takashima Y., Saito R., Nakajima A., Oda M., Kimura A., Kanazawa T. y Okada H. 2007. Spray-drying preparation of microparticles containing cationic PLGA nanospheres as gene carriers for avoiding aggregation of nanospheres. *International Journal of Pharmaceutics Pharmaceutical Nanotechnology* 343:262–269.
- Taylor M., Gaysinsky S., Davidson P., Bruce B. y Weiss J. 2007. Characterization of Antimicrobial-bearing Liposomes by z-Potential, Vesicle Size, and Encapsulation Efficiency. *Food Biophysics* 2: 1-9.
- Teunou E. y Poncelet D. 2005. Rotary disc atomisation for microencapsulation applications prediction of the particle trajectories. *Journal of Food Engineering* 71: 345-353.
- Tewa-Tagne P., Briçon S., Fessi H. 2007. Preparation of redispersible dry nanocapsules by means of spray-drying: Development and characterisation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 30 (2): 124-135
- Tonon R., Brabet C. y Hubinger M. 2008. Influence of process conditions on the physicochemical properties of acai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering* 88: 411–418.
- Ubaldi A., Delbono G., Fusari A. y Serventi P. 2005. Quick HPLC method to determine vitamin E concentration in cow's milk. *Faculty Medicine di Parma* 25,101-110.
- Uskokovic V., 2007. Nanotechnologies: What we do not know?. *Technology in Society* 29:43–61
- USP XXIV. 2000. The United States Pharmacopeial Convention, Inc.: Rockville, MD.
- Varahramyan K. y Lvov Y. 2007. Nanomanufacturing by Layer-by-Layer Assembly Institute for Micromanufacturing. Louisiana Tech University. www.latech.edu/coes/nanosystems.../NSE-facilities.shtm. Visitada el 12 de octubre de 2010.
- Vega C., Goff H.D. y Roos Y.H. 2005. Spray drying of high-sucrose dairy emulsions: Feasibility and physicochemical properties. *Journal of Food Science* 30:244–251
- Vega C. y Roos Y.H. 2006. Invited review: spray-dried dairy and dairy-like emulsions compositional. *Journal of Dairy Science* 89(2): 383-401.

- Vignolles M. L., Lopez C., Madec M. N., Ehrhardt J. J. Méjean S., Schuck P. y Jeantet R. 2009. Fat properties during homogenization, spray-drying, and storage affect the physical properties of dairy powders. *Journal of Dairy Science* 92:58–70.
- Voilley A.J. 1995. Flavor encapsulation – influence of encapsulation media on aroma retention during drying. In *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients* 590: 169–179.
- Wagner C., Yan L. y Wittemann A. 2008. Preparation of submicrometer- sized clusters from polymer spheres using ultrasonication. *Langmuir* 24 (21):12126–12128
- Walstra P. y R. Jenness. 1984. En: *Dairy Chemistry and Physics*. Editor: Pieter Walstra. ED. Marcel Dekker, Ink. Madison Avenue, New York. pp 251-278
- Weiss J., Takhistov P. y McClements, J. 2006. Functional Materials in Food Nanotechnology. *Journal of Food Science*. 71(9): R107-R116.
- Were M. L., Bruce B., Davidson M., Weiss J. 2003. Size, stability, and entrapment efficiency of phospholipid nanocapsules Containing Polypeptide Antimicrobials. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51:8073-8079.
- Windhab E. J., Dressler M., Feigl K., Fischer P. y Megias-Alguacil D. 2005. Emulsion processing from single-drop deformation to design of complex processes and products. *Chemical Engineering Science* 60:2101–2113.
- Witek M., Weglarz W.P., De Jong L., Van Dalen G., Blonk J.C.G., Heussen, P., Van Velzen E., Van As H. y Van Duynhoven J. 2010. The structural and hydration properties of heat-treated rice studied at multiple length scales. *Food Chemistry* 120: 1031-1040.
- Wooster T.J., Golding M. y Sanguansri P. 2008. Impact of oil type on nanoemulsion formation and ostwald ripening stability. *Langmuir* 24(22):12758–12765
- Wulff-Pérez M., Torcello-Gómez A., Gálvez-Ruíz M.J., Martín- Rodríguez A. 2009. Stability of emulsions for parenteral feeding: preparation and characterization of o/w nanoemulsions with natural oils and Pluronic f68 as surfactant. *Food Hydrocolloids* 24(4):1096–1102.
- Xia S., Xu S., Zhang X. y Zhong F. 2007. Effect of coenzyme Q10 incorporation on the characteristics of nanoliposomes. *Journal of Physical Chemistry B* 111(9):2200–2207.
- Xie J. y Wang C. 2005. Self-Assembled Biodegradable Nanoparticles Developed by Direct Dialysis for the Delivery of Paclitaxel. *Pharmaceutical Research* 22 (12): 2079-2090.
- Ye X. y Fernando S. 2007. Tuning catalyst and process for biodiesel production by means of emulsion and ultrasonic pretreatment. *Chemical Engineering Technology* 30(11):1481–1487
- Yu R., Chen H., Cheng W. y Chu M. 2008. Simultaneously monitoring the particle size distribution, morphology and suspended solids concentration in wastewater applying digital image analysis (DIA). *Environmental Monitoring and Assessment* 148:19-26.
- Yuan Y., Gao Y., Zhao J. y Mao L. 2008. Characterization and stability evaluation of b-carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. *Food Research International* 41(1):61–68.

- Yuliani S., Torley P., Arcy B., Nicholson T. y Bhandari B. 2006. Extrusion of mixtures of starch and D-limonene encapsulated with β -cyclodextrin: Flavour retention and physical properties. *Food Research International* 39: 318-339.
- Zeller B. L. y Saleeb F. Z. 1996. Production of microporous sugars for adsorption of volatile flavors. *Journal of Food Science* 61: 749-752, 756.
- Zhao X., Yang Z., Gai G. y Yang Y. 2009. Effect of superfine grinding on properties of ginger powder. *Journal of Food Engineering* 91:217-222.