



Universidad veracruzana

**MAESTRÍA EN CIENCIAS ALIMENTARIAS**

Instituto de Ciencias Básicas



**Propiedades Fisicoquímicas y Estabilidad de la Oleorresina de  
Paprika Micro y Nano Encapsulada**

**Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Alimentarias**

Presenta:

**QFB. Dafne Ivette Díaz Ramos**

Directores:

**Dra. Maribel Jiménez Fernández**

Instituto de Ciencias Básicas  
Universidad Veracruzana  
Xalapa-Equez., Veracruz, México

**Dra. Eugenia del Carmen Lugo Cervantes**

Centro de Investigación y Asistencia  
en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.  
Unidad Zapopan, Jalisco, México.

**Xalapa. Enríquez., Ver.**

**Agosto, 2016.**



La presente tesis titulada

**"Propiedades fisicoquímicas y estabilidad de la oleorresina de paprika micro y nano encapsulada",**

Realizada por la

**Q.F.B. DAFNE IVETTE DÍAZ RAMOS**

Ha sido aprobada por el comité de evaluación de tesis, y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

**Maestro en Ciencias Alimentarias**

Otorgando su autorización como jurado para ser presentada y defendida oralmente el 29 de agosto de 2016.

  
Dr. Cesar Ignacio Beristain Guevara

  
Dr. Oscar García-Barradas

  
Dra. María Remedios Mendoza López

## Dedicatorias

A mis **Padres** y **Hermana** quienes son las personas más importantes de mi vida y a los cuales amo, ya que a pesar de todo me siguen apoyado y la distancia no es obstáculo para brindarme todo su amor y comprensión.

A mi **Familia**, (primos, primas, tíos, tías, y mi abuelita) a cada uno de ellos porque me han brindado su apoyo incondicional para concluir una meta más en mi vida.

A mis directoras de tesis **Dra. Maribel Jiménez Fernández** y **Dra. Eugenia del Carmen Lugo Cervantes**, con gran cariño, admiración y respeto por todo el tiempo, esfuerzo y dedicación brindados a mi persona y a este proyecto.

## Agradecimientos

A **Dios** por las bendiciones dadas, por mi maravillosa familia y por poner en mi vida personas extraordinarias.

A mi madre **Sra. María de Jesús Ramos López**, por ser quien ha estado conmigo en las buenas y en las malas impulsándome a seguir siempre con sus sabios consejos y sobre todo por mostrarme siempre su amor. A mi padre **Profe. Ricardo Díaz Martínez**, por enseñarme que los obstáculos en la vida no son una barrera, sino, una forma de aprender y lograr lo que te propongas. Por todo esto y más, hoy les agradezco todo su gran amor, apoyo, confianza y esfuerzo en esta etapa de mi vida, los amo mucho y este logro es para ellos. A mi muy querida hermana **Lic. Daisy Ruth Díaz Ramos**, porque siempre ha estado conmigo y me ha brindado su cariño y apoyo incondicional y sé que a pesar de la distancia puedo contar con ella, te quiero y admiro mucho.

A los integrantes de mi **Familia**, por brindarme su apoyo y motivarme a seguir cumpliendo más sueños en mi vida profesional, los quiero mucho.

A la **Dra. Maribel Jiménez Fernández**, porque ha formado parte importante en mi desarrollo profesional y académico, me ha enseñado a superarme cada día con nuevos retos que se han vuelto experiencias extraordinarias en mi vida no solo profesional si no también personal, por sus consejos, apoyo y sobretodo su gran cariño brindado todos estos años, muchas gracias por enseñarme a crecer como persona, la admiro, respeto y la quiero mucho.

A la **Dra. Eugenia del Carmen Lugo Cervantes**, por toda su confianza depositada en mí y por todo el apoyo otorgado para el desarrollo de este proyecto, así como de haberme dado la oportunidad de trabajar con usted, es una excelente persona y una gran investigadora, por esto y más muchas gracias.

A mis sinodales, **Dr. César Ignacio Beristain Guevara**, **Dr. Oscar García Barradas** y **Dra. María Remedios Mendoza López** por el tiempo dedicado en la revisión y aportaciones realizadas para el enriquecimiento del presente trabajo, así

como también por sus conocimientos compartidos con mi persona, los cuales me ayudaron en mi crecimiento académico y profesional.

Al **Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco**, Unidad Zapopan (departamento de Tecnología Alimentaria), por permitirme realizar parte de este trabajo en su centro de investigación y con ello adquirir nuevos conocimientos, grandes investigadores y magnificas personas sus estudiantes de posgrado las cuales me apoyaron y brindaron su amistad.

A la **Sra. Ruth**, por sus consejos, apoyo y gran cariño brindados a mi persona, por hacerme sentir querida y por preocuparse siempre por mí, le tengo un enorme cariño y agradecimiento, que Dios la siga bendiciendo.

A mis **Amigos (as)**, quienes siempre estuvieron conmigo apoyándome y brindándome su cariño, solidaridad, tiempo y por su puesto su amistad. Todos son importantes para mí. Pero especialmente quiero agradecerles a tres personas que estuvieron conmigo compartiendo tristezas, alegrías, derrotas y éxitos que solo ellos saben. **Ing. José Erick ortega Valencia**, por esta gran amistad que creció y que agradezco a Dios por tenerla, por todo su apoyo brindado tanto en lo profesional como en lo personal, por compartir conmigo parte de sus conocimientos académicos, y por ser un excelente amigo, muchas gracias. **Ing. Jaqueline Stephanie Ley Martínez**, por ser una amiga incondicional, por apoyarme siempre en todo, por tus regañones y conocimientos compartidos conmigo, muchas gracias, en verdad te digo que existen muy pocas personas tan valiosas como tú en el mundo, sabes que te quiero. **Lic. Liesel Cerecedo Cruz**, por ser una amiga diferente, porque sus consejos, apoyo y amistad no son comunes, solo quienes te conocemos sabemos cuánto vales, gracias por cuidarme y apoyarme siempre que lo necesité, te quiero. A mis amigas de la Maestría (**Ing. Karina Hernández H., Ing. Flor de María Ortiz M., Ing. Jazmín Aurora Domínguez O.**) y compañeros del Laboratorio de alimentos, por hacer amena y divertida la estancia en estos años, por su apoyo y amistad brindados, gracias a todos ellos, sé que a todos les esperan grandes cosas en la vida.

Son muchos los amigos que Dios me ha dado y a quienes agradezco todo su apoyo brindado, especialmente a mis amigas (**Lic. Stephanie Gonzales Robles. Lic. Alexis Guillén Montiel. y Lic. Lizeth A. Lugo Ramírez**) por seguir apoyándome después de 14 años de amistad, magnificas personas profesionistas todas, las llevo siempre en mi corazón, las quiero.

A mis amigas (**Ing. Marianniz Toral Antonio, Ing. Abigail Ríos Toledo y C. Rosa Isela Oseguera Valenzuela**) porque siempre me han impulsado a seguir adelante, por su apoyo incondicional, consejos, motivación y gran amistad, excelentes personas y profesionistas, gracias por todo, las quiero.

A mis amigos (**Ing. Rosaelena Suárez M., Ing. Jesús I. Jiménez S., Ing. Alicia Pineda. e Ing. V. Rodrigo Victoria G.**) por su amistad, cariño y apoyo incondicional brindados en estos años, son especiales para mí, los quiero.

Por último pero no menos importante a una extraordinaria amiga **QFB. Erika Ramírez Urbina**, quien siempre ha estado al pendiente de mí a pesar de la distancia, por demostrarme ese gran cariño, confianza, experiencias compartidas, y por estar en los momentos importantes de mi vida, te quiero.

## INDICE

1. INTRODUCCIÓN	15
2. MARCO TEÓRICO	16
2.1. Descripción general de la oleoresina de paprika	16
2.1.2 Composición Nutricional.	17
2.1.3 Composición Química	18
2.1.4 Carotenoides	18
2.1.5 Estructura y Nomenclatura de carotenoides	19
2.1.6. Actividad antioxidante de los carotenoides y su efecto en la salud	20
2.1.7 Oleorresinas	22
2.3 Estabilidad	24
2.3.1 Estabilidad Oxidativa	24
2.4 Radicales Libres	25
2.4.1 Clasificación de los radicales libres	25
2.4.2 Mecanismo de acción de los radicales libres	26
2.5 Nanoencapsulación	27
2.5.1 Nanopartículas	28
2.5.2 Nanoemulsiones	29
2.5.3 Métodos de Nanoencapsulación	30
2.6 Microencapsulación	31
2.6.1 Secado por aspersión	32
2.7 Materiales de pared usados en Micro y Nano encapsulación.	33
2.7.1 Pectina	34
2.7.2 Concentrado de Proteína de suero	35
2.7.3 Maltodextrinas	36

2.8 Antecedentes	37
2.9 Situación actual	40
3. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	41
4. OBJETIVOS	41
4.1 Objetivo General:	41
4.2 Objetivos específicos:	41
5. HIPÓTESIS	42
6. METODOLOGÍA	43
6.1 Diagrama de Trabajo	43
6.2 Materia Prima	44
6.3 Evaluación de las propiedades físicacoquímicas de la oleorresina de paprika.	44
6.3.1 Color	44
6.4 Evaluación de las propiedades fisicoquímicas de oleorresina de Paprika	45
6.4.1 Determinación de Carotenos	45
6.4.2. Determinación de la actividad antioxidante total	45
6.4.4. Determinación del índice de Yodo	46
6.5 Proceso de encapsulación de oleorresina de paprika.	47
6.5.1 Preparación de la emulsión.	47
6.5.2 Determinación del tamaño de partícula e índice de polidispersión	47
6.5.3 Determinación de potencial zeta	48
6.5.4 Micro y nanoencapsulación mediante secado por aspersion.	48
6.6 Evaluación de las propiedades físicas de las micro y nanocápsulas.	48
6.6.1 Determinación de Humedad	48
6.6.2 Determinación de actividad de agua ( $a_w$ )	49

6.6.3 Determinación de solubilidad	49
6.6.4 Morfología microscópica.	49
6.6.5 Rendimiento de Carotenos.	50
6.7 Evaluación de las propiedades de flujo de las micro y nanocápsulas de oleorresina de paprika.	50
6.7.1 Densidad a granel	50
6.7.2 Densidad compacta	50
6.7.3 Compresibilidad	50
6.7.4 Índice de Haussner	51
6.7.5 Densidad de partícula	51
6.7.6 Ángulo de Reposo	51
6.8 Evaluación de las propiedades químicas de las micro y nanocápsulas.	52
6.8.1 Rompimiento de las cápsulas.	52
6.8.2 Carotenos totales, Índice de yodo y Actividad antioxidante total.	52
6.9.1 Almacenamiento	52
7.0 Análisis estadístico	52
7.1 Análisis de imagen	52
<b>8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>53</b>
8.1 Caracterización inicial de oleorresina de paprika	53
8.1.1 Propiedades fisicoquímicas de oleorresina de paprika	53
8.1.2 Propiedades fisicoquímicas de las emulsiones de oleorresina de paprika con diferentes biopolímeros.	56
8.2. Caracterización de las cápsulas	57
8.2.1 Propiedades fisicoquímicas de las microcápsulas de oleorresina de paprika con diferentes biopolímeros.	57

8.2.2 Propiedades de flujo de las microcápsulas de oleorresina de paprika con diferentes biopolímeros	62
8.3 Nanoencapsulación	65
8.3.1. Propiedades fisicoquímicas de la nanoemulsión de oleorresina de paprika con maltodextrina.	65
8.3.2 Propiedades fisicoquímicas las nanocápsulas de oleorresina de paprika con maltodextrina.	66
8.3.4 Propiedades de flujo de las nanocápsulas de oleorresina de paprika con maltodextrina.	69
9. Microestructura de las microcápsulas y nanocápsulas de oleorresina de paprika.	71
9.1 Análisis de Imagen	74
10. Almacenamiento	76
11. CONCLUSIONES	85
12. BIBLIOGRAFIA	88

## Índice de Tablas

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de oleorresina de paprika antes del secado.	55
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de las emulsiones de oleorresina de paprika.	57
Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de las cápsulas de oleorresina de paprika.	61
Tabla 4. Propiedades de flujo de las microcápsulas de oleorresina de paprika.	64
Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de la nanoemulsión	66
Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas de las nanocápsulas de oleorresina.	69
Tabla 7. Propiedades de flujo de las nanocápsulas de oleorresina de paprika.	71
Tabla 8. Análisis de Imagen de las microcápsulas y nanocápsulas.	75
Tabla 9. Evaluación de carotenos totales en las nanocápsulas y microcápsulas.	79

Tabla 10 Evaluación de la actividad antioxidante total en las nanocápsulas y microcápsulas	82
Tabla 11. Evaluación del índice de yodo en las nanocápsulas y microcápsulas.	84

### Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura química general de los carotenoides.	20
<b>Figura 2.</b> Estructuras químicas de los principales carotenoides.	14
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática del secador Nano y secador típico.	33
<b>Figura 4.</b> Representación del espacio cromático cilíndrico CIE L*C* h*.	54
<b>Figura 5.</b> Microestructura de las micro (a) y nano (b) cápsulas.	73

### Índice de Anexos

<b>Anexo 1</b> Morfología macroscópica de las microcápsulas.	103
<b>Anexo 2</b> Barrido de potencial zeta a diferentes pH.	104
<b>Anexo 3</b> Potenciales zeta y los números de ciclos del microfluidizador.	105
<b>Anexo 4</b> Nanocápsulas obtenidas mediante secado por aspersión.	106
<b>Anexo 5</b> Microestructura de las micro (a) y nanocápsulas (b).	107

## Lista de Abreviaturas

PEC	Pectina.
MD	Maltodextrina.
CPS	Concentrado de Proteína de Suero.
mL	Mililitros.
$a_w$	Actividad de agua.
mg/mL	Miligramos / Mililitro
$g/cm^3$	Gramos / Centímetro cubico.
RL	Radicales Libres
nm	Nanómetro
$\mu m$	Micra
HM	Alto Metoxilo
HL	Bajo Metoxilo
g	Gramos
DP	Grado de Polimerización
GA	Goma Arábica
SPI	Aislado de Proteína de Soya
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidracido
min	Minutos
N	Normal
T	Tiempo
mV	Milivolts
$\mu g/g$	Microgramo/ gramo
PDI	Índice de polidispersión
Mpa	Mega pascales
Bar	Unidad de presión
KHz	Kilohertz

## RESUMEN

La oleorresina de paprika es una matriz lipofílica obtenida del procesamiento de frutos de pimiento, está formado principalmente por antioxidantes y pigmentos carotenoides. La capacidad para colorear de estos pigmentos carotenoides hace que la oleorresina de paprika sea comúnmente utilizada como aditivo. La característica estructural de los pigmentos carotenoides es su cadena poliénica, la cual también permite que los carotenoides se degraden por procesos de oxidación. Por ello se han desarrollado diferentes tecnologías que permiten su protección, y las más utilizadas son la microencapsulación y nanoencapsulación, las cuales han resultado ser uno de los métodos de protección más eficaces. Sin embargo, no existen estudios donde evalúen las diferencias entre ellas. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar las diferencias en las propiedades fisicoquímicas y la estabilidad en las micro y nanocápsulas de oleorresina de paprika. La metodología realizada fue: la microencapsulación con 3 diferentes biopolímeros maltodextrina DE 10 (MD) concentrado de proteína de suero (CPS) y pectina de bajo metoxilo (PEC), para la cual se elaboraron emulsiones y se caracterizaron, una vez obtenidas las microcápsulas se evaluaron en ellas: color, humedad, actividad de agua, índice de yodo, carotenos totales, rendimiento de carotenos, actividad antioxidante total y propiedades de flujo. Teniendo como resultados, que las propiedades evaluadas en cada biopolímero fueron diferentes en las microcápsulas. MD fue quien brindó mayor protección y mejor rendimiento a los carotenos presentes con 41.21%, en comparación de CPS con 31.48% y PEC con 33.37%. Es por ello que MD fue el biopolímero seleccionado para la nanoencapsulación, una vez obtenidas las nanocápsulas, se caracterizaron y compararon las propiedades antes mencionadas. Obteniéndose que después del secado las nanocápsulas brindaron mayor protección con un rendimiento de 63.46% a los compuestos antioxidantes en relación a las microcápsulas. Después del almacenamiento realizado en 30 días a 3 temperaturas (25 °C, 35 °C y 45 °C) y 3 actividades de agua (0.318, 0.515 y 0.743), los resultados indicaron que la nanoencapsulación evitó en un 23.38% más la degradación de compuestos, siendo esta la mejor alternativa de protección en comparación con la microencapsulación.

## SUMMARY

Paprika oleoresin is a lipophilic matrix obtained by pepper fruits processing, it is mainly formed by antioxidants and carotenoid pigments. The coloring capacity of these carotenoid pigments makes paprika oleoresin to be commonly used in the as additive. The structural characteristic of all carotenoid pigments is its polyenoic chain, which also allows carotenoids are degraded by oxidation processes. Therefore different technologies that enable its protection have been developed, and the most used are the microencapsulation and nanoencapsulation, which proved to be one on the of the most effective methods of protection. However, there are no studies that evaluate the differences between them. Therefore, the objective of this study was to evaluate the differences in physicochemical properties and stability in micro and nanocapsules oleoresin paprika. The methodology was made: microencapsulation with 3 different biopolymers maltodextrin DE 10 (MD) whey protein concentrated (CPS) and low methoxyl pectin (PEC), for which emulsions were prepared and characterized, after obtaining the microcapsules they evaluated in them: color, moisture, water activity, iodine, total carotenoids, carotenes performance, total antioxidant activity and flow properties. As results that the properties evaluated in each biopolymer were different in the microcapsules. MD was the one who gave more protection and better performance to carotenes present with 41.21% compared with 31.48% CPS and PEC with 33.37%. Is by this that MD was selected for the biopolymer nanoencapsulation, once the nanocapsules obtained were characterized and compared the above properties. Obtained after drying which provided greater protection nanocapsules with a yield of 63.46% to antioxidant compounds in relation to the microcapsules. After storage performed in 30 days at 3 temperatures (25 ° C, 35 ° C and 45 ° C) and three water activities (0.318, 0.515 and 0.743), the results indicated that the nanoencapsulation avoided in a 23.38% increase degradation compounds, being the best alternative protection compared to microencapsulation.

## 1. INTRODUCCIÓN

La oleorresina de paprika es un colorante natural utilizado por la industria de los alimentos para proveer o reforzar el color en los productos alimenticios, esta propiedad es debido al perfil de carotenoides el cual aumenta su valor antioxidante original y proporciona el valor de provitamina A. La composición de carotenoides en la oleorresina de paprika corresponde a la que se encuentra en materias primas y frutos maduros como pimiento rojo (*Capsicum annuum L.*), se han reportado valores entre 500 y 2000 unidades equivalentes de retinol en la oleorresina lo que puede ser considerado como cifras altas en comparación con otras fuentes de provitamina A como los aceites vegetales, aceite crudo de maíz amarillo, olivo y palma. Por lo tanto, este producto debe ser considerado como un aditivo alimenticio para fortificación de alimentos y bebidas. Sin embargo, dichos compuestos pueden ser degradados debido a diversos factores, provocando con esto la disminución o inhibición de su actividad biológica. Para ello se han desarrollado diversas técnicas de protección como la encapsulación, y uno de los métodos más utilizados por la industria alimentaria es el secado por aspersion debido a su alto rendimiento y eficacia, este método consiste en utilizar biopolímeros, (proteínas, carbohidratos, celulosas, gomas.), como matriz encapsulante con la finalidad de brindar protección a los compuestos bioactivos. Por otra parte, estudios recientes en nanotecnología han demostrado que dichos compuestos están mayormente protegidos cuando se utilizan materiales con un tamaño menor a 100 nm (escala nanométrica) en comparación con materiales de mayor tamaño que dicha escala. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el uso de estos métodos en la encapsulación de oleorresina de paprika y así proponer el que confiera mejor protección y conserve los compuestos carotenoides.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Descripción general de la oleorresina de paprika

La oleorresina de paprika es una matriz lipofílica obtenida del procesamiento de frutos de pimiento, está formado principalmente por glicéridos, polifenoles liposolubles, antioxidantes y pigmentos carotenoides. La capacidad para colorear de estos pigmentos carotenoides hacen que la oleorresina de pimiento sea comúnmente utilizado en la industria alimentaria como aditivo. Según Mínguez *et al* (1992) los pigmentos carotenoides del pimiento pueden dividirse en dos fracciones isocromáticas: rojo (diesterificado de capsantina y capsorrubina) y amarillo ( $\beta$ -caroteno, esterificado de criptoxantina y diesterificado de zeaxantina). La característica estructural de los pigmentos carotenoides es su cadena poliénica, la cual es la responsable de sus propiedades físicas y químicas, este grupo provee compuestos naturales con coloración, actividad antioxidante y funciones biológicas (Britton, 1995); sin embargo, esta cadena de dobles enlaces conjugados también permite que los carotenoides se degraden por procesos de oxidación originadas por especies reactivas (radicales libres que suelen ser generados durante la peroxidación lipídica) que se agregan a la cadena poliénica (Pérez y Mínguez, 2001).

La calidad comercial de oleorresina de paprika depende de una alta concentración de carotenoides, las proporciones correctas entre fracciones isocromáticas de estos pigmentos y una suficiente estabilidad garantiza las características cromáticas iniciales a lo largo de su vida útil (Jarén y Mínguez, 1999). En la industria, el lote del pigmento concentrado no se utiliza inmediatamente o totalmente. Es empleado normalmente en un proceso de producción, siendo gradualmente retirado de almacenamiento hasta que se consume. Por lo tanto, la oleorresina puede estar en uso durante mucho tiempo después de la fecha en la cual se preparó (Jarén y Mínguez, 1999).

### **2.1.2 Composición Nutricional.**

Los frutos maduros de especia o vegetal rojo de pimiento son una buena fuente importante de nutrientes fitoquímicos, como carotenoides, tocoferoles, vitamina C y polifenoles (Daood *et al.*, 2009; Delgado *et al.*, 2003). Una adecuada ingesta diaria de carotenoides y otros antioxidantes de frutas y verduras se ha recomendado para mantener una salud óptima; además, datos de estudios epidemiológicos consistentemente mostraron correlación entre la ingesta de frutas y verduras y la incidencia de varias enfermedades como cardiovasculares, oftalmológicas, gastrointestinales o trastorno neurodegenerativo y algún tipo de cáncer (Russel, 2006; VAN Duyn y Pivonka, 2000). El consumo de productos del pimiento rojo se ha divulgado por tener interesantes efectos biológicos. La actividad quimiopreventiva del cáncer de los carotenoides en los frutos de pimiento rojo *Capsicum annuum L.* se ha confirmado por Maoka *et al.*, (2001), quien evaluó la actividad antitumoral del pimiento rojo en ratones con cáncer de piel.

El color rojo atractivo de pimientos rojos es debido a una composición diversa de carotenoides de color amarillo y de color rojo, que se producen de la esterificación con ácidos grasos en forma de mono y diésteres (Biacs *et al.*, 1993; Hornero y Mínguez, 2000). Desde el punto de vista tecnológico el contenido y composición de carotenoides, así como la presencia de otros compuestos antioxidantes en pimientos rojos pueden afectar, en gran medida, la intensidad del color y estabilidad del producto (Biacs *et al.*, 1992; Daood, *et al.*, 2006).

### 2.1.3 Composición Química

Si bien la composición química cuantitativa de la oleorresina de paprika puede variar de acuerdo a la calidad, cualitativamente siempre responde a los siguientes componentes (Giménez *et al.*, 1983; Geister, 1983):

**Pigmentos carotenoides:** Dentro de este grupo de sustancias, que constituyen casi exclusivamente el criterio de calidad de la oleorresina, se puede establecer la siguiente división:

**Carotenos:** En este grupo encontramos el  $\beta$ -caroteno, colorante provitamínico que, en el organismo animal proporciona la vitamina A, y que se encuentra en un nivel del 8 al 23% del total de pigmentos.

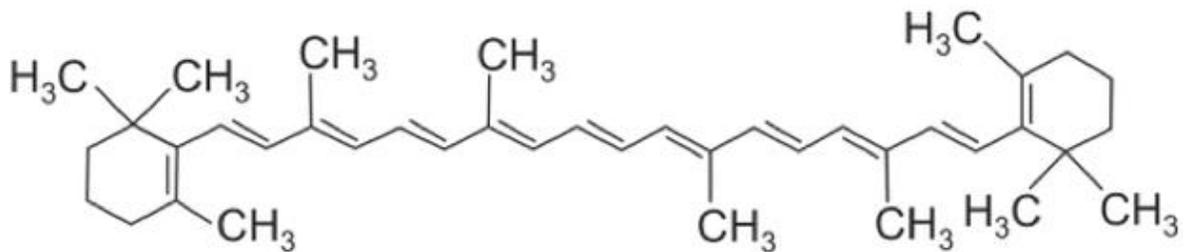
**Xantófilas:** Podemos subdividirlos en dos grupos: Rojas: capsantina (52- 60% del total de pigmentos), capsorrubina (10-18%); Amarillas: criptoxantina (3-5%), zeaxantina (8-10%), luteina y violaxantina, estas dos últimas en menores cantidades.

### 2.1.4 Carotenoides

Los carotenoides son un grupo de compuestos solubles en lípidos. Consisten en 8 unidades de isopreno con una serie de dobles enlaces conjugados que constituyen el grupo cromóforo característico; las unidades de isopreno están unidas de tal manera que los dos grupos metilo sustituyentes más cercanos en el centro de la molécula están en las posiciones 1,6, mientras que los otros grupos están en las posiciones 1,5 (Lock, 1997).

Están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, cumpliendo dos funciones principales: en la fotosíntesis y como materia colorante en las flores y frutos, en lo que aparecen mayormente como colorantes amarillos en los primeros, y naranja o rojizo en los segundos; los animales no lo biosintetizan pero pueden encontrarse presentes por ser ingeridos en la dieta en algunos peces, aves y organismos marinos invertebrados. Se conocen alrededor de 200 carotenoides de ocurrencia natural,

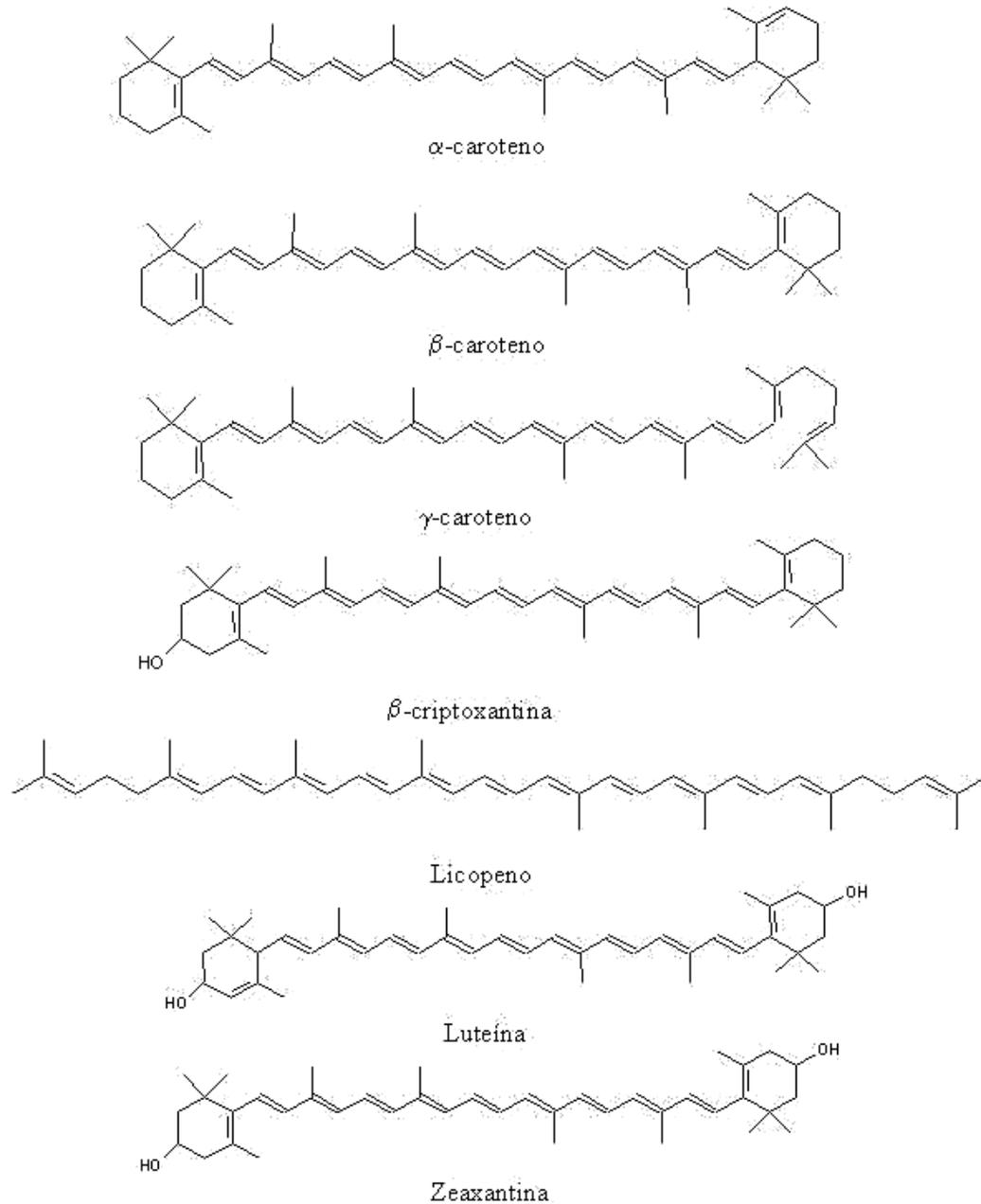
siendo aún muy pequeño el número utilizado industrialmente, por otro lado nuevas estructuras se reportan continuamente (Britton. 1991).



**Figura 1.** Estructura química general de los carotenoides. Tomada y modificada de patentados.com

### 2.1.5 Estructura y Nomenclatura de carotenoides

La estructura base de los carotenoides es el licopeno, consisten en una cadena larga de 8 unidades de isopreno ( $C_{40}$ ) dando un sistema conjugado de dobles enlaces el cual es el grupo cromóforo responsable del color. La ciclación del licopeno en un extremo conduce al  $\gamma$ - caroteno, mientras que la ciclación en ambos extremos produce el  $\beta$ -caroteno ( $\alpha$  y  $\epsilon$ -caroteno) solo difieren en la posición de los dobles enlaces en la unidades cíclicas terminales. Para sistematizar la nomenclatura se utilizan letras griegas, que describen a los dos grupos terminales de la cadena base insaturada. Dentro de los principales pigmentos carotenoides también se encuentran la zeaxantina y la luteína las cuales contienen en su estructura química una función oxigenada (xantófilas). (Figura 2) (Commission on Biochemical Nomenclature, 1971).



**Figura 2.** Estructuras químicas de los principales Carotenoides. Tomada de Meléndez *et al.*, 2004.

### 2.1.6. Actividad antioxidante de los carotenoides y su efecto en la salud

Las funciones y acciones de los carotenoides están determinadas por las propiedades físicas y químicas de las moléculas. Primero, la geometría integral molecular (tamaño, tipo y presencia de grupos funcionales) es vital para asegurar

que el carotenoide es afín con las estructuras celulares y subcelulares en la localización y orientación correcta que permite una eficiente función. Segundo, el sistema de dobles enlaces conjugados determina la reactividad química que forma la base de estas funciones. Además, las interacciones específicas con otras moléculas en la vecindad inmediata son cruciales para el funcionamiento correcto de estos compuestos. (Young y Lowe, 2001; Brintton, 1995).

Los carotenos son transportados en el organismo por el plasma, por lo que se ha considerado que algunos de ellos ( $\alpha$ - o  $\beta$ -caroteno) podrían servir como biomarcadores para determinar la ingesta de vegetales y frutas y clarificar la relación dieta-enfermedad. Es el  $\beta$ -caroteno quien ha mostrado tener la mayor correlación con la ingesta (Britton, 1991; Drewnowski, 1997). El mecanismo de acción de los carotenoides en la salud humana no se ha definido claramente. Una posible hipótesis es que los carotenoides, incluyendo pero no limitándose al  $\beta$ -caroteno, sirven como un supresor de superóxido  $O_2^- \cdot$  (forma altamente reactiva) y como antioxidante en la prevención del daño de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERON) a compuestos celulares críticos. Los carotenoides no actúan solos en este proceso ya que existe otro grupo de componentes dietarios y endógenos que también funcionan como antioxidantes. Debido a que los mecanismos que implican los efectos en la salud humana de estos agentes o sus combinaciones no están bien definidos, la presunción de que están actuando solamente como antioxidantes *in vivo* limita, más que expandir, el horizonte conceptual. Un mejor término para cualquier efecto benéfico o adverso, que se puede establecer a partir de los estudios epidemiológicos es como “modulador fisiológico” (Campbell. 1996., Yeum *et al.*, 1995).

Los carotenoides tienen la capacidad de inactivar algunas especies de moléculas en estado de excitación electrónica principalmente las debidas a reacciones fotosensibles. Como se sabe, la luz puede convertir moléculas a una forma electrónicamente excitada de vida corta, pero que pueden interactuar con otras de su misma especie para formar una molécula estable. Esta última es la que puede reaccionar con una gran variedad de moléculas para iniciar las reacciones

fotoquímicas (Rodríguez, 1999). En algunas circunstancias se pueden iniciar dos tipos de reacciones: 1) reaccionar con varias moléculas y generar ERON que pueden dar lugar a reacciones diversas y dañar a las células; y 2) reaccionar directamente con el oxígeno y formar una molécula de oxígeno singulete. Esta molécula es extremadamente reactiva capaz de iniciar la peroxidación de lípidos al reaccionar con ácidos grasos saturados, de inactivar proteínas y enzimas al reaccionar con aminoácidos como metionina, histidina, triptófano o tirosina o bien de oxidar residuos de guanina en el ADN o ARN. Se ha demostrado que los carotenoides son muy efectivos para la inactivación de ( $^1\text{O}_2$ ); de esta manera éstos pueden atrapar catalíticamente el ( $^1\text{O}_2$ ) y evitar el daño fotooxidativo iniciado por esta molécula reactiva (Sánchez *et al.*, 1999., Young y Lowe, 2001).

### **2.1.7 Oleorresinas**

Las oleorresinas se obtienen de especias como pimienta, clavo, cúrcuma, etc., y también de otras plantas, por medio de una extracción con disolventes orgánicos como hexano, acetona, éter o diclorometano, que después se eliminan por destilación; el producto resultante es un líquido viscoso y coloreado que contiene una mezcla de los compuestos volátiles y no volátiles de la materia prima, aun cuando no se extraen todos los responsables del aroma (Badui, 1993).

En su obtención se pueden acarrear algunas sustancias indeseables que dependen de la polaridad del disolvente y del contenido de la humedad de la materia prima; las contaminaciones más importantes se deben a la presencia de taninos, azúcares, almidones, resinas y pigmentos, que se eliminan por medio de algunos tratamientos de solubilización, filtración o centrifugación; el paso que requiere de más precaución es la concentración, ya que sus constituyentes son muy sensibles a las altas temperaturas y se destruyen con facilidad (Badui, 1993).

El proceso de obtención de la oleorresina de la paprika considerado como el más adecuado en la actualidad se describe a continuación. Este proceso además de la eliminación de semillas y pedúnculos comprende las siguientes operaciones

(Salmerón y Romojaro, 1975): 1. Secado y molienda 2. Extracción 3. Filtración y concentración de la miscela 4. Depuración 5. Eliminación del solvente residual.

#### 1. Secado y molienda

Los frutos del *Capsicum annuum* pueden tener un contenido de humedad entre 65 y 80% dependiendo del momento en que son cosechados. Para obtener la paprika, esta humedad debe ser reducida a valores entre 3 y 14% (Purseglove *et al.*, 1981). El contenido de humedad con que los frutos van a entrar a la molienda es importante pues se ha observado que durante ésta se alcanzan temperaturas bastantes altas que pueden causar la pérdida de color y aroma en los frutos secos (Geister, 1989). Un tamaño óptimo de partícula es aquel que permita una veloz penetración del solvente en toda la partícula con una rápida transferencia del soluto y que permita alcanzar el equilibrio rápidamente (Govindarajan, 1986).

#### 2. Extracción

La extracción de la oleorresina por medio de solventes es el método más utilizado por las plantas que trabajan estos productos. La literatura recomienda que el mejor método de extracción es la inmersión agitada. (Govindarajan, 1986; Salmerón y Romojaro, 1975; Bernardini, 1981). Al parecer en la percolación la gran cantidad de retención estática del líquido hace imposible la obtención de cantidades importantes de soluto (Bernardini, 1981).

#### 3. Filtración y concentración de la miscela

La miscela se somete a filtrado (normalmente se usan filtros prensa) con el objeto de eliminar los sólidos sobrenadantes que la acompañan, para proceder a su concentración. La concentración se realiza en evaporadores al vacío a temperaturas no mayores de 40°C (Salmerón y Romojaro, 1975).

#### 4. Depuración

La depuración tiene por objeto eliminar de la oleorresina bruta las impurezas extraídas, constituidas por lecitinas, fosfátidos, mucílagos y proteínas, que de no ser

separadas precipitarán posteriormente en forma de "lodos" (Salmerón y Romojaro, 1975).

#### 5. Eliminación del disolvente residual

Se efectúa por concentración bajo vacío. La cantidad de solvente residual permitido en la oleoresina está normada por la FDA y generalmente no es más de 30 ppm (Salmerón y Romojaro, 1975).

### 2.3 Estabilidad

#### 2.3.1 Estabilidad Oxidativa

La estabilidad oxidativa es un indicador importante en el desempeño y la vida de anaquel de la grasa. Depende de la composición de la muestra y de las condiciones a las que está sujeta (Lee *et al.*, 2004).

La exposición al aire libre, a altas temperaturas, a la luz, a trazas de metales (hierro y cobre) y a la humedad refuerzan la oxidación (Lee *et al.*, 2004). Igualmente, la composición de la grasa: contenido de ácidos grasos insaturados, número y posición de los dobles enlaces, tipo de isomería (*cis* y *trans*) (Nieblas *et al.*, 2001, Rudnik *et al.*, 2001, Lee *et al.*, 2004, Aardt. *et al.*, 2004) y el contenido de antioxidantes influyen en el proceso de oxidación.

La estabilidad oxidativa, se define como la resistencia a la oxidación bajo condiciones establecidas (Velasco *et al.*, 2004) y se expresa como el periodo de tiempo necesario para alcanzar un punto final, el cual es seleccionado conforme a diferentes criterios (por ejemplo, desarrollo de la rancidez), pero usualmente corresponde a un inesperado incremento en la reacción de oxidación (Velasco *et al.*, 2004). Como la oxidación normalmente procede lentamente hasta que este punto se alcance, este periodo de tiempo es conocido como periodo de inducción. El periodo de inducción se determina, midiendo un parámetro físico o químico en relación con el tiempo a través de un calentamiento de la muestra a temperatura constante. Dicho parámetro relaciona el grado de oxidación de la misma y puede

usarse para evaluar, el momento en cual la grasa llega a un nivel de oxidación inadecuado para el consumo humano (Gonzaga y Celio, 2006).

La oxidación de ingredientes alimenticios microencapsulados, almacenados y procesados puede llevar a la rancidez que causa un efecto de deterioro del producto (Velasco *et al.*, 2004). La mayoría de los estudios acerca de ingredientes alimenticios microencapsulados se han enfocado a analizar las condiciones de secado con respecto a la eficiencia de encapsulamiento, tamaño de partícula y características microestructurales de las microcápsulas. Sin embargo, existen pocos estudios referentes a examinar el grado de oxidación de sistemas microencapsulantes bajo distintas condiciones de almacenamiento. Existen métodos analíticos basados en mediciones de peróxidos, hidroperóxidos y dienos conjugados, que proporcionan información acerca del verdadero estado oxidativo de los saborizantes (Ulkowski *et al.*, 2005).

## **2.4 Radicales Libres**

Los radicales libres (RL) son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre, por lo que son muy reactivos, ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por lo que se queda con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena que origina daño a diversos niveles (Avello y Suwalsky, 2006).

### **2.4.1 Clasificación de los radicales libres**

Existen diversas clasificaciones para los radicales libres de acuerdo con su forma de actuar o su origen. Venereo (2002) propone lo siguiente:

- a) *Radicales libres inorgánicos o primarios*. Se originan por transferencia de electrones sobre el átomo de oxígeno, representan por tanto distintos estados

en la reducción de este, y se caracteriza por tener una vida media muy corta; estos son el anión superóxido, el radical hidróxilo y el óxido nítrico.

- b) *Radicales libres orgánicos o secundarios.* Se pueden originar por la transferencia de un electrón de un radical primario a un átomo de una molécula orgánica o por la reacción de dos radicales primarios entre sí, poseen una vida media un tanto más larga que los primarios; los principales átomos de las biomoléculas que pueden generar radicales libres secundarios son: carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre.
- c) *Intermediarios estables relacionados con los radicales libres del oxígeno.* Aquí se incluye un grupo de especies químicas que sin ser radicales libres, son generadoras de estas sustancias o resultan de la reducción o metabolismo de ellas, entre las que están el oxígeno singulete, el peróxido de hidrógeno, el ácido hipocloroso, el peroxinitrito y algunos hidroperóxidos orgánicos.

#### **2.4.2 Mecanismo de acción de los radicales libres**

Debido a las diferencias que existen entre los radicales libres (RL) cada uno de estos tiene diferentes mecanismos de acción. Normalmente los RL no son más que metabolitos fisiológicos, pero en ciertas condiciones o estados propios de la actividad del hombre en relación con su medio, la producción de estos compuestos puede incrementarse en forma considerable, rompiéndose entonces el equilibrio que debe existir entre estos y sus rivales o contrapartes, los antioxidantes corporales (Lima, 2001).

Pueden actuar de dos formas: acoplándose a moléculas para compartir el electrón desapareado, con el cual se forma un complejo que altera las características de la molécula atacada, o cediendo el electrón desapareado, con lo cual se forma un nuevo radical libre. Tiene lugar una reacción en cadena que finaliza cuando el radical es finalmente compartido formándose un complejo (Hispan, 2004).

En la célula existen diferentes blancos que son susceptibles al ataque mediado por los radicales libres, sus principales objetivos son: las membranas celulares, ADN y ARN, organelos y lipoproteínas. En la membrana celular atacan lo

dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados que los constituyen llevándose a cabo una oxidación (peroxidación lipídica), produciendo que la membrana deje de tener su permeabilidad selectiva (Venereo, 2002).

En el ADN y ARN los radicales libres provocan desarreglos y modificaciones en los programas celulares de los cromosomas; se ve afectado por tanto la organización celular e intercelular, generando lesiones que pueden tener consecuencias diversas como: muerte celular por apoptosis, o mutación que conduzca a un proceso neoplásico. Los organelos y lipoproteínas se dañan directamente desencadenando una respuesta inflamatoria oxidativa, alterando su función específica, también se activan las enzimas ciclooxigenasa y lipooxigenasa que participan en la respuesta inflamatoria mediada por las prostaglandinas (Hispan, 2004).

## **2.5 Nanoencapsulación**

La Nanotecnología se define como la creación, utilización y manipulación de materiales, aparatos o instalaciones en la escala nanométrica (menor que 100 nm). La nanoencapsulación es un proceso que involucra agentes bioactivos encerrados dentro de materiales del portador con una dimensión de escala nanométrica. Mayores demandas para producción de alimentos funcionales con mayor valor nutricional, dosis más baja de preservativos sintéticos y mejores características organolépticas conducen a innumerables aplicaciones de nanoencapsulación en procesamiento de alimentos. Por ejemplo se ha utilizado esta tecnología para mejorar la estabilidad de compuestos sensibles durante la producción, el almacenamiento y la ingestión de vitaminas (Saiz *et al.*, 2013, Khayata *et al.*, 2012;), disminuir la evaporación y la degradación de compuestos bioactivos volátiles (Donsí *et al.*, 2011) o limitar la exposición al oxígeno, agua o luz, por ejemplo los ácidos grasos insaturados (Nedovic *et al.*, 2011).

El material encapsulado portador debe ser grado alimenticio, biodegradable y estable en los sistemas alimentarios durante el procesamiento, almacenamiento y consumo. Los más convenientes portadores nano escala de materiales para

aplicaciones alimenticias son carbohidratos, base de proteínas o lípidos. Los carbohidratos, son sistemas de entrega basados en polisacárido conveniente para muchos usos de la industria ya que son biocompatibles, biodegradables y poseen un alto potencial modificable para lograr las propiedades necesarias. Por el contrario los portadores de lípidos basados en sistemas de carbohidratos, puede interactuar con una amplia gama de compuestos bioactivos a través de sus grupos funcionales, que los hace portadores versátiles para enlazar y atrapar una variedad de ingredientes bioactivos hidrofílicos e hidrofóbicos. Por otro lado, estos sistemas se consideran como una cáscara adecuada bajo temperaturas altas de procesos debido a su estabilidad de temperatura en comparación a sistemas basados en lípidos o proteínas que podrían ser derretido o desnaturalizado.

### **2.5.1 Nanopartículas**

Las nanopartículas son comúnmente descritas como partículas coloidales, que varían en tamaño desde 10 nm a 1  $\mu$ m (Singh y Lillard, 2009, Anton *et al.*, 2008). Las nanopartículas utilizadas para la liberación de fármacos están diseñadas en ensamblados macromoleculares o moleculares, en la cual los principios activos tales como fármacos son disueltos, atrapados, encapsulados, incluso adsorbidos o conectados a la interfaz externa. Las nanopartículas pueden categorizarse en dos grupos principales basados en su morfología: nanoesferas, presentando una estructura matricial homogénea, en la cual los metabolitos son uniformemente dispersos (Vauthier, 2009) y nanocápsulas, mostrando una estructura típica de core-shell. La formulación de nanopartículas implica ciertos desafíos: tamaño de control y distribución, morfología, la meta terapéutica del principio activo, biocompatibilidad del polímero y la compatibilidad de las propiedades fisicoquímicas del fármaco.

Los métodos utilizados para producir nanopartículas pueden dividirse en tres grupos principales (Anton *et al.*, 2008, Richard y Benoit, 2000): (I) métodos fisicoquímicos por ejemplo la creación de nanopartículas usando polímeros preformados e induciendo su precipitación por evaporación del disolvente-

emulsificación, difusión o difusión inversa (II) métodos *in situ* de síntesis química de macromoléculas, dando lugar a reacciones de policondensación o polimerización interfacial (Vauthier y Bouchemal, 2009) (III) métodos mecánicos como por ejemplo, el uso de dispositivos de alta energía como Homogeneizadores de alta presión, alta energía o sonicadores (Singh y Lillard, 2009, Anton *et al.*, 2008). El interés relativo del uso de nanopartículas en sistemas de micropartículas para aplicaciones farmacéuticas es potencial para aumentar la velocidad de absorción, en lugar de mejorar la biodisponibilidad, para el tratamiento del cáncer y sistemas de administración intravenosos y así sucesivamente (Singh y Lillard, 2009). Con el desarrollo de compuestos activos, la encapsulación por emulsión ha sido utilizada en el desarrollo de productos farmacéuticos, la preparación de alimentos funcionales y cosméticos. El polvo generado es un sistema de matriz en forma de micropartículas es decir, microsferas (Richard y Benoit, 2000), exhibiendo una morfología esférica o ahuecada dependiendo de la naturaleza utilizada en el material de pared y el secado en condiciones de operación como la temperatura de entrada, concentración de sólidos, gas caudal o tasa de alimentación.

### **2.5.2 Nanoemulsiones**

En la actualidad, las nanopartículas se han utilizado en un amplio número de aplicaciones, por ejemplo, como portadores de la fármacos, biosensores y en el campo de la nanoelectrónica (Jiang, 2012, Qureshi *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2010). Debido a su tamaño submicrónico, las nanopartículas poseen una alta relación superficie a volumen, dispersabilidad mejorada y adaptabilidad para las funciones múltiples (Singh y Lillard, 2009). Materiales naturales y sintéticos han sido investigados para la fabricación de nanopartículas con características diferentes. Varios biopolímeros naturales como quitosano, alginato, pectina, ácido poliláctico, goma laca, gelatina, almidón y dextrina han recibido atención creciente como nano-carreadores para diversas aplicaciones.

Se han utilizado diversas técnicas para la producción de nanopartículas, por ejemplo la técnica del Cross-linking de emulsión (agua-en-aceite) proporciona amplias capacidades para las variaciones en la estructura que consiste en la dispersión de una fase acuosa en una fase de aceite, en presencia de un agente tensioactivo eficaz para producir gotitas de nanoescala o nanoemulsiones (Burapapadh *et al.*, 2012). Las gotitas de las nanoemulsiones pueden mantener la forma y el tamaño de las partículas dentro de la fase dispersa generando partículas de almidón a través de una reacción del Cross-linking (Ethirajan *et al.*, 2008). Puesto que la nanoemulsión es un sistema de no equilibrio, la energía utilizada en dispositivos mecánicos o potenciales químicos es necesaria (Antonietti y Landfester, 2002).

La emulsificación de alta energía requiere energía mecánica generada por centrifugas, equipos tales como generador de ultrasonido u homogeneizador de alta presión para producir gotitas finas (Lin y Chen, 2006; Burapapadh *et al.*, 2012). La energía proporciona la fuerza necesaria que es capaz de deformar y romper a las gotas en partículas más pequeñas, siempre y cuando se supera la presión de Laplace. Dicha presión, define la relación de presiones necesaria para obtener un balance neutral, positivo o negativo entre dos espacios. Es decir, la presión en el interior de un espacio de paredes elásticas (esférico, cilíndrico, etc.) y la tensión que soportan dichas paredes así como el radio de curvatura. La adsorción del surfactante en la interfaz de caída reduce la presión de Laplace (Solans *et al.*, 2003), sin embargo, entra más pequeña sea el tamaño de la gota, mayor será la energía requerida para más caída de quiebre (Shi *et al.*, 2011).

### **2.5.3 Métodos de Nanoencapsulación**

Una amplia gama de diferentes métodos han sido utilizados en la literatura para el montaje de hidratos de carbono basado en nanocápsulas (Jones y McClements., 2010). Algunas de las técnicas más ampliamente utilizadas para encapsular alimentos bioactivos son:

- Secado por aspersión.
- Coacervación.
- Electrospinning y electrospray.
- Fluido supercrítico (SCF).
- Método de Emulsión-difusión (EDM).
- Precipitación de emulsiones presurizadas o hidrogeles.

## 2.6 Microencapsulación

La microencapsulación es una tecnología aplicada a preservar y/o proteger numerosos ingredientes. Este proceso consiste en envolver cierto ingrediente en una cubierta o cápsula. El encubrimiento de partículas pequeñas es denominado microencapsulación y de materiales de mayor tamaño macroencubrimiento.

De esta forma la microencapsulación es un proceso físico definido como la tecnología de empacamiento de materiales en miniatura, sólidos, líquidos o gaseosos en cápsulas selladas, capaces de desprender su contenido bajo condiciones controladas. En el encapsulado la porción activa es denominada núcleo, fase interna o relleno, el material encapsulante es llamado cobertura o cápsula (Dziezak, 1988).

El tamaño de la microcápsulas es de 1  $\mu\text{m}$  a 1000  $\mu\text{m}$ ; su forma se presenta esférica, ovoide, irregular, monolítica, agregados, paredes simples o múltiples.

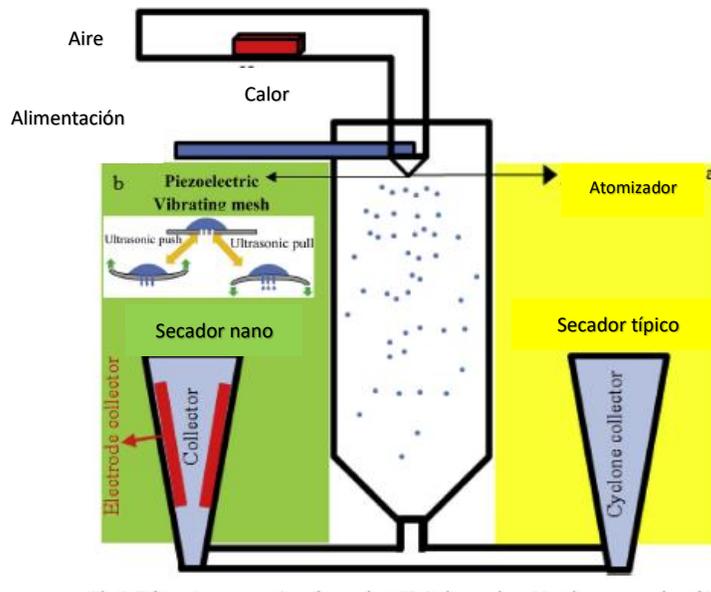
Diversos métodos han sido propuestos para la producción de microcápsulas. En general, estos métodos pueden ser divididos en tres grupos (Ré, 1998):

- *Procesos físicos*: secado por aspersión, extrusión, recubrimiento en lecho fluidizado, cocrystalización y liofilización.
- *Procesos químicos*: polimerización interfacial e inclusión molecular.
- *Procesos fisicoquímicos*: coacervación simple o compleja, atrapamiento en liposomas y separación de fase orgánica.

La selección del proceso de encapsulación considera el tamaño medio de la partícula requerida y las propiedades fisicoquímicas del agente encapsulante y la sustancia a encapsular, las aplicaciones para el material microencapsulado, el mecanismo de liberación y el costo.

### **2.6.1 Secado por aspersión**

Una de las tecnologías más comúnmente aplicadas para encapsulación es el secado por aspersión. Es rápido, relativamente barato, y reproducible (Yeo *et al.*, 2001). El principio de esta técnica se basa en disolver o dispersar el ingrediente activo en la solución de biopolímeros. La dispersión luego se atomiza en una cámara de aire caliente (Figura. 2), que elimina el disolvente y produce una partícula seca rápidamente, consiste en el ingrediente activo incrustado en un material de la pared poroso. Este método tiene algunas limitaciones para volátiles o bioactivos termo sensibles. Puesto que en los sistemas de alimentos se utilizan dispersiones normalmente a base de agua, es un obstáculo para un compuesto soluble con bajo nivel de agua de (ej. quitosano y celulosa). Un proceso de secado por aspersión típico consta de cuatro pasos que incluyen la atomización de la corriente del líquido, vaporización y secado de la corriente del líquido a través del secado con gas, formación de partículas y posteriormente separación de partículas y colección. Las ventajas recientes en el secado por aspersión condujeron a desarrollar nuevas tecnologías tales como el Nano Spray Dryer. La característica única de esta tecnología es la generación de gotas a través de un actuador piezoeléctrico conducido que funciona a una frecuencia ultrasónica específica y así crear una niebla de gotas con el tamaño de las partículas ultra finas. Las partículas secas están cargadas electrostáticamente y son recogidas en el recolector de la superficie del electrodo con mermas de mini partículas y la formulación de altos rendimientos. Sin embargo la nanoencapsulación requiere que la preparación de la muestra antes de secar contenga nanopartículas, generalmente para alcanzar este tamaño de partícula se realizan nanoemulsiones que son requisito previo antes de secar.



**Figura. 1** Representación esquemática del secador Nano (a) y secador típico (b).

## 2.7 Materiales de pared usados en Micro y Nano encapsulación.

Las microcápsulas consisten usualmente en una cobertura polimérica conocida como material de pared y el producto activo localizado dentro del material de pared. Dicha cobertura sirve como una membrana para la sustancia encapsulada. Un agente ideal como material de pared debe tener las siguientes propiedades (Shahidi y Han, 1993):

- Capacidad para dispersar o emulsificar el material activo.
- Buenas propiedades reológicas a altas concentraciones y fácil manipulación durante el proceso de encapsulación.
- Capacidad para no reaccionar, sellar y sostener el material activo durante el almacenamiento o procesamiento.
- Capacidad para proveer máxima protección al material activo contra las condiciones ambientales.
- Debe de ser grado alimenticio y económico.

Existe una amplia variedad de materiales para cobertura que pueden ser usados para encapsular ingredientes alimentarios, donde se incluyen aceites hidrogenados, ceras, maltodextrinas, almidones y gomas (Shahidi y Han, 1993).

### **2.7.1 Pectina**

La pectina es un polisacárido aniónico lineal, que se encuentra principalmente conectado por enlaces  $\alpha$ -D-(1,4) de ácido galacturónico. Es resistente a la digestión enzimática en la boca y el estómago, pero es degradado por la microflora del colon, que lo hace adecuado para la entrega del ácido sensible a alimentos bioactivos (Sinha y Kumria, 2001). Este biopolímero generalmente se clasifica según su grado de esterificación: pectina de bajo metoxilo (LM) tiene 25-50% de metoxilación; pectinas de alto metoxilo (HM) cuenta con un 50-80% de metoxilación. LM puede formar geles en presencia de iones calcio divalente, Considerando que la HM puede formar geles en condiciones ácidas en contenido alto de azúcar.

Varios estudios han demostrado que la pectina puede utilizarse para formar partículas de nano escala adecuadas para la entrega de ingredientes bioactivos. Las nanoesferas de pectina han sido fabricados en medio acuoso utilizando iones de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{CO}_3^{2-}$  (Yu *et al.*, 2009) o glutaraldehído (Chang *et al.*, 2007) como agentes de reticulación. Una desventaja potencial, de los portadores de calcio pectinada es su estructura relativamente porosa, que causa baja eficiencia de captura y rápida liberación de los bioactivos incorporados, especialmente para compuestos hidrófilos, de bajo peso molecular (Sonia y Sharma, 2012). Dutta y Sahu (2012) reportaron que la carga de la encapsulación de las nanopartículas de pectina podría mejorarse mediante el aumento de la tasa de disolución del encapsulante en pectina utilizando ultrasonidos de alta intensidad.

La interacción no covalente entre polisacáridos y capa de moco resulta en mucoadhesión débil que es una característica favorable de portadores desde su tiempo de retención en el tracto gastrointestinal y en consecuencia la liberación del

encapsulante aumenta. Las propiedades naturales mucoadherentes de polímeros pueden mejorarse mediante tiolación. Sharma *et al.*, (2012) produjeron pectina tiolada producido por la esterificación con ácido tioglicólico en presencia de nanopartículas de ácido clorhídrico tiolado y fabricado por la técnica gelación ionotrópica usando cloruro de magnesio como el iónico vinculante. Por lo general, son partículas relativamente grandes ( $r > 1000$  nm) se forma cuando la pectina se usa como el biopolímero único; al mismo tiempo las partículas más pequeñas pueden ser formadas por su combinación con otros biopolímeros como quitosano (Fathi y Varshosaz, 2013, Dutta y Sahu, 2012).

### **2.7.2 Concentrado de Proteína de suero**

El concentrado de proteína de suero (CPS) es la proteína obtenida de la leche coagulada en el procesamiento de queso. Típicamente el concentrado de proteína de suero contiene  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbúmina, inmunoglobulinas, residuos de grasa de leche, lactosa, minerales y agua. En este tipo de productos el contenido de proteínas varía de entre 30-80% (Jiménez, 2006). Los principales componentes de CPS son la  $\beta$ -lactoglobulina (60%), la  $\alpha$ -lactoalbúmina (22%), la albúmina de suero bovino (5.5%) y las inmunoglobulinas (9.1%), las cuales, exhiben propiedades funcionales únicas de emulsificación, gelación, espesamiento, espumado y capacidad para ligar agua. El CPS poseen un alto valor nutritivo y es considerado como ingrediente de grado Generalmente Reconocido Como Seguro (GRAS) confiable para su empleo en la industria de los alimentos (Lizarraga, 2007). Las proteínas del suero de la leche poseen excelentes propiedades de encapsulación, incluso superiores, comparada con otros materiales de pared como las maltodextrinas, ofreciendo gran efectividad en la encapsulación de compuestos volátiles, no volátiles, polares, no polares, líquidos y cristalinos de aplicación farmacéutica y alimentaria (Ratnakar-Shripad, 2007). Además el empleo de CPS como material de pared en la microencapsulación, tiene efecto en la morfología de las microcápsulas obtenidas haciéndolas de forma más esféricas y de superficie tersa, proporcionando una base eficaz para la microencapsulación de compuestos

volátiles mediante secado por aspersión (Madene *et al.*, 2006, Espinoza *et al.*, 2002).

### 2.7.3 Maltodextrinas

Las maltodextrinas tienen propiedades de ser moderadamente dulce, de rápida absorción e higroscopicidad, son ampliamente utilizados en numerosos alimentos (Chronakis, 1998; Fisher y Bloomer, 2010; Kendig *et al.*, 2014). Las maltodextrinas, son compuestos lineales formados por una mezcla de polímeros de unidades de *D*-glucosa con enlaces  $\alpha$ -1,4-glucosídicos, clasificados por grado de polimerización (DP) lineales malto-oligosacáridos ( $DP \leq 8$ ) y amilodextrinas ( $1 \leq DP < 17$  o más largo). En comparación con malto-oligosacáridos ramificados con enlaces 1,6-glucosídicos además 1,4-glucosídicos, las malto-oligosacáridos lineales son más fácilmente hidrolizadas por humanos en saliva o amilasa pancreática y la mucosa glucosidasa resultando en mayor índice glucémico para la nutrición y energía. (Xu *et al.*, 2012). Las maltodextrinas se utilizan a menudo en primera instancia debido a su sabor suave, bajo costo, alta solubilidad en agua (hasta un 75%) y baja viscosidad cuando están en solución, además de tener funciones multivariadas incluyendo volumen y propiedades de formación de película, capacidad de unión de sabor y grasa, reducción de oxígeno permeabilidad de la matriz de la pared (Sansone *et al.*, 2011) Sin embargo, su temperatura de transición vítrea es baja, liderando la formación de cristales bajo aumento de temperatura (Bae y Lee, 2008) puede inducir la interrupción de la integridad estructural de la matriz de pared. Sin embargo, las maltodextrinas, también se utilizan para disminuir problemas de adherencia y aglomeración en la formación de polvos (Bhandari *et al.*, 1993).

## 2.8 Antecedentes

En los últimos años se ha realizado diversos estudios acerca de la nanoencapsulación y microencapsulación, los cuales han sido de gran importancia en la protección de antioxidantes: Rascón y colaboradores (2011) estudiaron la capacidad de retención, almacenamiento y estabilidad de carotenoides presentes en la oleorresina de paprika encapsulada mediante secado por aspersion utilizando goma arábica y aislado de proteína de soya como materiales de la pared. El rendimiento de la goma arábica (GA) y aislado de proteína de soya (SPI) en microcápsulas de oleorresinas de paprika fueron evaluadas para su preparación y su almacenamiento. Las emulsiones de oleorresina de paprika con una proporción de oleorresina de paprika/material de pared 1:4 (w/w) se prepararon usando homogeneización a alta presión, y luego se secó por aspersion. Ambos tratamientos mostraron que la retención de carotenoides en las microcápsulas aumentó cuando el aire de la temperatura de entrada se incrementó desde 160 hasta 200 °C, y la fracción amarilla era más estable que la fracción roja a todas las temperaturas ensayadas. Las microcápsulas con la retención más alta de carotenoides se almacenaron a diferentes actividades de agua ( $a_w$ ) a 35 °C. La estabilidad máxima para la oxidación de los carotenoides se encontró en la  $a_w$  de 0.274 y 0.710 para microcápsulas preparadas con GA y SPI respectivamente. En ambos tratamientos la degradación más baja de los carotenoides se asoció a la zona de mínima entropía integral, durante el almacenamiento a 35 °C. En contraste con microcápsulas preparadas con SPI, las microcápsulas GA no conservaron su integridad estructural en las actividades de agua por encima de 0.743.

Abbeddou y colaboradores (2013) estudiaron el efecto de la termo degradación simulada en los carotenoides, tocoferoles y propiedades antioxidantes de oleorresinas de tomate y paprika. Evaluando en las oleorresinas la coloración, estado redox y la capacidad antioxidante durante la degradación térmica de carotenoides en el tomate y la paprika. Encontrando que el perfil de lípidos y contenido de tocoferol tuvieron diferencias significativas pero similares en ambos extractos aceitosos, estos fueron observados en las propiedades funcionales

derivados de la actividad de los carotenoides. La capacidad antioxidante inicial fue similar para ambos extractos de carotenoides, la oleorresina de tomate mantuvo altos valores de capacidad antioxidante (prueba DPPH) que la oleorresina de paprika, aunque la tasa de degradación fue significativamente mayor para el licopeno, mientras que los carotenoides de oleorresina de paprika fueron degradados lentamente. Los productos de degradación de carotenoides pueden participar en las reacciones de barrido de radicales pero la eficiencia depende de la especie y la estructura de productos radicales de degradación producida durante la degradación térmica.

Bustamante y colaboradores (2015) microencapsularon oleorresinas de *H. pluvialis* con diferente composición de ácidos grasos y realizaron una cinética de estabilidad de astaxantina y  $\alpha$ -tocoferol. La *Haematococcus pluvialis* es una fuente natural de astaxantina (AX). Sin embargo, AX pierde su protección natural cuando se extrae de esta microalga. En este estudio, un extracto de fluido supercrítico (SFE) de *H. pluvialis* fue obtenido y añadido en aceites con distintas composiciones de ácidos grasos (aceite de girasol (SO) o aceite de girasol alto en oleico (AGRO)). Las oleorresinas de *H. pluvialis* ((SO + SFE) y (AGRO + SFE)) se encapsularon con Capsul mediante secado por aspersión. La estabilidad de las oleorresinas y polvos se estudió a 40, 50 y 70 °C. La degradación AX y  $\alpha$ -tocoferol (AT) siguieron un modelo cinético de primer orden y de orden cero, respectivamente, para todos los sistemas. La encapsulación de oleorresinas mejoró la estabilidad de AX y AT en una mayor medida en oleorresinas con un perfil de ácidos grasos monoinsaturados, como se muestra por la significativamente más baja tasa de degradación constantes y largas vidas medias. Por lo tanto, la encapsulación de oleorresinas *H. pluvialis* es una alternativa en la elaboración de un ingrediente funcional para el diseño de la comida sana.

Pérez y colaboradores (2005) realizaron un estudio sobre el Impacto del aumento de procesamiento térmico en los valores equivalentes de retinol en oleorresinas de paprika, durante el procesamiento de frutas de pimiento (*Capsicum annum* L.) para producir sus oleorresinas se incluyó una etapa de extracción con

disolvente orgánico para extraer el contenido lipófilo de la materia prima, y una etapa de eliminación de disolventes. Este proceso somete componentes del producto a una tensión de calefacción, lo que puede generar la degradación de la fracción de carotenoide que proporciona este producto su capacidad para colorear, y el contenido nutricional. Diferentes oleorresinas de pimentón fueron sometidos a la degradación térmica y evolución de los carotenoides en provitamina A, fue seguido de  $\beta$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina. Se detectaron dos vías de reacción durante el proceso térmico: isomerización y la degradación con diferentes contribuciones al valor de provitamina A de la muestra. Los crecientes valores de temperatura aplicados a las oleorresinas, muestran que la estabilidad de los carotenoides en oleorresinas de pimentón, es lo suficientemente bueno como para soportar un proceso de calentamiento prolongado evitando cambios en los valores de ER.

Yusop y colaboradores (2011) evaluaron nanopartículas de oleorresina de paprika en el rendimiento del marinado y la aceptación sensorial de la carne de aves de corral. Fueron investigados los efectos de las nanopartículas de oleorresina de paprika (1 y 3 g /100 mL) y el sistema portador (agua/leche) en las propiedades físicas y sensoriales de pollo cocido y adobado. La absorción del adobo, pérdida de cocción, color de la superficie ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), la fuerza de penetración, la humedad y el contenido de grasa fueron medidos. Las propiedades sensoriales, incluyendo; color de la superficie (naranja, rojo), la penetración de color, aroma, dureza, jugosidad, aceptabilidad sabor, sabor pimentón, salinidad, picor y la aceptabilidad general, también se evaluaron usando 25 evaluadores no entrenados (consumidores). La proporción de 3g/100 mL paprika produjo una mayor superficie en  $a^*$  (enrojecimiento) y  $b^*$  (amarillamiento), color naranja en la superficie sensorial, atributos de penetración de color rojo y color. La proporción 0:100 (relación agua: leche) con nanopartículas de oleorresina de paprika ha demostrado aumentar la calidad de color del pollo marinado y cocinado al aumentar ( $P < 0.05$ ) CIE el valor de superficie  $a^*$  (enrojecimiento) y  $b^*$  (amarillamiento), mientras que el sistema de soporte relación 100:0 agua: leche proporciona una mejor penetración del color. En conclusión la aplicación de nanopartículas de paprika, mejoró con éxito el rendimiento del marinado.

De acuerdo con lo anterior, existen una variedad de estudios de antioxidantes micro y nanoencapsulados, sin embargo, no se han encontrado trabajos en donde se comparen estos dos métodos, por ello se desarrolló este estudio para evaluar sus diferencias y proponer el mejor método para encapsular compuestos antioxidantes presentes en oleoresina de paprika con la finalidad de mantener su estabilidad y con ello extender su vida de anaquel.

## **2.9 Situación actual**

Hoy en día muchas sustancias pueden ser encapsuladas en partículas, en polvo sólidas o ellas pueden ser microencapsuladas en emulsiones estructuradas (Palzer, 2009), siendo a su vez una tecnología que tiene muchas aplicaciones donde se destaca la industria farmacéutica, médica, textil, alimentaria (Dutta *et al.*, 2009; Rai *et al.*, 2009), pesticida (Araneda y Valenzuela, 2009; Li *et al.*, 2009), cosmética, química (Fuchs *et al.*, 2006) etc. Por otro lado, recientemente la industria de alimentos ha tenido un gran interés por los pigmentos naturales debido principalmente, a la demanda por productos alimenticios saludables y oportunidades para la innovación en el sector (Parize *et al.*, 2008; Ge *et al.*, 2009). El uso de estos pigmentos requiere de conocimientos de sus moléculas y de su estabilidad química, además para adaptarse a las condiciones de utilización durante el procesamiento, empaquetado y distribución. La industria requiere de tecnologías que protejan los pigmentos naturales del ambiente, debido a su inestabilidad en la presencia de luz, aire, humedad y altas temperaturas. Un ejemplo de estos pigmentos son los carotenoides que son utilizados como colorantes en alimentos, bebidas, cosméticos entre otros. Durante el procesamiento y almacenamiento, los carotenoides pueden fácilmente reordenarse en diferentes isómeros geométricos y oxidarse, esto trae como consecuencia la disminución o pérdida del colorante y de sus propiedades biológicas. Las principales alternativas de aplicaciones para incrementar la estabilidad de carotenoides y así permitir su incorporación en ambientes hidrofílicos, es la microencapsulación a través del método de secado por aspersión (Larroza y Zerlotti, 2007; Fabra *et al.*, 2009).

### **3. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA**

En la actualidad uno de los principales problemas en los alimentos es la rápida degradación de sus compuestos bioactivos, para ello se han desarrollado diferentes metodologías que permiten su protección, dentro de las más utilizadas se encuentran la microencapsulación y la nanoencapsulación los cuales son procesos que han resultado ser los de mejor protección de compuestos. Sin embargo, no se han encontrado estudios que evalúen las diferencias en el uso de estos métodos durante la encapsulación. Por lo anterior en este trabajo se propone realizar la encapsulación de los antioxidantes presentes en la oleorresina de paprika por ambas metodologías y seleccionar el método que conserve los compuestos bioactivos presentes lo mejor posible.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo General:**

Obtener microcápsulas y nanocápsulas de oleorresina de paprika, evaluar su estabilidad y propiedades fisicoquímicas.

#### **4.2 Objetivos específicos:**

- Evaluar las propiedades fisicoquímicas de la oleorresina de paprika.
- Realizar emulsiones con la oleorresina de paprika utilizando tres diferentes biopolímeros.
- Realizar la microencapsulación de oleorresina de paprika y evaluar sus propiedades fisicoquímicas.
- Seleccionar las microcápsulas que presenten mejores propiedades fisicoquímicas y mejor rendimiento.
- Realizar la nanoencapsulación de oleorresina de paprika con el biopolímero seleccionado y evaluar sus propiedades fisicoquímicas.

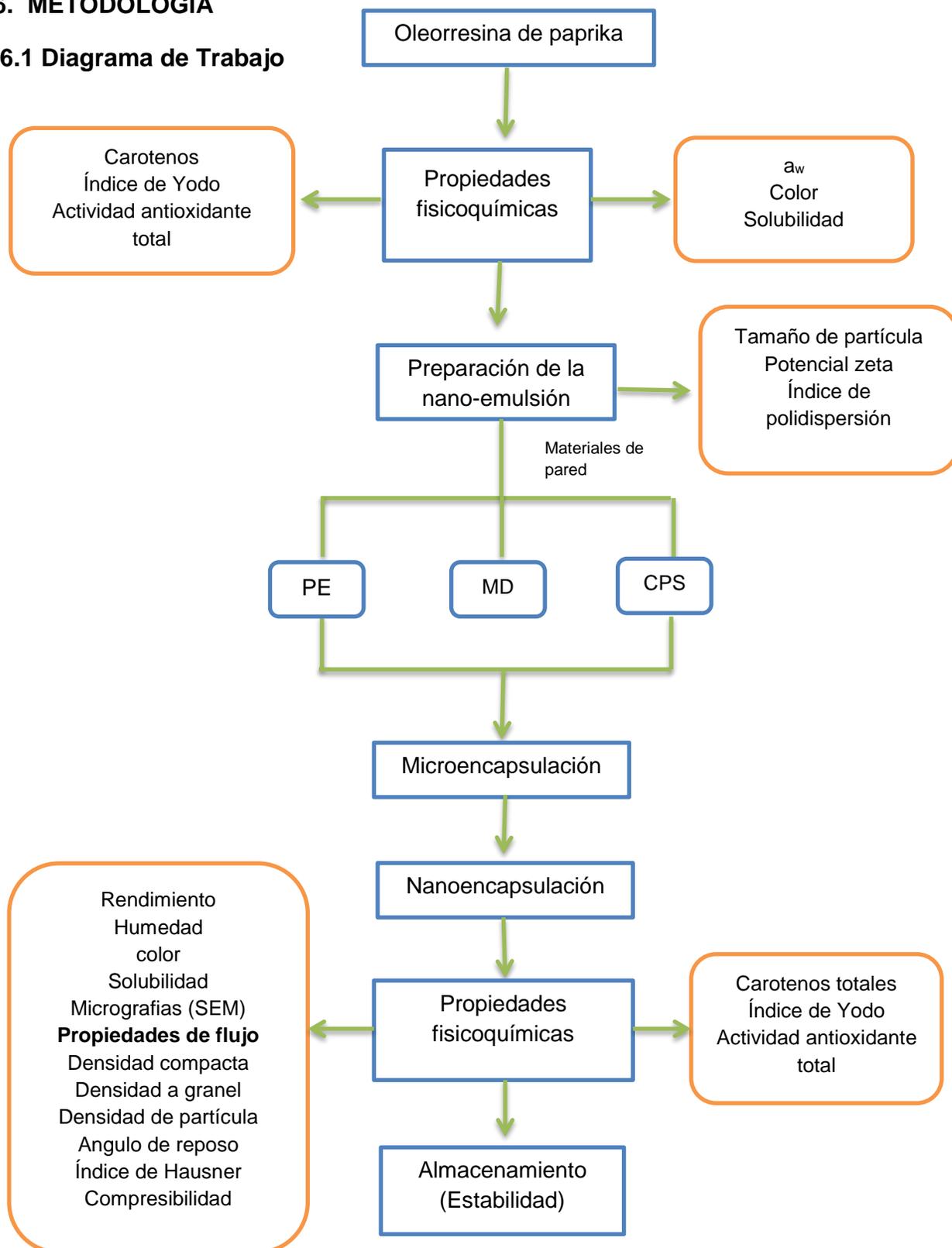
- Evaluar la estabilidad fisicoquímica y oxidativa de las nano y microcápsulas de oleorresina de paprika durante su almacenamiento en condiciones controladas.

## **5. HIPÓTESIS**

La micro y nanoencapsulación de la oleorresina de paprika presenta diferencias en las propiedades fisicoquímicas y en la protección de sus compuestos bioactivos.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Diagrama de Trabajo



## 6.2 Materia Prima

Se empleó como materia prima, oleorresina de paprika comercial de la marca AMCO Internacional®. Y se mantuvo en refrigeración a 4 °C. Los materiales de pared a utilizar son los siguientes: Maltodextrina DE 10 marca INALMALT, Concentrado de Proteína de Suero marca Vilher, S.A de C.V. y Pectina LM de la droguería Cosmopolitan (Ciudad de México).

## 6.3 Evaluación de las propiedades físicoquímicas de la oleorresina de paprika.

### 6.3.1 Color

El color se midió a través de los parámetros a\* (rojo- verde), b\* (amarillo-azul) y L\* (intensidad y brillantez) en la escala del sistema CIEL a\* b\* (International Commission on Illumination, Viena) con un colorímetro ColorFlex V1-72 SNHCX 1115 s/n: Cx1115 Hunter Lab (Tiwari *et al*; 2008). Se utiliza la ecuación de cambio total de color para interpretar los resultados, así como también el ángulo matiz (°H) y el valor de Croma (Ecuaciones 1, 2 y 3).

$$\Delta E = \sqrt{(L - L_0)^2 + (a - a_0)^2 + (b - b_0)^2}$$

Ecuación. 1

Dónde:

L<sub>0</sub>, a<sub>0</sub>, b<sub>0</sub> = Valores de color de la muestra inicial.

L, a, b = Valores de color de la muestra tratada

$$\text{Angulo matiz} = \tan^{-1} \frac{b}{a}$$

Ecuación. 2

$$\text{Croma} = \sqrt{a^2 + b^2}$$

Ecuación. 3

## 6.4 Evaluación de las propiedades fisicoquímicas de oleorresina de Paprika

### 6.4.1 Determinación de Carotenos

El contenido de carotenoides se determinó a través de un espectrofotómetro de acuerdo con el método propuesto por Hornero y Mínguez (2001) modificada. Se toma una concentración conocida de oleorresina, y se afora en un matraz de 100 mL con acetona, y se realizan las mediciones de absorbancia en un espectrofotómetro de matriz de diodos (Modelo de Agilent 8453) a 472 y 508 nm. A fin de obtener el carotenoide isocrómico y las fracciones totales de carotenoides; los valores de absorbancia obtenidos son calculados con las siguientes ecuaciones:

$$C^R = \frac{A_{508} \times 2144.0 - A_{472} \times 403.3}{270.9} (\mu g/mL)$$

Ecuación. 4

$$C^Y = \frac{A_{472} \times 1724.3 - A_{508} \times 2450.1}{270.9} (\mu g/mL)$$

Ecuación. 5

### 6.4.2. Determinación de la actividad antioxidante total por el método del ácido linoleico.

La determinación de la actividad antioxidante total se realizó por el método del ácido linoleico, haciendo una solución de  $\beta$ -caroteno en cloroformo (3.34 mg/mL) se añadió a un matraz que contenía 40 mg de ácido linoleico y 400 mg de Tween 20 y se mezclaron, el cloroformo fue eliminado por evaporación en un rotavapor a 40 °C durante 5 min y al residuo se le añadió 100 mL de agua destilada lentamente con agitación vigorosa, para formar una emulsión. Se tomaron alícuotas de 5 mL de la emulsión y se añadieron a tubos que contenían 0.2 mL de la solución antioxidante con una concentración de 200 mg/mL, y se realizó su determinación de inmediato a una absorbancia de 470 nm, frente a un blanco, que consistió en la

emulsión sin la muestra. Los tubos se colocaron en un baño de agua a 40 °C y las mediciones se hacen a intervalos de 15 min por 120 min (Amin *et al.*, 2004).

La actividad antioxidante es obtenida de la siguiente fórmula:

$$AA = \left( 1 - \frac{A_0 - A_1}{A_0^0 - A_1^0} \right) \times 100$$

Ecuación. 6

Donde:

$A_0$  y  $A_0^0$  son los valores de las absorbancias medidas en el tiempo inicial para las muestras y el control, respectivamente, mientras que  $A_1$  y  $A_1^0$  son los valores de las absorbancias medidas en las muestras y en el control a  $t = 120$  min.

#### **6.4.4. Determinación del índice de Yodo**

##### **Método de Hanus**

Se determinó el índice de yodo pesando de 0.5 g de muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Se agregaron 10 mL de cloroformo y se agitó tratando de disolver. Posteriormente se agregaron 5 mL de reactivo Hanus con una pipeta volumétrica, tapando el matraz y dejando reposar por 30 min al abrigo de la luz. Se añadieron 0.5 mL de solución de yoduro de potasio al 15% y 2 mL de agua destilada. Posterior a esto se valoró con tiosulfato de sodio 0.1 N usando almidón como indicador. Se preparó una determinación en blanco (Mehlenbacher, 1970). El índice de yodo se determinó por la siguiente ecuación.

$$\text{Índice de yodo} = \frac{(V - C) \times N \times 12.69}{M}$$

Ecuación. 7

Donde:

V= Volumen gastado en la titulación de la muestra.

C= Título del blanco.

N= Normalidad del tiosulfato.

M= Peso de la muestra.

12.69 = Peso equivalente de yodo en una solución 0.1 N.

## **6.5 Proceso de encapsulación de oleorresina de paprika.**

### **6.5.1 Preparación de la emulsión.**

La emulsión estuvo compuesta por, oleorresina de paprika, aceite de canola, surfactante (Tween 20, HLB= 16.7), agua destilada y material de pared correspondiente (Maltodextrina, Concentrado de proteína de suero, y pectina), para 100 g de emulsión, generando una emulsión aceite en agua. Todos los componentes se mezclaron en un homogeneizador, posteriormente se sonicaron en un ultrasonido marca Branson, modelo Digital Sonifier 250 D, Estados Unidos, con una amplitud del 35%, esto con la finalidad de disminuir el tamaño de partícula.

#### *Nanoemulsión*

La emulsión se hidrató por 24 hrs y se ajustó a pH 3, una vez ajustado el pH se pasó por un homogeneizador (Ultra-Turax. IKA. Modelo T 25 Basic S1, Germany) por 5 min. Por último se utilizó un Microfluizador a una presión de 30 MPa (Microfluidics Modelo M110PII, USA) hasta 11 ciclos, para disminuir el tamaño de partícula y formar la nanoemulsión.

### **6.5.2 Determinación del tamaño de partícula e índice de polidispersión**

El tamaño de partícula se midió mediante el sistema Zetasizer Nano S modelo MAL1600, Canadá, el cual determina el tamaño midiendo el movimiento browniano de las partículas en una muestra mediante dispersión de luz dinámica (DLS). Se tomaron 20 µL de emulsión y se diluyeron en 2 mL de agua destilada en

una proporción de 1:100 (muestra:agua), y se realizó la determinación con una celda de plástico desechable para evitar contaminación.

### **6.5.3 Determinación de potencial zeta**

La repulsión o atracción entre las partículas y sus mecanismos de dispersión se midió mediante el sistema Zetasizer Nano S modelo MAL1600, Canadá. Se tomaron 20  $\mu\text{L}$  de emulsión y se diluyeron en 2 mL de agua destilada en una proporción de 1:100 y se llevó a cabo la determinación en una celda desechable Call. (Pereira dos Santos *et al.*, 2016 modificada)

### **6.5.4 Micro y nanoencapsulación mediante secado por aspersion.**

Una vez lista la emulsión se procedió a secarla en un secador por aspersion (microencapsulación), marca BÜCHI Mini Spray Dryer, modelo B- 290, 2010 a una temperatura de entrada de 150 °C y una de salida de 90 °C, a una velocidad de flujo de 40 mL/min y una presión de -40 mm Hg (Díaz *et al.*, 2015), protegiendo de la luz durante el proceso. Una vez obtenido el polvo, se pesó y se mantuvo en frascos ámbar en atmósfera de nitrógeno.

La nanoencapsulación se realizó con un secador marca BÜCHI Nano Spray Dryer modelo B-90 a una temperatura de entrada de 110 °C, una velocidad de flujo de 35 mL/min, flujo de gas 100 L/min y una malla de aerosol de 5.5  $\mu\text{m}$  (Li *et al.*, 2010). Con una dilución de 1:20 de la emulsión.

## **6.6 Evaluación de las propiedades físicas de las micro y nanocápsulas de oleoresina de paprika.**

### **6.6.1 Determinación de Humedad**

Se pesó en un crisol previamente tarado 1 g de muestra y se colocó en una estufa de vacío marca Shel LAB modelo 1410, Estados Unidos, manteniendo la temperatura a 105 °C durante 4 h. El periodo de tiempo comienza cuando se tiene la temperatura deseada. Después del tiempo requerido, se transfirió el crisol al desecador esperando a que alcanzara la temperatura ambiente (aproximadamente 20 min). Transcurrido este tiempo se pesó en la balanza analítica. Se volvió a colocar la muestra en la estufa por 30 min, al terminar el tiempo se enfrió y pesó

nuevamente, este proceso se realiza hasta conseguir peso constante. El contenido de humedad se calcula mediante la Ecuación 13 (Lees, 1994)

$$\% \text{ de humedad} = \frac{(M1 - M2)}{M} \times 100$$

Ecuación. 8

M1= Peso del crisol más muestra húmeda.

M2= Peso del crisol más muestra seca.

M = Peso de la muestra.

### **6.6.2 Determinación de actividad de agua ( $a_w$ )**

La actividad de agua se determinó por la medición de la temperatura exacta de condensación del vapor de agua (punto de rocío) que se encuentra directamente relacionada con la  $a_w$  de la muestra y eso se hizo por medio de un higrómetro digital, marca aqualab.

### **6.6.3 Determinación de solubilidad**

Para esta determinación se preparó una solución al 1% de muestra, en un vaso de precipitados de peso constante, dicha solución se agitó por 30 min. Posteriormente se filtró con una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  y el filtrado se dejó evaporar a 100 °C, el residuo se pesó nuevamente y la solubilidad se obtuvo por diferencia de peso (Crosbie, 1991 modificada).

### **6.6.4 Morfología microscópica.**

Se analizó la morfología externa de las cápsulas equilibradas a actividad de agua (0.00). Para ello se colocó 1.0 g de muestra y se ajustó a humedad relativa en desecadores de vidrio con sales,  $\text{P}_2\text{O}_5$  ( $a_w = 0.00$ ) se almacenó a 25° C (Labuza *et al.*, 1985).

Para el estudio de la topografía externa de las microcápsulas, las partículas fueron montadas en un portamuestras con doble lado adhesivo y fueron recubiertas con 60% de oro y 40% de paladio con un metalizador iónico (Denton Vacuum, modelo DESK V). Las muestras fueron analizadas en un microscopio electrónico de barrido (JEOL, modelo JSM-5600 LV) a 28 kV.

### 6.6.5 Rendimiento de Carotenos.

En la encapsulación el rendimiento del metabolito activo es definido como el material microencapsulado con respecto al adicionado en la solución con el material de pared (Zilberboim, 1986).

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Carotenos en microcápsula} \left( \frac{g}{100} \text{ g sólido} \right)}{\text{carotenos en solución} \left( \frac{g}{100g} \text{ de sólido} \right)} * 100$$

Ecuación. 9

### 6.7 Evaluación de las propiedades de flujo de las micro y nanocápsulas de oleorresina de paprika.

#### 6.7.1 Densidad a granel

En una probeta graduada de 10 mL se colocaron 2 g de muestra. La densidad a granel se calculó dividiendo el peso de la muestra en el volumen ocupado por la muestra (Jiménez, 2006).

#### 6.7.2 Densidad compacta

La densidad compacta se determinó por el método de “tappin” en el cual 2-5 g de la muestra se colocaron dentro de una probeta graduada de 10 mL. La probeta se golpea sobre la superficie plana hasta volumen constante ocupado por la muestra. La densidad compacta se calculó dividiendo el peso de la muestra entre el volumen constante ocupado por la muestra (Jiménez, 2006).

#### 6.7.3 Compresibilidad

El porcentaje de compresibilidad se determinó de acuerdo a lo reportado por (Kagami *et al.*, 2003), usando el % de compresibilidad

$$\% \text{ de Compresibilidad} = \frac{100 (P-A)}{P}$$

Ecuación. 10

Dónde:

P= Densidad compacta

A= Densidad a granel

#### 6.7.4 Índice de Haussner

Se determinó con la siguiente ecuación:

$$IH = \frac{\text{Densidad compactada}}{\text{Densidad aparente}}$$

Ecuación. 11

#### 6.7.5 Densidad de partícula

Se midió por el método de picnómetro usando tolueno. La densidad de partícula es la masa total de la partícula dividida entre la diferencia del volumen del picnómetro menos el volumen total de tolueno gastado (Bhandari *et al.*, 1993).

$$D = \frac{mT}{vP - vT}$$

Ecuación. 12

Dónde:

mT= masa total.

vP= volumen del picnómetro.

vT = volumen total de tolueno gastado.

#### 6.7.6 Ángulo de Reposo

Se pesaron 2 g de muestra de las microcápsulas y se adicionaron a un embudo, el cual se colocó a 10 cm de una superficie plana, obstruyéndose la salida de éste. Se dejó caer libremente la muestra, formándose un cono sobre la superficie plana. Posteriormente se midió la altura del cono formado y su radio. El ángulo de reposo fue calculado a partir de la fórmula:

$$\text{Ángulo de reposo} = \arctan \frac{h}{r}$$

Ecuación. 13

## **6.8 Evaluación de las propiedades químicas de las micro y nanocápsulas de oleorresina de paprika.**

### **6.8.1 Rompimiento de las cápsulas.**

Para poder realizar las pruebas químicas se debe romper primero las cápsulas, para ello se colocó una cantidad conocida de cápsulas en un tubo protegido de la luz que contiene de 5-25 mL de acetona (con la finalidad de extraer los carotenos), esto se lleva a un homogeneizador por 5 min, posteriormente se filtró y fue utilizado para realizar dichas pruebas.

### **6.8.2 Carotenos totales, Índice de yodo y Actividad antioxidante total.**

Se realizaron las mismas técnicas mencionadas en el apartado 6.4.

### **6.9.1 Almacenamiento**

El almacenamiento de las micro y nanocápsulas se llevó a cabo durante 30 días en desecadores ajustados a actividades de agua de 0.318, 0.515 y 0.743 a temperaturas de 25 °C, 35 °C y 45 °C.

## **7.0 Análisis estadístico**

Para poder evaluar las diferencias en el comportamiento de los tres biopolímeros en las microcápsulas se realizó un análisis estadístico, Anova de una Vía usando el método para comparaciones múltiples de Holm-Sidak, y en el caso de comparar solo las micro y nanocápsulas se realizó un ensayo test-t (compara 2 grupos).

### **7.1 Análisis de imagen**

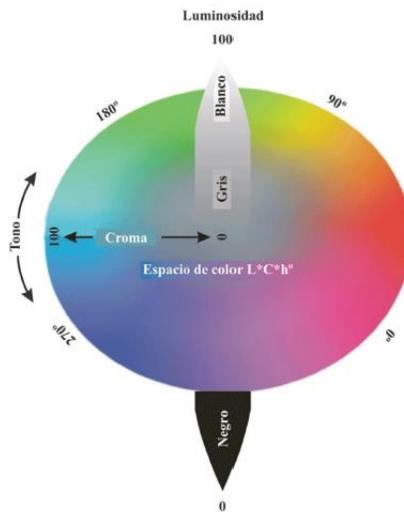
El análisis de Imagen fue realizado con el software imagej 7.50i, analizando los parámetros de área, perímetro, circularidad, diámetro de Feret y mini Feret. Con la finalidad determinar el tamaño de las cápsulas.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Caracterización inicial de oleorresina de paprika

#### 8.1.1 Propiedades fisicoquímicas de oleorresina de paprika

El color es un atributo de apariencia de los productos; su observación permite detectar ciertas anomalías y defectos (Abdullah *et al.*, 2004). En la industria alimentaria, el color es un parámetro en base al cual se realizan clasificaciones de productos, se evalúan materias primas, se hace control de procesos y se miden indirectamente otros parámetros, como la oxidación o degradación de un producto (Delmoro *et al.*, 2010), por lo que es de importancia su determinación. La caracterización inicial de la oleorresina de paprika se muestra en la tabla 1. Evaluándose los parámetros de color ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ), ángulo matiz ( $^\circ$ ) y Croma, índice de yodo, carotenos totales y actividad antioxidante total. El parámetro  $L^*$  (Luminosidad) fue de  $1.05 \pm 0.11$ , el cual indica que se encuentra entre los colores oscuros, debido a que valores de  $L^*$  alejados de 100 tienden a ser de un pigmento más oscuro (Figura. 3). El parámetro  $a^*$  fue de  $3.89 \pm 0.16$  y según la escala del sistema CIEL, valores positivos en  $a^*$  indica una tonalidad roja, en lo que respecta al parámetro  $b^*$  valores positivos tienden al color amarillo, obteniéndose  $1.21 \pm 0.20$ . El ángulo matiz ( $^\circ$ ) se obtiene de los valores de  $a^*$  y  $b^*$  que ubicados en el plano de color indican la tonalidad del color de la muestra expresado en grados, siendo el valor obtenido de  $17.28^\circ \pm 3.18$ . La pureza o croma de un color es proporcional a la cantidad de colorido que tiene. Croma se obtiene de igual manera que el ángulo matiz con las valores de  $a^*$  y  $b^*$ , siendo este de  $4.07 \pm 0.14$ , al colocar estas coordenadas en el plano de color el resultado correspondiente fue que la muestra es de una saturación y tonalidad roja pero oscura.



**Fig. 2** Representación del espacio cromático cilíndrico CIE L\*a\*b\*. Imagen tomada y modificada de GQC (2010).

Siguiendo con el índice de yodo el cual es una medida del grado de instauración de los ácidos grasos de una grasa o aceite y se basa en la adsorción del halógeno bajo ciertas condiciones (Harold, 1993). Los dobles enlaces presentes en los ácidos grasos no saturados reaccionan con el yodo, o algunos compuestos de yodo, formando compuestos por adición. Dicho índice es una propiedad química característica de los aceites y grasas y su determinación puede ser utilizada como una medida de identificación y calidad (Zumbado, 2004). Será tanto mayor cuanto mayor sea el número de dobles enlaces por unidad de grasa, (por ejemplo, el índice de yodo del ácido oleico es 90, del ácido linoleico es 181 y del ácido linolénico 274). Por lo que entre más alto sea este índice indica un mayor contenido de ácidos grasos insaturados. El índice de yodo obtenido en la oleorresina de paprika fue de  $193.08 \pm 14.56$  g/100 g de grasa, indicando así, que está compuesta principalmente por ácidos grasos insaturados. El contenido de carotenoides de una oleorresina depende de la calidad de la materia prima empleada y de las condiciones de procesamiento, lo que podría disminuir el valor inicial (Ong y Tee, 1992), es por ello que su determinación es importante, el resultado obtenido en este trabajo fue de  $67,565 \pm 0.045$   $\mu$ g/g y comparando con Hornero y Mínguez (2001) ellos encontraron en la oleorresina de paprika 42,529  $\mu$ g/g, teniendo una concentración mayor de

carotenos del 37.06% la utilizada en este estudio, esta diferencia puede ser debido a los diferentes procesos de obtención en la oleorresina.

Como es sabido los carotenoides presentan actividad antioxidante, sin embargo, ésta puede variar en cada oleorresina, en el presente trabajo se realizó la determinación de dicha actividad utilizando el método del ácido linoleico el cual refleja la capacidad de la materia en estudio para evitar la decoloración del  $\beta$ -caroteno, por lo que, entre menor sea la decoloración de dicho compuesto mayor será la capacidad antioxidante de la muestra ya que estará protegiendo al carotenoide de su degradación (Amin *et al.*, 2004), estos mismos autores reportaron una actividad antioxidante total del 69 a 50% en extractos de diferentes vegetales, siendo su valor más alto similar al obtenido en este estudio que fue del 70.21%, indicando que la oleorresina de paprika utilizada presenta un alto porcentaje de dicha actividad.

**Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de oleorresina de paprika antes del secado.**

<b>Propiedad</b>	<b>Promedio <math>\pm</math> SD</b>
<b>Color</b>	
<b>L</b>	1.05 $\pm$ 0.11
<b>a</b>	3.89 $\pm$ 0.16
<b>b</b>	1.21 $\pm$ 0.20
<b>Ángulo matiz (°)</b>	17.28 $\pm$ 3.18
<b>Croma</b>	4.07 $\pm$ 0.14
<b>Índice de Yodo (g/100 de aceite)</b>	193.08 $\pm$ 14.56
<b>Carotenos totales (<math>\mu</math>g/g)</b>	67565 $\pm$ 0.04
<b>Actividad antioxidante total (%)</b>	70.21 $\pm$ 0.32

Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones  $\pm$  la desviación estándar.

### **8.1.2 Propiedades fisicoquímicas de las emulsiones de oleoresina de paprika con diferentes biopolímeros.**

La preparación de la emulsión es el primer paso involucrado en el proceso de encapsulación mediante secado por aspersion. La capacidad de cada agente de encapsulación para producir tamaños de partículas uniformes y pequeñas está relacionado con su capacidad para cubrir completamente el aceite durante la homogeneización e impide su coalescencia después de la misma (Rascón *et al.*, 2011). La caracterización de las emulsiones realizadas en el presente trabajo se muestran en la Tabla 2, de acuerdo con el análisis estadístico realizado existen diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) en los tamaños de partículas ya que las propiedades fisicoquímicas de cada material de pared y la proporción utilizada de los mismos influyen en dichos tamaños, siendo maltodextrina quien tuvo el menor tamaño de partícula en comparación con PEC y CPS. En promedio el tamaño de partículas pequeñas previene la coalescencia de las gotas durante el proceso de secado, haciendo la emulsión más estable. Una emulsión con un material de núcleo estable (material que está siendo encapsulado) dentro del material de pared (agente de encapsulación) en la solución es un factor crítico en microencapsulación (Ré, 1998). Otro factor importante en una emulsión es la determinación del índice de polidispersión (PDI) el cual representa la uniformidad de las partículas en suspensión, en la que los valores de PDI entre 0.10 y 0.25 indican una estrecha distribución de tamaños y valores de PDI superiores a 0.50 indican una amplia distribución (Wu *et al.*, 2011). Los PDI resultantes de las emulsiones evaluadas en los tres biopolímeros se encuentran dentro de dicho rango, habiendo diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) con CPS, teniendo este un PDI ligeramente mayor, con respecto a MD y PEC y no existiendo diferencias entre estos últimos, indicando que existe uniformidad en las emulsiones. Por último otra medida de estabilidad en una emulsión es la determinación de potencial zeta, que es una propiedad física que se exhibe por partículas en suspensión, macromoléculas o superficie del material; corresponde al potencial eléctrico de las nanopartículas influenciadas por la composición de las nanocápsulas y el medio en el que se dispersan (Lobato *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2011). Este parámetro se utiliza ampliamente para indicar

estabilidad de la suspensión en dispersiones coloidales, donde los valores de potencial zeta mayor que 30 mV y menor que -30 mV promueven una alta estabilidad y evitan que las partículas lleguen al fenómeno de agregación (Mohanraj y Chen, 2006). De acuerdo a lo anterior las tres emulsiones evaluadas en este estudio presentan un potencial zeta alto ( $P \leq 0.016$ ), lo cual indica que presentan una alta estabilidad electrostática.

**Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de las emulsiones de oleoresina de paprika con diferentes biopolímeros.**

<b>Propiedad / Material de Pared</b>	<b>Maltodextrina</b>	<b>Concentrado de proteína de suero</b>	<b>Pectina</b>
<b>Tamaño de partícula (nm)</b>	115.7 ± 0.61 <sup>a</sup>	137.9 ± 1.85 <sup>b</sup>	189.7 ± 1.30 <sup>c</sup>
<b>PDI</b>	0.22 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.30 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.20 ± 0.00 <sup>c</sup>
<b>Potencial Zeta (mV)</b>	-36 ± 1.14 <sup>a</sup>	-34.7 ± 1.68 <sup>b</sup>	-43.3 ± 4.03 <sup>c</sup>

Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones ± la desviación estándar. Letras iguales entre columnas indican que no hay diferencias.

## **8.2. Caracterización de las cápsulas**

### **8.2.1 Propiedades fisicoquímicas de las microcápsulas de oleoresina de paprika con diferentes biopolímeros.**

La Tabla 3 muestra las propiedades fisicoquímicas evaluadas en las microcápsulas de oleoresina de paprika para cada material de pared obtenidas en condiciones óptimas. Determinándose: porcentaje de humedad en base húmeda, actividad de agua ( $a_w$ ), color ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ), ángulo matiz ( $^\circ$ ) y croma, porcentaje de solubilidad, índice de yodo, carotenos totales, actividad antioxidante total y rendimiento de microencapsulación de carotenos. Se observa que el CPS tuvo el menor porcentaje de humedad seguida de MD y PEC, encontrándose diferencias significativas ( $P \leq$

0.001) en PEC con respecto a MD y CPS pero no entre estos dos últimos, dicho comportamiento puede deberse a la diferencia en la composición química que cada biopolímero posee, y a las propiedades fisicoquímicas que estos presentan, como por ejemplo, solubilidad, viscosidad, peso molecular, cristalinidad, propiedades emulsificantes, formadoras de películas (Bonilla, 2010).

El contenido de humedad y la  $a_w$  en estos tres biopolímeros fue diferente y baja en comparación con lo reportado por Bustamante *et al.* (2015) quienes trabajaron con microcápsulas de oleorresina de *H. pluvialis* utilizando almidón de maíz modificado como material de pared, teniendo una humedad de  $7.22 \pm 0.16\%$  y una  $a_w$  de  $0.50 \pm 0.01$ , esto conlleva a decir que la composición fisicoquímica de la matriz encapsulante influye de manera importante en las propiedades físicas de las microcápsulas. En cuanto al color se observa que de los tres biopolímeros quien presenta cambios es PEC en los parámetros L,  $a^*$ ,  $b^*$  y Hue con respecto a MD y CPS, sin embargo en cromaticidad y/o saturación del color, es MD (Anexo 1) quien presenta diferencias con respecto a los otros dos materiales. Si se comparan los biopolímeros con la oleorresina, existe un cambio considerable en el color, dicha pérdida está relacionada con la protección ofrecida por cada biopolímero, siendo PEC quien conserva más la tonalidad roja (ángulo matiz) con respecto a MD y CPS. Por último, en el porcentaje de solubilidad nuevamente es PEC la que presenta mayor solubilidad, esto puede explicarse de acuerdo a lo dicho por Kertesz, (1951) quien define a este biopolímero como ácidos pectínicos solubles en agua de grado de metilación variado, por lo que la solubilidad de la pectina será rápida cuando muestre un alto grado de dispersión. La solubilidad en las proteínas del suero se ve afectada cuando se les aplica tratamiento térmico, es por ello que la solubilidad mostrada en las microcápsulas del CPS fue de 5.9% siendo significativamente baja en comparación a los otros dos polímeros. Por otro lado la solubilidad de la MD tiene relación con la temperatura de secado, Jittanit *et al.* (2011) observaron que la temperatura de secado tiene un efecto positivo sobre la solubilidad, debido a que las altas temperaturas del aire de secado por aspersión producen más porosidad de los polvos. La mayor porosidad da lugar a una mayor superficie específica de polvo,

lo que resulta en un área de contacto más grande entre el polvo y el agua. De acuerdo a lo anterior PEC y MD son los biopolímeros que tiene un efecto positivo sobre la solubilidad después del secado.

Siguiendo con el índice de yodo, el análisis estadístico mostró que no existen diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) entre los tres biopolímeros, teniendo valores de  $22.67 \pm 3.41$ ,  $22.10 \pm 4.49$  y  $28.58 \pm 0.60$  para MD, CPS y PEC respectivamente por lo que, los tres protegen de la misma manera el rompimiento entre las insaturaciones. Si se compara con la oleorresina se observa una importante disminución de dicho índice, es decir que la protección dada por cada material no es suficiente para evitar la ruptura entre los dobles enlaces de los carotenos cuando hay presencia de halógenos. En la cuantificación de carotenos totales el análisis estadístico mostró que existen diferencias ( $P \leq 0.001$ ) entre los tres, siendo MD el biopolímero que conserva mayormente estos compuestos, seguido de CPS y por último PEC, al comparar con Bustamante *et al.* (2015) quienes obtuvieron en sus microcápsulas de oleorresina de *H. pluvialis* un total de  $2910.63 \pm 9.85 \mu\text{g/g}$  de carotenos, es evidente que existe mayor contenido en las analizadas en este estudio, las diferencias pueden deberse al tipo de carotenos presentes en cada oleorresina y a la protección dada por cada biopolímero. Ahora bien si se comparan las microcápsulas con la oleorresina nuevamente se observa una disminución de carotenos, sin embargo en la evaluación de la actividad antioxidante total, MD presenta una actividad antioxidante mayor que la oleorresina, indicando así que dicho biopolímero protege esta actividad en un 80%, lo que lleva a la conclusión que la microencapsulación proporciona propiedades de resistencia al calor de los compuestos antioxidantes.

El rendimiento de microencapsulación de carotenos fue diferente para cada biopolímero (Tabla 3), siendo MD con 41.21% la que retuvo en mayor medida a los compuestos bioactivos, en relación a los otros dos biopolímeros. Sin embargo, se observa que la protección entre CPS y PEC es similar, esta similitud también fue vista en el contenido de carotenos totales, este comportamiento puede ser ocasionado debido a la estructura química que poseen dichos materiales y a la

interacción que estos tienen con los carotenoides que presenta la oleorresina. Por ejemplo, el CPS que en su estructura contiene grupos reactivos (ácido carboxílico, grupos amino y tiol) permiten la fijación del componente activo a la superficie de la partícula antes de la producción de la misma o en el interior de las partículas, de una manera relativamente simple (Jahanshahi *et al.*, 2008) explicándose con esto la protección otorgada en las microcápsulas. Sin embargo, las maltodextrinas se han descrito que proporcionan una buena estabilidad a la oxidación de las sustancias encapsuladas (Sun *et al.*, 2013), pero su rendimiento depende de los equivalentes de dextrosa (Chranioti *et al.*, 2013) por tanto el grado de equivalentes de dextrosa que contiene la MD utilizada en este estudio permitió una mayor protección de los carotenos en comparación con CPS y PEC. Por otra parte, el grado de esterificación y la disposición de la grupos metilo de la molécula de pectina determinan la formación del gel y la estructura de las características de formación (Matalanis *et al.*, 2013) por lo que esto puede influir en la interacción con los carotenos mostrándose una protección baja en comparación con MD pero similar con CPS. Los valores obtenidos para este estudio fueron menores en comparación a lo reportado por Bustamante *et al.* (2015) para las microcápsulas de oleorresina de *H. pluvialis* utilizando almidón de maíz modificado con una retención del 66.42%, quienes explican que el rendimiento de encapsulación puede atribuirse principalmente al tipo de agente de encapsulación usado y/o los factores de procesamiento (la estabilidad de la emulsión y el tamaño de las gotitas, entre otros).

**Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de las cápsulas de oleorresina de paprika con diferentes biopolímeros.**

<b>Propiedad / Material de pared</b>	<b>Maltodextrina</b>	<b>Concentrado de proteína de suero</b>	<b>Pectina</b>
<b>Humedad (%) base húmeda</b>	1.40 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.19 ± 0.15 <sup>a</sup>	3.31 ± 0.23 <sup>b</sup>
<b>Solubilidad (%)</b>	7.08 <sup>a</sup>	5.9 <sup>b</sup>	8.57 <sup>c</sup>
<b>a<sub>w</sub></b>	0.46 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.42 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.63 ± 0.00 <sup>c</sup>
<b>Color</b>			
<b>L</b>	66.13 ± 0.12 <sup>a</sup>	68.99 ± 0.17 <sup>a</sup>	41.06 ± 0.77 <sup>b</sup>
<b>a</b>	29.30 ± 0.28 <sup>a</sup>	26.59 ± 0.17 <sup>a</sup>	43.76 ± 0.93 <sup>b</sup>
<b>b</b>	59.71 ± 0.12 <sup>a</sup>	58.94 ± 0.31 <sup>b</sup>	47.18 ± 1.61 <sup>b</sup>
<b>Angulo matiz (°)</b>	63.85 ± 0.17 <sup>a</sup>	65.71 ± 0.25 <sup>a</sup>	47.31 ± 1.77 <sup>b</sup>
<b>Croma</b>	66.51 ± 0.24 <sup>a</sup>	64.66 ± 0.21 <sup>b</sup>	64.36 ± 0.54 <sup>b</sup>
<b>Índice de yodo g/100 g de grasa</b>	22.67 ± 3.41 <sup>a</sup>	22.10 ± 4.49 <sup>a</sup>	28.58 ± 0.60 <sup>a</sup>
<b>Carotenos totales (µg/mL)</b>	46370 ± 0.05 <sup>a</sup>	26566 ± 0.08 <sup>b</sup>	24330 ± 0.01 <sup>c</sup>
<b>Actividad antioxidante total (%)</b>	80.07 ± 0.01 <sup>a</sup>	47.66 ± 0.01 <sup>b</sup>	64.17 ± 0.03 <sup>c</sup>
<b>Rendimiento (%)</b>	41.21 <sup>a</sup>	31.48 <sup>b</sup>	33.37 <sup>c</sup>

Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones ± la desviación estándar. Letras iguales entre columnas indican que no hay diferencias.

### **8.2.2 Propiedades de flujo de las microcápsulas de oleoresina de paprika con diferentes biopolímeros.**

En las microcápsulas se determinaron las propiedades de flujo, las cuales proporcionan una idea del comportamiento de un polvo. Los resultados se muestran en la Tabla 4. La densidad a granel o aparente es el peso por unidad de volumen de un polvo vertido libremente, esto de acuerdo a las normas ASTM (1989). Y su importancia reside en que es usada fundamentalmente por la industria para ajustar el almacenamiento, procesamiento, empaque y condiciones de distribución del polvo. Según lo escrito por Pólit, (1992) la densidad aparente refleja la calidad del producto en cuanto a textura, apariencia y homogeneidad. Es indicativo del volumen del producto final y está relacionado con el costo del empaque y del transporte, por lo que entre más bajo es el valor, el producto poseerá mejores características. Los resultados obtenidos en las microcápsulas para este parámetro y de acuerdo al análisis estadístico realizado muestra que existe una diferencia significativa de ( $P \leq 0.001$ ) entre MD-CPS y PEC-CPS, teniendo este último material la menor densidad a granel.

La densidad compacta indica la densificación que se produce en un polvo, al someterlo a vibración, sin ser compactado mediante presión (ASTM, 1989). La densidad compacta obtenida fue diferente en cada biopolímero, existiendo una diferencia significativa entre ellos de  $P= 0.001$  observándose que la que obtuvo el mayor valor de compactación fue MD y el menor valor el CPS. Una mayor diferencia entre la densidad aparente y la compactada implica una mayor tendencia a sufrir fracturas e influir en las propiedades de flujo de las microcápsulas (Kagami *et al.*, 2003). Tomando en cuenta lo anterior, y dichas densidades, quien tuvo una menor diferencia entre la inicial y la final fue PEC, por lo tanto este último material de pared tiende a sufrir menos fracturas con respecto a los otros dos.

Otra propiedad de flujo importante es la densidad de partícula, la cual, no solo considera el volumen ocupado por las cápsulas, sino que además incluye el volumen que ocupa cada uno de los poros que posee en su superficie, esto es, una

cápsula con superficie integra sin poros podrá mostrar una densidad de partícula menor a la que ocuparía una con superficie rugosa o porosa. De acuerdo a lo anterior y a los resultados obtenidos con el análisis estadístico existen diferencias significativas entre MD-PEC y CPS-PEC, esto conlleva a decir que las microcápsulas de PEC poseen una superficie rugosa o porosa, en comparación con MD y CPS.

Siguiendo con las propiedades de flujo la medición del ángulo estático de reposo es un método simple de caracterización del comportamiento de polvos o gránulos durante el flujo. Los polvos que exhiben ángulos de reposo menores que  $40^\circ$ , generalmente presentan propiedades de flujo libre, mientras que ángulos arriba de  $50^\circ$  indican cohesividades o problemas de flujo (Bhandari *et al.*, 1998). Los resultados obtenidos para esta propiedad muestran que en los tres materiales de pared los ángulos formados fueron diferentes entre sí, siendo CPS el más alto y PEC el más pequeño, sin embargo de acuerdo a lo descrito por Bhandari todos poseen propiedades de flujo libre.

La compresibilidad es una propiedad de la materia debida a que todos los cuerpos disminuyen de volumen tras ser sometidos a una presión o compresión determinada. El grado de compresibilidad es indicativo del grado de consolidación y de cuanto espacio vacío quedará en la parte superior del contenedor después de su agitación durante el transporte. De igual manera que en la propiedad anterior, el porcentaje de compresibilidad fue diferente en los tres biopolímeros con una  $P \leq 0.001$ . Aulton (2004), describió que un porcentaje de compresibilidad del 40% es descripción de un flujo muy malo, indicativo de que el polvo es de característica cohesiva pero fluida. De acuerdo con lo descrito por dicho autor solo el CPS presenta la descripción de mala fluidez para esta propiedad.

Por último, pero no menos importante, el índice de Hausner es un método simple y rápido para predecir las propiedades de flujo de un polvo (Wallace *et al.*, 1983). Carr propuso su utilización como una medida indirecta de la densidad aparente, forma, tamaño, área de superficie, contenido en humedad y cohesividad

de los materiales ya que todos estos parámetros pueden influenciar el índice de compresibilidad observado (Carr, 1956a, 1965b; York, 1992). Carr, (1965) propuso criterios de valoración para esta propiedad en el cual menciona que un valor de 1-1.3 va de excelente a aceptable y un valor de 1.3 - >1.6 van de malo a extremadamente malo. Las cápsulas tuvieron un comportamiento diferente en este parámetro observándose que MD y PEC se encuentran en el rango de excelente a aceptable y solo CPS tiene un comportamiento de flujo malo, esto de acuerdo a lo descrito por Carr. Como se observa cada material de pared y la proporción utilizada, influyó en el comportamiento y fluidez de los polvos.

**Tabla 4. Propiedades de flujo de las microcápsulas de oleorresina de paprika con diferentes biopolímeros.**

<b>Propiedad/ Material de pared</b>	<b>Maltodextrina</b>	<b>Concentrado de proteína de suero</b>	<b>Pectina</b>
<b>Densidad a granel (g/cm<sup>3</sup>)</b>	0.35 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.20 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.32 ± 0.01 <sup>a</sup>
<b>Densidad Compacta (g/cm<sup>3</sup>)</b>	0.48 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.33 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.39 ± 0.02 <sup>c</sup>
<b>Densidad de Partícula (g/cm<sup>3</sup>)</b>	0.25 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.22 ± 0.00 <sup>b</sup>
<b>Angulo de Reposo (°)</b>	28.89 ± 2.02 <sup>a</sup>	35.43 ± 1.97 <sup>b</sup>	15.12 ± 1.32 <sup>c</sup>
<b>Compresibilidad (%)</b>	27.36 ± 3.23 <sup>a</sup>	40.83 ± 2.53 <sup>b</sup>	16.26 ± 2.13 <sup>c</sup>
<b>Índice de Hausner</b>	1.37 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.68 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.19 ± 0.03 <sup>c</sup>

Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones ± la desviación estándar. Letras iguales entre columnas indican que no hay diferencias

### **8.3 Nanoencapsulación**

#### **8.3.1. Propiedades fisicoquímicas de la nanoemulsión de oleoresina de paprika con maltodextrina.**

Como ya se mencionó anteriormente la nanoemulsión es el primer paso para la encapsulación mediante secado por aspersión, por ello es importante conocer sus propiedades fisicoquímicas y su estabilidad, la Tabla 5 muestra dicha caracterización. Estas nanoemulsiones en comparación con las anteriores, tienen menor tamaño de partícula y esto es debido a que fueron generadas con un equipo de reducción de tamaño de partícula más potente, esto se hizo para comparar los métodos de microfluidizador y ultrasonido, siendo el primero con el que se obtuvieron partículas más pequeñas. El microfluidizador al ser un equipo de alta energía utiliza presiones de hasta 600 bar, en comparación con el sonicador que es un equipo de baja energía y utiliza frecuencias de 20 KHz, es por esta razón que existe un cambio importante en la generación del tamaño de partícula. Se realizó un barrido a diferentes pH para encontrar el óptimo en donde la emulsión fuera más estable, para ello se midió potencial zeta. (Anexo 2). Posteriormente se realizó una curva para encontrar las condiciones ideales para la nanoemulsión desde la hidratación hasta el paso de 15 ciclos en el microfluidizador (Anexo 3), en donde se midió tamaño de partícula, potencial zeta e índice de polidispersión, encontrándose que en 11 ciclos y una presión de 30 MPa se obtuvo un tamaño de partícula de 55 nm, un potencial zeta de -29.77 mV y un PDI de 0.270, siendo estas las condiciones seleccionadas para la nanoemulsión. La diferencia entre las emulsiones preparadas para la microencapsulación y las preparadas para la nanoencapsulación fue el tamaño de partícula y el potencial zeta, el tamaño se puede explicar debido a la diferencia en la energía utilizada en cada equipo, una alta energía proporciona las fuerzas que son capaces de deformar y romper las gotas en las más pequeñas, siempre y cuando se supera la presión de Laplace. La adsorción de surfactante en la interfaz de caída reduce la presión de Laplace (Solans *et al.*, 2003) sin embargo, entra más pequeña sea el tamaño de la gota, mayor será la energía requerida para más caída de quiebre (Shi *et al.*, 2011) siendo el microfluidizador quien proporcionó una mayor energía y menor tamaño de partícula. El potencial zeta fue diferente en

comparación con la primera emulsión, ya que la alta energía y la alta presión ejercida por el microfluidizador interviene en la estabilidad electrostática de la suspensión, obteniendo un valor menor que en la emulsión realizada con el ultrasonido. Sin embargo, el PDI se mantiene dentro de los valores mencionados por Wu *et al.*, (2011) quienes afirman que el PDI representa la uniformidad de las partículas en suspensión, en la que los valores de PDI entre 0.10 y 0.25 indican una estrecha distribución de tamaños y valores de PDI superiores a 0.50 indican una amplia distribución.

**Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de la nanoemulsión**

<b>Propiedad / Material de Pared</b>	<b>Maltodextrina</b>
<b>Tamaño de partícula (nm)</b>	55.14 ± 2.65
<b>PDI</b>	0.27 ± 0.01
<b>Potencial Zeta (mV)</b>	-29.77 ± 0.71

Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones ± la desviación estándar

### **8.3.2 Propiedades fisicoquímicas las nanocápsulas de oleoresina de paprika con maltodextrina.**

La determinación de las propiedades fisicoquímicas de las nanocápsulas se basó en la medición de color, porcentaje de solubilidad, actividad de agua ( $a_w$ ), índice de yodo, carotenos totales, actividad antioxidante total y rendimiento de encapsulación de carotenos (tabla 6). Se midieron los mismos parámetros que en las microcápsulas, los resultados se muestra en la Tabla 3. Al comparar el color obtenido en las microcápsulas con las nanocápsulas (Anexo 4) se observan diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) ya que en el parámetro  $L^*$  que indica transparencia cuando los valores son cercanos a 100, las nanocápsulas tuvieron un valor de  $92.20 \pm 0.17$ , es decir, cercano a la transparencia, como es sabido el color depende del tamaño y forma de las nanopartículas, así como de la distancia entre éstas y de cómo interactúan con la luz, por lo que una partícula grande tendrá un índice de refracción diferente al de una partícula pequeña y el color percibido por nosotros será diferente, de acuerdo con lo anterior, el color en las nanocápsulas fue

diferente que las micro, esto conlleva a que tanto la cromaticidad (Croma) como el ángulo matiz ( $^{\circ}$ ) también se vean afectados, teniendo una intensidad baja y una coloración hacia los tonos claros. En lo que respecta a la actividad de agua ( $a_w$ ) se observa que hay una gran diferencia entre las micro y las nano cápsulas, puesto que las primeras poseen una  $a_w = 0.47$  (Tabla 3), y en cambio las segundas una de  $a_w = 0.001$ , por tanto al ser más pequeñas las partículas el agua disponible para interactuar con el ambiente y provocar reacciones de deterioro, es menor. El porcentaje de solubilidad también fue diferente con respecto a las microcápsulas, ya que al ser más pequeñas las partículas tienen mayor contacto con las moléculas de agua, mejorando la solubilidad. Por otro lado la solubilidad también se relaciona con el biopolímero utilizado en la encapsulación, esto de acuerdo con lo mencionado por Cai y Corke, 2000; Cano *et al.*, 2004; Caparino *et al.*, 2012, quienes afirman que la maltodextrina es una de las sustancias más utilizadas como agente aditivo en la deshidratación de extractos y jugos por secado en atomizador debido a sus propiedades físicas, tales como alta solubilidad en agua.

El índice de yodo fue mayor en las nanocápsulas con respecto a las microcápsulas, se observa que la protección en los dobles enlaces de la estructura química de los carotenos se ve ligeramente favorecida cuando las partículas son más pequeñas, aunque no se compara con el índice de yodo de la oleorresina ya que este sigue siendo más alto (Tabla 1). Hasta el momento se ha visto que el tamaño de las partículas influye de manera importante en el comportamiento y protección que le puede conferir el biopolímero a la oleorresina. El contenido de carotenos en las nanocápsulas fue mayor que en las microcápsulas, esto podría explicarse por el hecho de que mientras que las partículas más grandes tienen un área superficial reducida a la retención de volumen, esto resultaría en una mayor retención del material de núcleo, sin embargo habría un tiempo más largo para la formación de la película alrededor de las gotas grandes durante el proceso. Entre más largo es el tiempo necesario para la formación de la película, mayor es la pérdida de material del núcleo y mayor es el contenido de este en la superficie (Jafari *et al.*, 2007). Otra explicación podría ser una tasa de secado rápido de pequeñas gotas atomizadas que resultarían en una rápida formación de la membrana

semipermeable alrededor de las mismas y por lo tanto menos lixiviación de los materiales del núcleo dentro de las gotas. De hecho, gotas más pequeñas se someten a mayores transferencias de masa y calor durante la atomización dentro de la cámara de secado, formándose más rápido en comparación con las gotas atomizadas de mayor tamaño (Jafari *et al.*, 2007). Siguiendo con la actividad antioxidante total, existe una similitud en el comportamiento de las nanocápsulas con respecto a las microcápsulas, siendo ligeramente mayor la actividad antioxidante en las segundas (Tabla 3). Es importante mencionar que para poder desarrollar estas pruebas fue necesario romper las cápsulas, extrayendo los compuestos bioactivos con acetona, Meyer *et al.*, (1998) mencionan que la actividad antioxidante también depende del tipo y de la polaridad del disolvente de extracción, los procedimientos de aislamiento y pureza de los compuestos activos, así como las técnicas de ensayo y sustrato usado. Tomando en cuenta lo anterior, se concluye que la acetona es un disolvente de polaridad media que extrae en gran medida los carotenos, liberándolos de las cápsulas, pudiendo así conocer dicha actividad.

Por último el rendimiento de carotenos, como era de esperarse al haber mayor concentración de carotenos en las nano con respecto a las micro, debía suponerse que el rendimiento también fuera mayor en las nano. De acuerdo con Jafari *et al.* (2007) ellos describen que las partículas más pequeñas retienen un mayor contenido de material de núcleo que las partículas grandes, ya que tendrán velocidades de secado más altas y la pérdida de material núcleo podría ser limitada debido a la rápida formación de una membrana semipermeable. Además, si el tamaño de partícula en cada emulsión es diferente, mayor es la diferencia entre el tamaño de emulsión y mayor la capacidad de las partículas para encerrar más gotas de aceite y, por tanto, una mayor retención (Jafari *et al.*, 2007). Lo anterior explica la diferencia en el rendimiento de dichas cápsulas.

**Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas de las nanocápsulas de oleoresina de paprika.**

<b>Propiedad</b>	<b>Nano</b>
<b>a<sub>w</sub></b>	0.01 ± 0.01
<b>Solubilidad (%)</b>	9.88
<b>Color</b>	
<b>L</b>	92.20 ± 0.17
<b>a</b>	0.06 ± 0.16
<b>b</b>	13.74 ± 0.27
<b>Angulo matiz (°)</b>	13.75 ± 0.26
<b>Croma</b>	87.37 ± 0.75
<b>Índice de yodo g/100 g de grasa</b>	32.80 ± 3.02
<b>Carotenos totales (µg/mL)</b>	71400 ± 0.01
<b>Actividad antioxidante total (%)</b>	78.26 ± 0.01
<b>Rendimiento (%)</b>	63.46

Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones ± la desviación estándar

#### **8.3.4 Propiedades de flujo de las nanocápsulas de oleoresina de paprika con maltodextrina.**

En las nanocápsulas también se determinaron las propiedades de flujo, que como ya se mencionó anteriormente proporcionan una idea del comportamiento de un polvo. Los resultados se muestran en las Tablas 4 y 7 (microcápsulas y nanocápsulas respectivamente). De acuerdo al análisis estadístico realizado no existen diferencias significativas entre las microcápsulas y las nanocápsulas en relación con la densidad aparente por lo que ambas se comportan de igual manera en este parámetro. En cuanto a la densidad compacta según el estudio estadístico se encontraron diferencias significativas con una ( $P \leq 0.001$ ) por lo que entre las micro y nanocápsulas el nivel de compactación es diferente, ya que las partículas son más pequeñas en las nano y por lo tanto tienden a compactarse mejor. Otra propiedad evaluada fue ángulo estático de reposo que determina de manera simple

el comportamiento de polvos o gránulos durante el flujo. Los polvos que exhiben ángulos de reposo menores que  $40^\circ$ , generalmente presentan propiedades de flujo libre, mientras que ángulos arriba de  $50^\circ$  indican cohesividades o problemas de flujo (Bhandari *et al.*, 1998). Los resultados obtenidos en estas cápsulas fueron para micro de:  $28.89^\circ \pm 2.02$  y  $24.70^\circ \pm 0.57$  en nano, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellas ( $P = 0.124$ ) por lo que de acuerdo con dicho autor, ninguna presenta problemas de flujo.

El siguiente parámetro es la compresibilidad la cual indica la disminución del volumen de los cuerpos cuando son sometidos a una presión o compresión determinada. En esta prueba tampoco se observaron diferencias significativas entre las micro y nanocápsulas ( $P = 0.152$ ), obteniéndose para las primera un valor de  $27.36 \pm 3.23$  y para las segundas de  $29.56 \pm 0.58$ . De acuerdo con Aulton, (2004) quien describió que un porcentaje de compresibilidad del 40% es descripción de un flujo muy malo, estas cápsulas presenten propiedades de buena fluidez.

Por último, el índice de Hausner el cual predice de manera simple y rápida las propiedades de flujo de un polvo (Wallace *et al.*, 1983). De igual manera que la anterior en esta propiedad no hubo diferencias significativas ( $P = 0.151$ ), obteniéndose en las micro  $1.37 \pm 0.06$  y en las nano  $1.34 \pm 0.12$  y de acuerdo con los criterios propuestos por Carr (1965) para esta propiedad en el cual menciona que un valor de 1- 1.3 va de excelente a aceptable y un valor de 1.3 -  $>1.6$  van de malo a extremadamente malo. Las cápsulas tuvieron un comportamiento similar entre ellas y se encuentran en el rango de aceptable. Analizando todas las propiedades de flujo se observa que el comportamiento de la maltodextrina no cambia en ninguna de las dos técnicas.

**Tabla 7. Propiedades de flujo de las nanocápsulas de oleorresina de paprika con maltodextrina.**

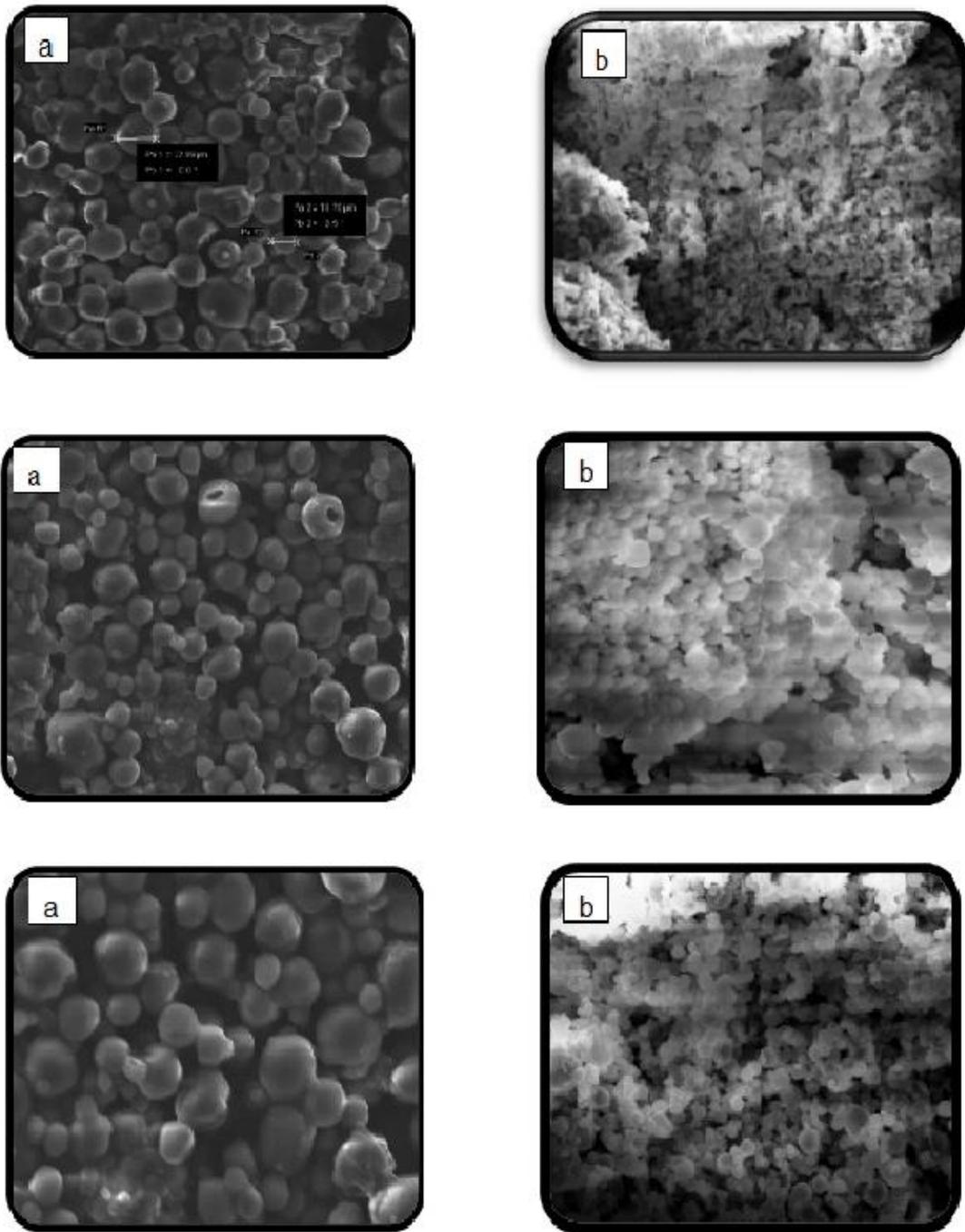
<b>Propiedad</b>	<b>Nano</b>
<b>Densidad a granel (g/cm<sup>3</sup>)</b>	0.24 ± 0.00
<b>Densidad Compacta (g/cm<sup>3</sup>)</b>	0.33 ± 0.02
<b>Angulo de Reposo (°)</b>	24.70 ± 0.57
<b>Compresibilidad (%)</b>	29.56 ± 0.58
<b>Índice de Hausner</b>	1.34 ± 0.12

Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones ± la desviación estándar

### **9. Microestructura de las microcápsulas y nanocápsulas de oleorresina de paprika.**

En la microencapsulación, la protección ofrecida por el material de pared y las propiedades de flujo de las microcápsulas dependen de la microestructura interior y exterior de la cápsula y en como el material de pared está organizado en las microcápsulas. Estos factores son estudiados detalladamente mediante microscopía electrónica de barrido (Rosenberg *et al.*, 1985). Las cápsulas fueron almacenadas y equilibradas a cero de actividad de agua durante 20 días a 25 °C. La Figura 4 y Anexo 5 muestran la morfología y la superficie de las microcápsulas y nanocápsulas respectivamente, que fueron evaluadas con imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (MEB). En ambas cápsulas se observan partículas con forma esférica y con superficies lisas, solo en algunas microcápsulas se nota una pequeña hendidura en el centro de estas, mientras que en las nanocápsulas no se presenta dicho fenómeno. Las superficies lisas mostradas en ambas cápsulas podrían atribuirse a la composición de azúcar presente, debido a que la maltodextrina utilizada en este estudio estaba conformada con equivalentes de dextrosa 10, por lo tanto, consistía en una mayor cantidad de azúcar de bajo peso molecular (Loksuwan, 2007). Dicho autor menciona que los azúcares de bajo

peso molecular pueden actuar como un plastificante en la prevención de contracción de la superficie durante el secado. De acuerdo con Zhang *et al.* (2000) un plastificante es importante para la formación de microcápsulas esféricas con superficie lisa. Una cápsula con forma esférica y superficie lisa, es deseable para la estabilidad del ingrediente encapsulado ya que controla su liberación y facilita su solubilidad, estas propiedades mejoran la efectividad de los aditivos alimentarios al ser incorporados en diferentes matrices complejas (Gil-Garzón *et al.*, 2011).



**Figura. 3** Microestructura de las micro (a) y nanocápsulas (b) respectivamente en actividad de agua 0.000 estables a una temperatura de 25°C durante 20 días en Pentóxido.

## 9.1 Análisis de Imagen

La microscopía o análisis de imágenes automatizado es la única técnica que puede describir el tamaño de partícula usando varios valores para partículas con relaciones de aspecto más grandes como se describe también por Gómez y Cremades, (2001). Un sistema de análisis de imágenes como ImageJ es capaz de describir la partícula no esférica usando los diámetros mayor y menor, perímetro, área proyectada, o también por el equivalente diámetro esférico. La medición de los tamaños de partícula varía en complejidad dependiendo de la forma de la partícula, y el número de partículas caracterizado debe ser suficiente para garantizar un nivel aceptable de incertidumbre en los parámetros medidos. Para partículas esféricas, el tamaño se define por el diámetro, para partículas irregulares, existe una variedad de definiciones de tamaño de partícula.

En este trabajo las medidas estándar incorporadas de ImageJ tales como el diámetro de un círculo de igual zona de proyección, el diámetro de Feret y el diámetro mínimo de Feret se eligieron también. Los diámetros de un círculo de igual área de proyección (DEC) es el diámetro de un círculo que tiene la misma área que el área de proyección de la partícula. El diámetro de Feret (DF) es la distancia más larga entre dos puntos a lo largo del límite de selección, también conocida como máximo pinza. El diámetro mínimo de Feret (Min DF) es el diámetro de Feret mínimo calculado a consecuencia de decisiones de todas las orientaciones posibles (0°-180°) (Mazzoli y Favoni, 2012).

El análisis de Imagen se realizó con un total de 10 cápsulas en cada caso. La Tabla 8 muestra los parámetros medidos, observándose que en promedio los parámetros de área y perímetro evaluados indican que el tamaño de una microcápsula es mayor en relación con el tamaño de una nanocápsula. La circularidad fue mayor para las nano, siendo éstas de forma más redonda o circular ya que en dicho software valores cercanos a 1 indican un círculo perfecto. Como ya se mencionó anteriormente el Feret indica la distancia más larga entre dos puntos a lo largo del límite de selección, y el mini Feret la distancia más corta entre dos puntos, es decir

mide el diámetro máximo y mínimo de las cápsulas, mostrando nuevamente que una microcápsula posee un tamaño mayor al de una nanocápsula. Con este análisis se obtuvo el tamaño real de las cápsulas estudiadas.

**Tabla 8. Análisis de Imagen de las microcápsulas y nanocápsulas de oleorresina de paprika.**

<b>Cápsulas/ parámetro</b>	<b>Área (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Perímetro (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Circularidad</b>	<b>Feret (in)</b>	<b>Mini. Feret (in)</b>
<b>Micro</b>	197.79 $\pm$ 69.43	52.37 $\pm$ 9.39	0.88 $\pm$ 0.07	16.91 $\pm$ 3.06	15.02 $\pm$ 2.82
<b>Nano</b>	4.19 $\pm$ 0.26	7.63 $\pm$ 0.28	0.90 $\pm$ 0.02	2.60 $\pm$ 0.11	2.22 $\pm$ 0.08

Los datos representan el promedio de 10 partículas analizadas  $\pm$  la desviación estándar.

## 10. Almacenamiento

El almacenamiento de las cápsulas se llevó a cabo durante 30 días a tres  $a_w$  (0.318, 0.515 y 0.743) y tres temperaturas (25 °C, 35 °C y 45 °C), evaluándose en ellas carotenos totales, actividad antioxidante total e índice de yodo en los días 15 y 30.

La Tabla 9 muestra el contenido de carotenos durante el almacenamiento en las cápsulas. A 25 °C se observa que en las tres actividades de agua para las nanocápsulas del día 15 al 30 los carotenos comienzan a degradarse teniendo una concentración de  $49351.50 \pm 1.52$  a  $30655.00 \pm 0.06$   $\mu\text{g/mL}$  en  $a_w$  0.318, de  $55930.00 \pm 1.84$  a  $31224.50 \pm 0.04$  en  $a_w$  0.515 y de  $40927.00 \pm 0.07 \pm 1.84$  a  $10027.50 \pm 0.49$   $\mu\text{g/mL}$  en  $a_w$  0.743, habiendo menor degradación en  $a_w$  0.515. Por el contrario en las microcápsulas, las tres actividades de agua muestran un aumento en la concentración de los compuestos del día 15 al 30, obteniendo la mayor cuantificación en  $a_w$  0.743 con  $11161.00 \pm 0.55$   $\mu\text{g/mL}$  al día 30, aunque esta concentración es menor que la observada en las nanocápsulas. A temperatura de 35 °C las nanocápsulas también aumentaron su contenido de carotenos del día 15 al 30, en actividades de agua de 0.318 y 0.743 siendo esta última con  $20058.00 \pm 2.45$  a  $21004.50 \pm 2.30$   $\mu\text{g/mL}$ , la que tuvo mayor concentración. En las microcápsulas la concentración disminuyó en las tres actividades de agua, siendo la más alta en  $a_w$  0.515 con  $40131.00 \pm 0.15$  en el día 15.

El contenido de carotenos en las nanocápsulas en temperaturas de 25 °C y 35 °C en actividades de agua de 0.318 y 0.743 en los días evaluados, puede deberse a que las partículas comienzan a desordenarse llegando al fenómeno de coalescencia (cápsulas colapsadas), esto provoca que la cápsula se vuelva incapaz de mantener su integridad estructural, llegando a la disolución gradual de la pared y la degradación de los compuestos (Díaz *et al.*, 2015), en las microcápsulas se observa este mismo comportamiento a 35 °C y en ambas actividades de agua, por el contrario a 25 °C es posible que debido a la suficiente agua absorbida por las microcápsulas forman una masa pastosa, que actúa como un núcleo de carcasa en

la cápsula que protegen a los carotenos evitando su degradación (Beristain *et al.*, 2002). Con respecto a la  $a_w$  0.515 esto no ocurre, ya que las cápsulas no llegaron a dicho fenómeno, manteniendo su estructura intacta (polvo fluido). Por otro lado el aumento en el contenido de carotenos puede deberse a que en el proceso de degradación de los carotenos por oxidación se generan reacciones de epoxidación, formación de apocarotenoides (carotenoides de menos de 40 átomos de carbono) e hidroxilación, obteniéndose finalmente compuestos de bajo peso molecular similares a los que aparecen como consecuencia de la oxidación de ácidos grasos (Meléndez *et al.*, 2004; Rodríguez, 1999), incrementándose así el contenido total de dichos compuestos. Otra posible explicación es la generación de reacciones de isomerización, formándose isómeros cis y trans por efecto de la temperatura y la luz, teniendo un aumento en el contenido de carotenos (Chen *et al.*, 1994). Lo anterior podría explicar el comportamiento observado tanto en las nanocápsulas como en las microcápsulas a 25 °C.

El comportamiento de los compuestos encapsulados a 45 °C también varió en cada  $a_w$  observándose para las nanocápsulas, que en actividades de agua de 0.515 y 0.743 el contenido de carotenos aumentó del día 15 al 30 siendo mayor en  $a_w$  de 0.743 con  $21595.50 \pm 2.66$  a  $36396.50 \pm 0.14$   $\mu\text{g/mL}$  respectivamente, en las microcápsulas sucedió lo mismo, en dichas actividades de agua y en ambos días la concentración de compuestos aumentó, obteniendo mejores resultados nuevamente en  $a_w$  0.743 con  $5115.66 \pm 0.36$  y  $5574.33 \pm 0.20$   $\mu\text{g/mL}$ , este incremento pudo ser ocasionado como ya se mencionó antes por la formación de isómeros debido al incremento de temperatura. Con respecto a la  $a_w$  0.318 el comportamiento en ambas en micro y nanocápsulas fue el mismo ya que al día 30 se observó una degradación en los compuestos. De acuerdo al análisis estadístico realizado no se encontraron diferencias significativas ( $P = 0.224$ ) entre las tres actividades de agua, entre las tres temperaturas y entre las muestras (micro y nanocápsulas) evaluadas hasta el día 15, sin embargo, en el día 30 hubieron diferencias significativas ( $P=0.039$ ) entre los parámetros mencionados.

Los resultados obtenidos en el almacenamiento muestran la protección conferida por las microcápsulas y nanocápsulas en las condiciones a las que fueron expuestas, encontrándose que estos factores alteran la estabilidad de los carotenos de manera distinta. Las nanocápsulas mostraron su mayor estabilidad a 25 °C en actividad de agua de 0.515 y, a temperaturas de 35 °C y 45 °C en actividad de agua de 0.743 hasta el día 30. En las microcápsulas la mayor estabilidad se presentó en el día 15 en actividades de agua de 0.318 y 0.515 a temperaturas de 35 °C y 45 °C, sin embargo a 25 °C su mayor estabilidad se mostró en  $a_w$  0.743 en el día 30. Los comportamientos mostrados entre las micro y nanocápsulas pueden ser ocasionados debido al grado de oxidación originado por las condiciones del almacenamiento, Jarén *et al.* (1999), describieron que la tasa de degradación disminuye con el grado de oxigenación, lo que permite una mayor deslocalización de los electrones y, por consiguiente una mejor capacidad para superar la oxidación.

**Tabla 9. Evaluación de Carotenos Totales en las nano y microcápsulas en tres temperaturas y tres  $a_w$  en 15 y 30 días. Los resultados son expresados en  $\mu\text{g/mL}$  de carotenos.**

Temperatura/ $a_w$	Nano		Micro	
	15	30	15	30
<b>25 °C</b>				
<b>Día</b>				
<b>0.318</b>	49351.50 $\pm$ 1.52	30655.00 $\pm$ 0.06	2490.66 $\pm$ 0.13	25672.00 $\pm$ 2.40
<b>0.515</b>	55930.00 $\pm$ 1.84	31224.50 $\pm$ 0.04	3069.66 $\pm$ 0.06	6790.00 $\pm$ 0.63
<b>0.743</b>	40927.00 $\pm$ 0.07	10027.50 $\pm$ 0.49	2478.00 $\pm$ 0.10	11161.00 $\pm$ 0.55
<b>35 °C</b>				
<b>0.318</b>	19502.50 $\pm$ 0.17	22867.00 $\pm$ 0.42	14731.50 $\pm$ 1.11	5735.00 $\pm$ 0.00
<b>0.515</b>	16569.05 $\pm$ 2.26	12984.50 $\pm$ 0.56	40131.00 $\pm$ 0.15	454.33 $\pm$ 0.03
<b>0.743</b>	20058.00 $\pm$ 2.45	21004.50 $\pm$ 2.30	14778.66 $\pm$ 0.37	2755.33 $\pm$ 0.02
<b>45 °C</b>				
<b>0.318</b>	44607.50 $\pm$ 0.19	22084.00 $\pm$ 1.03	10289.33 $\pm$ 0.82	3929.00 $\pm$ 0.10
<b>0.515</b>	8587.00 $\pm$ 0.12	22625.50 $\pm$ 1.48	2630.50 $\pm$ 0.06	3204.33 $\pm$ 0.14
<b>0.743</b>	21595.50 $\pm$ 2.66	36396.50 $\pm$ 0.14	5115.66 $\pm$ 0.36	5574.33 $\pm$ 0.20

Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones  $\pm$  la desviación estándar

Siguiendo con la actividad antioxidante total, la Tabla 10 muestra los resultados obtenidos durante el almacenamiento en las cápsulas. Al comparar estos valores con los obtenidos en la cuantificación de carotenos (Tabla 9) se observa que existe una correlación entre estos dos parámetros, ya que el comportamiento fue directamente proporcional, por lo que, al haber una menor degradación de carotenos, la actividad antioxidante aumentaba. Abbeddou *et al.* (2013) explicaron que los productos de degradación de los carotenoides están implicados en el desarrollo eficaz de la capacidad antioxidante de las oleorresinas.

A 25 °C las nanocápsulas en actividades de agua de 0.515 y 0.743 aumentaron su actividad antioxidante del día 15 al día 30 obteniendo valores de  $34.42 \pm 1.13$  a  $51.56 \pm 1.64\%$  y  $33.82 \pm 4.27$  a  $37.30 \pm 13.93\%$  respectivamente, mientras que en  $a_w$  0.318 ocurre lo contrario del día 15 al 30 dicha actividad disminuye de  $36.15 \pm 0.30$  a  $31.45 \pm 1.79\%$ . En las microcápsulas se observó un comportamiento diferente, ya que en actividades de agua de 0.318 y 0.743 dicha actividad aumentó, siendo esta de  $34.746 \pm 2.49$  a  $45.55 \pm 1.15\%$  en  $a_w$  0.318 y de  $31.36 \pm 0.60$  a  $32.23 \pm 3.06\%$  en  $a_w$  0.743, sin embargo, en actividad de agua 0.515 disminuyó de  $45.04 \pm 0.93$  a  $39.18 \pm 13.13\%$  del día 15 al 30.

A 35 °C las nanocápsulas aumentaron su actividad antioxidante en las tres actividades de agua en los días evaluados, siendo la  $a_w$  0.515 en donde se encontró la máxima actividad antioxidante con valores de  $38.53 \pm 5.61$  a  $42.23 \pm 13.49\%$ . Por el contrario, en las microcápsulas en actividades de agua de 0.318 y 0.743 la actividad antioxidante aumentó del día 15 al 30, siendo la más alta de  $26.00 \pm 0.54$  a  $40.22 \pm 2.51\%$  en  $a_w$  0.743, mientras que en  $a_w$  0.515 la actividad antioxidante disminuyó de  $39.93 \pm 1.51$  a  $36.58 \pm 2.60\%$ . En la temperatura de 45 °C se observa que de igual manera que la temperatura anterior, las nanocápsulas aumentaron su actividad antioxidante en las tres actividades de agua del día 15 al día 30, encontrándose la mayor actividad antioxidante en  $a_w$  0.743 con  $36.25 \pm 0.35$  a  $48.50 \pm 0.71\%$ .

En cuanto a las microcápsulas se observa que en actividades de agua de 0.318 y 0.515, la actividad antioxidante disminuye, por el contrario en  $a_w$  0.743 aumentó siendo a su vez la más alta con  $36.88 \pm 1.21$  a  $45.98 \pm 4.88\%$  del día 15 al 30 respectivamente. De manera general se puede observar en la tabla que, de las tres temperaturas evaluadas, la de 45 °C fue en donde se encontraron los valores de actividad antioxidante más altos en las tres actividades de agua en comparación con las temperaturas de 25 °C y 35 °C. El análisis estadístico realizado mostró diferencias significativas ( $P= 0.028$ ) entre las tres actividades de agua, entre las tres temperaturas y entre las muestras (micro y nanocápsulas) en el día 15, por el contrario hasta el día 30, no se encontraron diferencias significativas ( $P= 0.489$ ) en dichos parámetros.

Como es evidente el comportamiento de este parámetro también fue diferente en cada una de las condiciones expuestas, esto puede deberse a que los productos de degradación de los carotenoides responden de manera diferente, dependiendo de la clase de especies radicales con las que reaccionan, dando lugar a aumentos de capacidad antioxidante divergentes. Puesto que la estructura de los productos de degradación de los carotenoides producido en las oleorresinas, tras el tratamiento térmico, parece estar involucrado en la eficiencia de la capacidad antioxidante (Abbeddou *et al.*, 2013), otros autores como Pérez y Mínguez, (2004) explican que cuando se aplica un tratamiento térmico en las oleorresinas, se producen transformaciones y degradaciones de los carotenoides, lo que lleva a una modificación significativa en sus actividades antioxidantes.

**Tabla 10. Evaluación de la actividad antioxidante total en las nano y microcápsulas en tres temperaturas y tres  $a_w$  en 15 y 30 días. Los resultados son expresados en porcentaje de actividad antioxidante.**

Temperatura/ $a_w$		Nano		Micro	
25 °C	Día	15	30	15	30
	<b>0.318</b>	36.15 ± 0.30	31.45 ± 1.79	34.746 ± 2.49	45.55 ± 1.15
	<b>0.515</b>	34.42 ± 1.13	51.56 ± 1.64	45.04 ± 0.93	39.18 ± 13.13
	<b>0.743</b>	33.82 ± 4.27	37.30 ± 13.93	31.36 ± 0.60	32.23 ± 3.06
<b>35 °C</b>					
	<b>0.318</b>	33.45 ± 0.21	34.99 ± 9.20	29.42 ± 0.64	33.11 ± 1.40
	<b>0.515</b>	38.53 ± 5.61	42.23 ± 13.49	39.93 ± 1.51	36.58 ± 2.60
	<b>0.743</b>	29.07 ± 4.13	35.43 ± 3.88	26.00 ± 0.54	40.22 ± 2.51
<b>45 °C</b>					
	<b>0.318</b>	39.74 ± 11.44	46.07 ± 1.38	39.18 ± 1.67	38.21 ± 2.56
	<b>0.515</b>	33.60 ± 0.13	48.14 ± 7.85	49.86 ± 0.97	43.06 ± 2.83
	<b>0.743</b>	36.25 ± 0.35	48.50 ± 0.71	36.88 ± 1.21	45.98 ± 4.88

Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones ± la desviación estándar

Por último, la evaluación el índice de yodo en las cápsulas se muestra en la Tabla 11. Este parámetro fue diferente para cada actividad de agua y temperatura tanto en microcápsulas como en nanocápsulas, es decir, que a diferentes condiciones el grado de instauración de la oleorresina protegida por las cápsulas fue cambiando, observándose que a 25 °C en las nanocápsulas conforme aumentaba la  $a_w$  dicho índice también aumentaba, teniendo valores muy similares en actividades de agua de 0.515 y 0.743 siendo de  $76.24 \pm 3.76$  y  $75.67 \pm 5.04$  g/100 g de grasa para el día 15, mientras que en el día 30 fueron de  $37.29 \pm 0.55$  y  $34.6 \pm 1.71$  g/100 g de grasa, respectivamente, si bien se observa un decremento de este índice en el día 30 la

tendencia es la misma en ambos días. Por el contrario en las microcápsulas esta tendencia fue diferente ya que el mayor índice de yodo se obtuvo en  $a_w$  de 0.318 en el día 15 con  $80.71 \pm 3.79$  g/100 g de grasa y conforme aumentaba la  $a_w$ , este índice disminuía, en el día 30 también se observó un decremento, pero en actividades de agua de 0.515 y 0.743 se mantuvo siendo los valores muy similares entre ellos con  $33.74 \pm 1.97$  y  $33.05 \pm 2.14$  g/100 g de grasa respectivamente. Sin embargo, en  $a_w$  de 0.515 ambas cápsulas presentaron un índice de yodo alto y cercano entre ellas siendo de  $76.24 \pm 3.76$  en nanocápsulas y  $72.19 \pm 0.27$  en microcápsulas, en comparación con las otras actividades de agua, indicando que estas condiciones son favorables para evitar el mayor rompimiento de las instauraciones de los ácidos grasos de la oleorresina en presencia de halógenos (Harold, 1993).

En 35 °C se observa que conforme pasaban los días el índice de yodo aumentaba siendo mayor en los días 30 para ambas cápsulas en  $a_w$  de 0.318 con  $39.38 \pm 2.75$  y  $43.31 \pm 2.54$  g/100 g de grasa en nano y micro respectivamente. Por el contrario el menor índice se encontró en  $a_w$  de 0.743 con valores de  $26.55 \pm 5.36$  para nano y  $20.51 \pm 3.24$  g/100 g de grasa para micro. Encontrándose que en esta temperatura la condición más favorable para la estabilidad de dicho índice fue en la actividad de agua más baja.

Siguiendo con la temperatura de 45 °C se observa que en el día 15 ambas cápsulas presentaron valores de índice de yodo similares entre ellas, siendo el valor más alto en con  $39.03 \pm 1.60$  en  $a_w$  0.515 en las micro, en el día 30 se observa que en la  $a_w$  de 0.743 este índice disminuye de manera importante con valores de  $3.37 \pm 0.40$  y  $1.17 \pm 5$  g/100 g de grasa en nano y microcápsulas respectivamente, por lo que en la  $a_w$  y temperatura mencionadas las cápsulas no son capaces de proteger los dobles enlaces de los ácidos grasos presentes en la oleorresina. De acuerdo a lo descrito anteriormente las mejores condiciones para ambas cápsulas se encontraron a 25 °C y en una  $a_w$  de 0.515, dichos valores fueron más altos en comparación con el índice de yodo obtenido en las cápsulas después del secado (Tablas 3 y 6), esto indica que la MD tiene su máxima estabilidad de protección en

las instauraciones cuando se encuentra bajo estas condiciones. El análisis estadístico mostró que no existen diferencias significativas ( $P=0.659$ ) entre las tres actividades de agua, entre las tres temperaturas y entre las muestras (micro y nanocápsulas) hasta el día 15, de igual manera en el día 30 no se encontraron diferencias ( $P= 0.851$ ) en los parámetros antes mencionados.

**Tabla 11. Evaluación del índice de yodo en las nano y microcápsulas en tres temperaturas y tres  $a_w$  en 15 y 30 días. Los resultados son expresados en g/100 g de grasa.**

Temperatura/ $a_w$		Nano		Micro	
25 °C	Día	15	30	15	30
	<b>0.318</b>	66.38 ± 1.58	20.51 ± 7.94	80.71 ± 3.79	22.6 ± 5.97
	<b>0.515</b>	76.24 ± 3.76	37.29 ± 0.55	72.19 ± 0.27	33.74 ± 1.97
	<b>0.743</b>	75.67 ± 5.04	34.6 ± 1.71	62.40 ± 4.62	33.05 ± 2.14
<b>35 °C</b>					
	<b>0.318</b>	32.72 ± 0.19	39.38 ± 2.75	32.45 ± 0.69	43.31 ± 2.54
	<b>0.515</b>	37.61 ± 2.03	37.15 ± 9.30	36.15 ± 0.53	39.34 ± 1.98
	<b>0.743</b>	26.55 ± 5.36	38.90 ± 2.92	20.51 ± 3.24	37.86 ± 0.69
<b>45 °C</b>					
	<b>0.318</b>	24.04 ± 1.35	32.94 ± 3.11	34.7 ± 0.69	39.43 ± 0.84
	<b>0.515</b>	35.33 ± 1.03	34.97 ± 0.10	39.03 ± 1.60	13.54 ± 7.42
	<b>0.743</b>	30.89 ± 9.68	3.37 ± 0.40	34.35 ± 1.55	1.17 5.26

Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones ± la desviación estándar

## 11. CONCLUSIONES

Los parámetros fisicoquímicos determinados en la oleorresina de paprika, demostraron que es una matriz lipofílica con alto contenido de carotenoides.

Los biopolímeros utilizados en las emulsiones influyeron en el tamaño y distribución de las partículas. Siendo MD quien mostró un menor tamaño y mejor distribución en comparación con los otros dos.

Las propiedades fisicoquímicas determinadas en las microcápsulas en los tres materiales de pared tuvieron cambios en los resultados con respecto a la oleorresina de paprika, esto significa que cada biopolímero y de acuerdo a sus características le proporcionó diferentes propiedades fisicoquímicas y diferente nivel de protección a los compuestos bioactivos presentes.

Maltodextrina fue quien obtuvo la mejor fluidez en las propiedades de flujo determinadas en las microcápsulas en comparación con los otros dos biopolímeros.

El rendimiento de carotenos en las microcápsulas fue diferente para cada biopolímero, siendo MD la que retuvo en mayor medida a los compuestos bioactivos. Sin embargo la protección ofrecida entre CPS y PEC fue similar.

La MD fue el biopolímero seleccionado para la nanoencapsulación por presentar mejores propiedades fisicoquímicas y mejor rendimiento.

Las propiedades fisicoquímicas determinadas en las nanocápsulas fueron diferentes en comparación con las microcápsulas, obteniendo mejores resultados en cuanto a protección en las primeras.

Las propiedades de flujo determinadas en las nanocápsulas tuvieron un comportamiento muy parecido a las microcápsulas, por lo tanto la fluidez del biopolímero no se ve afectada en ambas técnicas.

El rendimiento de carotenos fue mayor en las nanocápsulas a diferencia de las microcápsulas, por lo que partículas más pequeñas retienen mayor material de núcleo a diferencia de partículas grandes.

La morfología y la superficie en ambas cápsulas mostraron partículas de forma esférica y con superficies lisas, dichas características son deseable para la estabilidad del ingrediente encapsulado.

El análisis de Imagen realizado mostró la diferencia de tamaño entre las microcápsulas y nanocápsulas, siendo más pequeñas las segundas.

La estabilidad durante el almacenamiento en las microcápsulas y nanocápsulas bajo las condiciones dadas, fue diferentes en cada una. La protección de los compuestos carotenoides en las nanocápsulas, obtuvieron su mayor estabilidad a 25 °C a una actividad de agua de 0.515, manteniendo su apariencia de polvo fluido, en comparación con las temperaturas a 35 °C y 45 °C que se encontraron a actividad de agua de 0.743 en un periodo de 30 días, con una apariencia de capsulas colapsadas. Mientras que en las microcápsulas la mayor estabilidad se presentó en el día 15 en actividades de agua de 0.318 y 0.515 a temperaturas de 35 °C y 45 °C, teniendo una apariencia de cápsulas colapsadas y polvo fluido bajo estas condiciones respectivamente. La temperatura de 25 °C mostró su mayor estabilidad en actividad de agua de 0.743 en el día 30 con una apariencia de cápsulas colapsadas. Siendo las nanocápsulas quienes conforme aumentaba la temperatura, actividad de agua y el tiempo, mostraron una menor degradación de carotenos.

La actividad antioxidante en el almacenamiento mostró tener una correlación con el contenido de carotenos, ya que el comportamiento fue directamente proporcional, por lo que, al haber una menor degradación de carotenos, la actividad antioxidante aumentaba. Fue a 45 °C en donde se encontraron los valores de actividad antioxidante más altos en las tres actividades de agua tanto en las nanocápsulas como en las microcápsulas, seguida de la temperatura de 25 °C y por último la de 35 °C.

El grado de instauración evaluado con el índice de yodo en las cápsulas durante el almacenamiento, mostró que las mejores condiciones se encontraron a 25 °C y en una actividad de agua 0.515, siendo estos parámetros en donde el rompimiento de los dobles enlaces se ve menos afectado, debido a que la estructura química de los carotenos aún se mantiene.

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que el tamaño de partícula es un factor importante en la protección y estabilidad de los compuestos bioactivos, ya que al ser más pequeñas estas evitan la degradación en un 23.38% en comparación con las partículas grandes. Resultando la nanoencapsulación como la mejor alternativa de protección de compuestos en comparación con la microencapsulación.

## 12. BIBLIOGRAFIA

1. **Abbeddou S, Petrakis C, Pérez Gálvez A. Kefalas P, Hornero Méndez D.** 2013. Effect of Simulated Thermo-Degradation on the Carotenoids, Tocopherols and Antioxidant Properties of Tomato and Paprika Oleoresins. *Journal of the America Oil Chemists Society.* 90:1697–1703.
2. **Abdullah MZ, Guan LC, Lim KC and Karim AA.** 2004. The applications of computer vision and tomographic radar imaging for assessing physical properties of food. *Journal of Food Engineering* 61: 125-135.
3. **Amin I, Marjan ZM, Foong CW.** 2004. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chemistry* 87, 581–586.
4. **Antonietti, M, and Landfeste, K.** 2002. Polyreactions in miniemulsions. *Progress in Polymer Science*, 27(4), 689–757.
5. **Anton N, Benoit JP, Saulnier P.** 2008. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates — a review, *Journal Control. Release* 128 185–199.
6. **Aardt M, Duncan S, Long T, Keefe S, Marcy J. and Susan S.** 2004. Effect of antioxidants oxidative stability of edible fast and oils: Thermogravimetric Analysis. *Journal. Agricultural Food.Chemistry.*, 52 pp.587-591.
7. **Aulton M.E.** 2004. *Translation of Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Desing.* España: Elsevier, 210.
8. **Araneda, C. y F. Valenzuela.** 2009. Microencapsulación de extractantes: una metodología alternativa de extracción de metales. *Revista Ciencia Ahora* 22(11): 9-19.
9. **ASTM B 212-89.** 1989. *Annual Book of ASTM Standards 02.05,* Editorial Staff, Philadelphia (USA).
10. **Avello, M y Suwalsky, M.** 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepc.)* No. 494.
11. **Avnesh K, Sudesh KY, Yogesh BP, Vineet K, Bikram S, Abha C and Subhash CY,** 2010. Nanoencapsulation and characterization of Albizia chinensis isolated antioxidant quercitrin on PLA nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 82: 224–232.

12. **Badui, S.** 1993. *Química de los Alimentos*. Alhambra Mexicana, México.
13. **Bae KE, and Lee SJ.** 2008. Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. *Journal of Microencapsulation*, 25(3), 549–560.
14. **Beristain CI, Garcia HS, Vernon-Carter EJ.** 2002. Effect of water activity on the stability to oxidation of spray-dried encapsulated orange peel oil using mesquite gum (*Prosopis juliflora*) as wall. *Journal Food Science*. 67(1):206–11.
15. **Bernardini E.** 1981. *Tecnología de Aceites y Grasas*. Alhambra, Madrid.
16. **Bhandari BR, Senoussi A, Dumoulin ED, and Lebert, A.** 1993. Spray drying of concentrated fruit juices. *Drying Technology*, 11 (9), 1081–1092.
17. **Biacs P, Czinkotai, B and Hoschke A.** 1992. Factors affecting stability of coloured substances in paprika. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 363–367.
18. **Biacs P, Daood HG, Huszka T and Biacs PK.** 1993. Carotenoid and carotenoid esters from new cross-cultivars of paprika. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1864–1867.
19. **Britton, G.** 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB Journal*, 9, 1551-1558.
20. **Britton G.** 1991. Carotenoids. In: Britton G, Editor. *Methods in Plant Biochemistry*. Academic Press, London, pp. 473-518.
21. **Bonilla ZE.** 2010. Análisis termodinámico de microencapsulados con diferentes biopolímeros obtenidos por secado por aspersión para establecer las condiciones de máxima estabilidad durante su almacenamiento. Universidad Autónoma Metropolitana. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Pp.15-18.
22. **Burapapadh K, Takeuchi H y Sriamornsak, P.** 2012. Novel pectin-based nanopar-ticles prepared from nanoemulsion templates for improving in-vitro dissolutionand in-vivo absorption of poorly water-soluble drug. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 82(2), 250–261.

23. **Bustamante A, Masson L, Velasco J, del Valle JM, Robert P.** 2015. Microencapsulation of *H. pluvialis* oleoresins with different fatty acid composition: Kinetic stability of astaxanthin and alpha-tocopherol. *Food Chemistry* 190 (2016) 1013–1021.
24. **Cai Y, y Corke H.** 2000. Production and Properties of Spray-dried *Amaranthus* Betacyanin Pigments. *Journal Of Food Science* 65 (6): 1248 - 1252.
25. **Campbell DR.** 1996. Plasma carotenoids as biomarkers of vegetable and fruit intake. *Dissertation Abstracts International*. B56 (10):5425.
26. **Cano-Chauca M, Stringheta L, Sardagna y J Cal-Vidal.** 2004. Mango juice dehydration spray drying using different carriers and functional characterization. *Proceedings of the 14th International Drying Symposium, São Paulo, Brazil.*
27. **Caparino O, Tang J, Nindo C, Sablani S, Powers J y Fellman J.** 2012. Effect of drying methods on the physical properties and microstructures of mango (*Philippine Carabao var.*) powder. *Journal of Food Engineering* 111: 135–148.
28. **Carr RL.** Classifying flow properties of solids. *Chem Eng.* 1965a; 72 (2) 69-
29. **Carr RL.** Evaluating flow properties of solids. *Chem Eng.* 1965b; 72 (1): 163-168.
30. **Chang C, Wang, ZC, Quan, CY, Cheng H, Cheng S X., Zhang, X Z.** 2007. Fabrication of a novel pH sensitive glutaraldehyde cross-linked pectin nanogel for drug delivery. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 18, 1591-1599.
31. **Chen BH, Chen TM, Chien JT.** 1994. Kinetic model for studying the isomerization of a- and b-carotene during heating and illumination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 42: 2391-2397.
32. **Chranioti C, Tzia C.** 2013. Binary mixtures of modified starch, maltodextrin and chitosan as efficient encapsulating agents of fennel oleoresin; . *Food Bioprocess Technology* 6:3238–46.

33. **Chronakis, IS.** 1998. On the molecular characteristics, compositional properties, and structural-functional mechanisms of maltodextrins: A review. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, (7) 599–637.
34. **Coupland, J.N, Zhu Z, Wan H, McClements DJ, Nawar, WW and Chinachoti, P.** 1996. Droplet composition affects the rate of oxidation of emulsified ethyl linoleate. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 73, 795–801.
35. **Crosbie GB.** 1991. The relationship between starch swelling properties, paste viscosity and boiled noodle quality in wheat flours . *Journal of Cereal Science*, 13: 145-150.
36. **Daood, HG, Kapitany J, Biacs, P, and Albrecht K.** 2006. Drying temperature, endogenous antioxidants and capsaicinoids affect carotenoid stability in paprika (red pepper spice). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2450–2457.
37. **Daood HG.** 2009. Analytical and technological aspects of bioactive compounds in spice red pepper. *Acta Alimentaria*, 38, 87–97.
38. **Díaz DI, Beristain CI, Azuara E, Luna G, Jiménez M.** 2015. Effect of wall material on the antioxidant activity and physicochemical properties of *Rubus fruticosus* juice microcapsules. *Journal of Microencapsulation*.
39. **Delgado OL, Betanzos CG, Suyama MT.** 2010. Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investigación y Ciencia*. 50, pp. 10-15.
40. **Delgado VF and Paredo LO.** 2003. Natural colorants for food and nutraceutical uses. Boca Raton, Fla: RCR Press, 257–305.
41. **Delmoro J, Muñoz D, Nadal V, Clementz A, Pranzetti V.** 2010. El color en los alimentos: Determinación de color en mieles. *Invenio*, vol. 13, núm. 25. Argentina. pp. 145-152.
42. **Donsí, F., Annunziata, M., Sessa, M., y Ferrari, G.** 2011. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT e Food Science and Technology*, 44, 1908-1914.

43. **Drewnowski A, Rock CL, Henderson SA, Shore AB, Fischler C, Galan P.** 1997. Serum  $\beta$ -carotene and vitamin C as biomarkers of vegetable and fruit intakes in a community-based sample of French adults. *American Journal of Clinical Nutrition.*; 65(6):1796-1802.
44. **Dutta, P., S. Tripathi, G. Mazutti and J. Dutta.** 2009. Review: Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Journal Food Chemistry* 114(4): 1173–1182.
45. **Dutta, R. K., and Sahu, S.** 2012. Development of a novel probe sonication assisted enhanced loading of 5-FU in SPION encapsulated pectin nanocarriers for magnetic targeted drug delivery system. *European Journal of pharmaceuticals and Biopharmaceutics*, 82-65.
46. **Dziezak D.J** 1988. Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technology*, 42-4. p.135-140, 142-143.
47. **Espinoza HN, Pedrosa IR, Vernon CEJ, Medina RCE, Santiago MI and Gaxiola CG.** 2002. Composite Wall microencapsulated diets (Whey protein concentrated- mezquite gum) for marine shrimp larvae. *World Aquaculture. Book of abstracts. Beijing, China*, 591.
48. **Ethirajan A, Schoeller K, Musyanovych A, Ziener U, and Landfester, K.** 2008. Syn-thesis and optimization of gelatin nanoparticles using the miniemulsion process. *Biomacromolecules*, 9(9), 2383–2389.
49. **Fabra, M., A. Hambleton, P. Talens, F. Debeaufort and A. Voilley.** 2009. Influence of interactions on water and aroma permeabilities of i-carrageenan–oleic acid–beeswax films used for flavour encapsulation. *Carbohydrate Polymers* 76(2): 325-332.
50. **Fathi, M., Mozafari, M. R., & Mohebbi, M.** 2012. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in Food Science and Technology*, 23, 13-27.
51. **Fathi, M., Varshosaz, J., Mohebbi, M., and Shahidi, F.** (2013). Hesperetin-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructure lipid carriers for food fortification: preparation, characterization, and modeling. *Food and Bioprocess Technology*, 6. 1464-1475.

52. **Fisher-Wellman, K. H., and Bloomer, R. J.** 2010. Lack of effect of a high-calorie dextrose or maltodextrin meal on postprandial oxidative stress in healthy young men. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 20, 393–400.
53. **Fuchs, M., C. Turchiuli, M. Bohin, M. Cuvelier, C. Ordonnaud, M. Peyrat and E. Dumoulin.** 2006. Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidized bed agglomeration. *Journal of Food Engineering* 75(1): 27-35.
54. **Gálvez A; Aravena E; Mondaca R.** 2006. Isotermas de Adsorción en Harina de Maíz. *Revista Ciencia y Tecnología de Alimentos, Campinas*, 26 (4): 821-827.
55. **Ge, X., Z. Wan, N. Song, A. Fan and R. Wu.** 2009. Efficient methods for the extraction and microencapsulation of red pigments from a hybrid rose. *Journal of Food Engineering* 94(1): 122–128.
56. **Geister H.** 1989. *Fleischwirtsch.* 69 (9), 1380-1382.
57. **Gil- Garzón M. A, Alzate-Tamayo L M, Sánchez- Camargo A. y Millán-Cardona L.** 2011. Secado por aspersión: una alternativa para la conservación de los compuestos bioactivos y aromáticos del extracto de ajo (*Allium sativum* L.) *Revista Lasallista de investigación*, 8 (2) 40-42.
58. **Giménez J, Romojaro F, Martínez F.** 1983. *Agricultura* 52 (612), 530-532.
59. **Gómez Yepes ME, Cremades LV.** 2011. Characterization of wood dust from furniture by scanning electron microscopy and energy-dispersive X-ray analysis, *Industrial Health* 49 492–500.
60. **Gonzaga F, and Celio P.** 2006. A new method for determination of the oxidative stability of edible oils at frying temperatures using near infrared emission spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 570, pp. 129-135.
61. **Govindarajan VS.** 1986. *Crit. Journal Food Science. Nutrition.* 23 (3), 207-288.
62. **Guillen Halliwell, B.** 1996 Antioxidants in humans health and disease, *Annual Reviews.* 16, 33-50.
63. **Harold E.** 1993. *Análisis químico de Alimentos de Pearson.* Edit. Compañía Editorial Continental.

64. **Hispan A.** 2004. Radicales libres, cáncer y antioxidantes. *Clínica Médica Vital*; 3:18-79.
65. **Hornero MD, and Mínguez MMI.** 2000. Xanthophyll esterification accompanying carotenoid overaccumulation in chromoplast of *Capsicum annum* ripening fruits is a constitutive process and useful for ripeness index. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1617–1622.
66. **Hornero MD and Mínguez MM. Isabel.** 2001. Rapid Spectrophotometric Determination of Red and Yellow Isochromic Carotenoid Fractions in Paprika and Red Pepper Oleoresins. *Journal. Agriculture. Food Chemistry.*, 49, 3584-3588.
67. **Jafari, S.M., He, Y.H., Bhandari, B.,** 2007. Role of powder particle size on the encapsulation efficiency of oils during spray drying. *Drying Technol.* 25 (4–6), 1081–1089.
68. **Jahanshahi M, Babaei Z.** 2008. Protein nanoparticle: a unique system as drug delivery vehicles. *Afr Journal Biotechnology*; 7:4926–34.
69. **Jarén GM, Pérez GA, Mínguez MMI.** 1999. Prediction of decoloration in paprika oleoresins. application to studies of stability in thermodynamically compensated systems. *Journal Agriculture Food Chemistry* 47:945–95.
70. **Jiang, S. P.** 2012. Nanoscale and nano-structured electrodes of solid oxide fuel cells by infiltration: Advances and challenges. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(1), 449–470.
71. **Jiménez FM. 2006.** Estudio de estabilidad oxidativa de microcápsulas de ácido linoléico conjugado (CLA) obtenidas por secado por aspersión. (Tesis doctoral). Instituto Tecnológico de Veracruz.
72. **Jittanit W, M Chantara-In T. Deying y W.** 2011. Ratanavong, Production of tamarind powder by drum dryer using maltodextrin and Arabic gum as adjuncts. *Songklanakarin Journal Science. Technology* 33 (1): 33-41.
73. **Jones, O G., and McClements, D J.** 2010. Functional biopolymer particles: design, fabrication, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 374-397.

74. **Kagami Y, Sugimura S, Fujjishima N, Matsuda K, Kometani T y Matsumura Y.** 2003. Oxidative stability, structure and physical characteristics of microcapsules formed by spray drying of fish oil with protein and dextrin wall materials. *Journal Food Science.* 68 (7) 224-2255.
75. **Kendig, M. D., Lin, C. S., Beilharz, J. E., Rooney, K. B., and Boakes, R. A.** 2014. Maltodextrin can produce similar metabolic and cognitive effects to those of sucrose in the rat. *Appetite*, 77, 1–12.
76. **Kertesz, Z.I.** 1951. "The Pectic Substances". Interscience. New York.
77. **Khayata N, Abdelwahed W. Chehna M. F, Charcosset C, and Fessi H.** 2012. Preparation of vitamin E loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method: from laboratory scale to large scale using a membrane contactor. *International Journal of Pharmaceutics*, 423, 419-427.
78. **Labuza, T P, Kaaname A y Chen Y.** 1985. Effect of temperature on the Moisture sorption isotherms and water activity shift of tow dehydrated Foods. *Journal. Food. Science.*, 50: 385-391.
79. **Larroza, I. and A. Zerlotti.** 2007. Encapsulation of Lycopene using spray-drying and molecular inclusion processes. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50(5): 893-900.
80. **Lee Y, OH S, Chang J and In Hwan K.** 2004. Chemical composition and oxidative stability of safflower oil prepared from safflower seed roasted with different temeperatures. *Food Chemistry.* 84. Pp. 1-6.
81. **Lees, R.** 1994. Análisis de los alimentos. Métodos Analíticos y de control de calidad. 3°. Ed. Aciribia; Zaragoza, España.
82. **Lima L.** 2001. Estrés oxidativo y antioxidantes: Actualidades sobre los antioxidantes en los alimentos. *Universidad de la Habana*; 12; 17-22.
83. **Li, B., L. Wang, D. Li, B. Bhandari, S. Jun, Y. Lan, X. Chen and Z. Mao.** 2009. Fabrication of starch-based microparticles by an emulsification-crosslinking method. *Journal of Food Engineering* 92(3): 250–254.
84. **Li X, Anton N, Apargaus C, Belleteix F, Vandamme TF.** 2010. Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. *Journal of Controlled Release* 147: 304–310.

85. **Lin CY, and Chen LW.** 2006. Emulsification characteristics of three- and two-phase emulsions prepared by the ultrasonic emulsification method. *Fuel Processing Technology*, 87(4), 309–317.
86. **Lobato, K. B. d. S., Paese, K., Forgearini, J. C., Guterres, S. S., Jablonski, A., and Rios, A. d. O.** 2013. Characterisation and stability evaluation of bixin nanocapsules. *Food Chemistry*, 141, 3906-3912.
87. **Lock Sing de Ugaz.** 1997. *Colorantes naturales*. Primera Edición. Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. Pp 45-46.
88. **Loksuwan J.** 2007. Characteristics of microencapsulated  $\beta$ -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native starch and maltodextrina. *Journal Food Hydrocolloid*; 21 (5-6): 928-935.
89. **Matalanis AM.** 2012. *Fabrication, characterization and utilization of filled hydrogel particles as food grade delivery systems*. Amherst: University of Massachusetts.
90. **Matalanis A, McClements DJ.** 2013. Hydrogel microspheres for encapsulation of lipophilic components: optimization of fabrication and performance. *Food Hydrocoll*; 31:15–25.
91. **Madene A, Jacquot M, Scher J, and Desobry S.** 2006. Flavour encapsulation and controlled release. *Int. Journal Food Science. Teach.* 41 (1) 5.
92. **Maoka T, Mochida K, Kuzoka M, Ito Y, Fujiwara Y, Hashimota, K.** 2001. Cancer chemopreventive activity of carotenoids in the fruits of red paprika *Capsicum annum* L. *Cancer Letters*, 172, 103–109.
93. **Mazzoli A, Favoni O.** 2012. Particle size, size distribution and morphological evaluation of airborne dust particles of diverse woods by Scanning Electron Microscopy and image processing program. *Powder Technology*. 225: 65–71.
94. **Meyer AS, Heinonen M, and Frankel EN.** 1998. Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chemistry*, 61, 71–75.

95. **Mínguez MMI, Jaren GM, and Garrido FJ.** 1992. Color Quality in Paprika. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 40: 2384-2388.
96. **Mohanraj VJ and Chen Y.** 2006. Nanoparticles A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5, 561-573.
97. **Nedovic V, Kalusevic A, Manojlovic V, Levic S, and Bugarski B.** 2011. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1: 1806-1815.
98. **Nieblas M, Burgueño M y Moreno L.** 2001. Índice de oxidación en aceites de algunas leguminosas del desierto sonorense. *Grasas y aceites*. 52.
99. **Ong ASH, and Tee ES.** 1992. Natural sources of carotenoids from plants and oils. In L. Packer (Ed.), *Methods in enzymology. Carotenoids* (pp. 142–167). San Diego, California, USA: Academic Press.
100. **Palzer, S.** 2009. Review: Food structures for nutrition, health and wellness. *Trends in Food Science and Technology* 20(5): 194-200.
101. **Parize A, T Rozone I Costa V, Fávere, M Laranjeira, A Spinelli and E Longo.** 2008. Microencapsulation of the natural urucum pigment with chitosan by spray drying in different solvents. *African Journal of Biotechnology* 7(17): 3107-3114.
102. **Pereira dos Santos P, Hickmann FS, Rios OA, Campos CR.** 2016. Biodegradable polymers as wall materials to the synthesis of bioactive compound nanocapsules. *Trends in Food Science & Technolog.* 30109-1.
103. **Pérez GA and Mínguez MMI.** 2001. Structure-reactivity relationship in the oxidation of carotenoid pigments of the pepper (*Capsicum annum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4864–4869.
104. **Pérez A, and Mínguez M I.** 2004. Degradation, under non-oxygen-mediated autooxidation, of carotenoid profile present in paprika oleoresins with lipid substrates of different fatty acid composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 632-637.
105. **Pérez GA, Jarén GM, Mínguez MMI.** 2005. Impact of the increased thermal processing on retinol equivalent values of paprika oleoresins. *Journal of Food Engineering* 71: 379–385.

106. **Pólit P.** 1992. Método de análisis de productos extruidos. Taller sobre extrusión de Alimentos, Quito-Ecuador.
107. **Purseglove J, Brown E, Oreen C. and Robbins S.** 1981. Spices, Vol I. Longman, London.
108. **Qureshi A, Kang, WP, Davidson, JL and Gurbuz, Y.** 2009. Review on carbon-derived, solid-state, micro and nano sensors for electrochemical sensing applications. *Diamond and Related Materials*, 18(12): 1401–1420.
109. **Rai, M., P. Asthana, S. Kant, V. Jaiswal and U. Jaiswal.** 2009. The encapsulation technology in fruit plants: A review. *Biotechnology Advances* 27(6): 671-679.
110. **Rascón Martha Paola, Beristain César I, García S Hugo, Salgado Marco A.** 2011. Carotenoid retention and storage stability of spray-dried encapsulated paprika oleoresin using gum Arabic and Soy protein isolate as wall materials. *Food Science and Technology* 44: 549-557.
111. **Ratnakar-Shripd T.** 2007. Microencapsulation of vitamin C and gallic acid in whey protein concentrate by spray and freeze drying- characterization and degradation kinetics. Georgia, Atenas. Universidad de Georgia.
112. **Ré M I.** 1998. Microencapsulation by spray–drying. *Drying Technology* 16: 1195–1236.
113. **Recknagel, RO, and Glende E. A. Jr.** 1984. Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. *Methods in Enzymology*, 105: 331–337.
114. **Richard J, Benoit JP.** 2000. Microencapsulation, *Techniques de l'ingénieur J 2* (210) pp. 1–20.
115. **Rodríguez Amaya D.** 1999. Changes in carotenoids during processing and storage of foods. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*; 49(1-S): 38-47.
116. **Rodríguez ADB.** 1999. Carotenoides y Preparación de alimentos: La retención de los carotenoides Provitamina A. Alimentos preparados, procesados y almacenados. OMNI Project, Brazil.
117. **Ronald L. Prior.** 2005. Standardized methods for the determination of Antioxidant Capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal Agriculture Food Chem.* 53, 4290-4302.

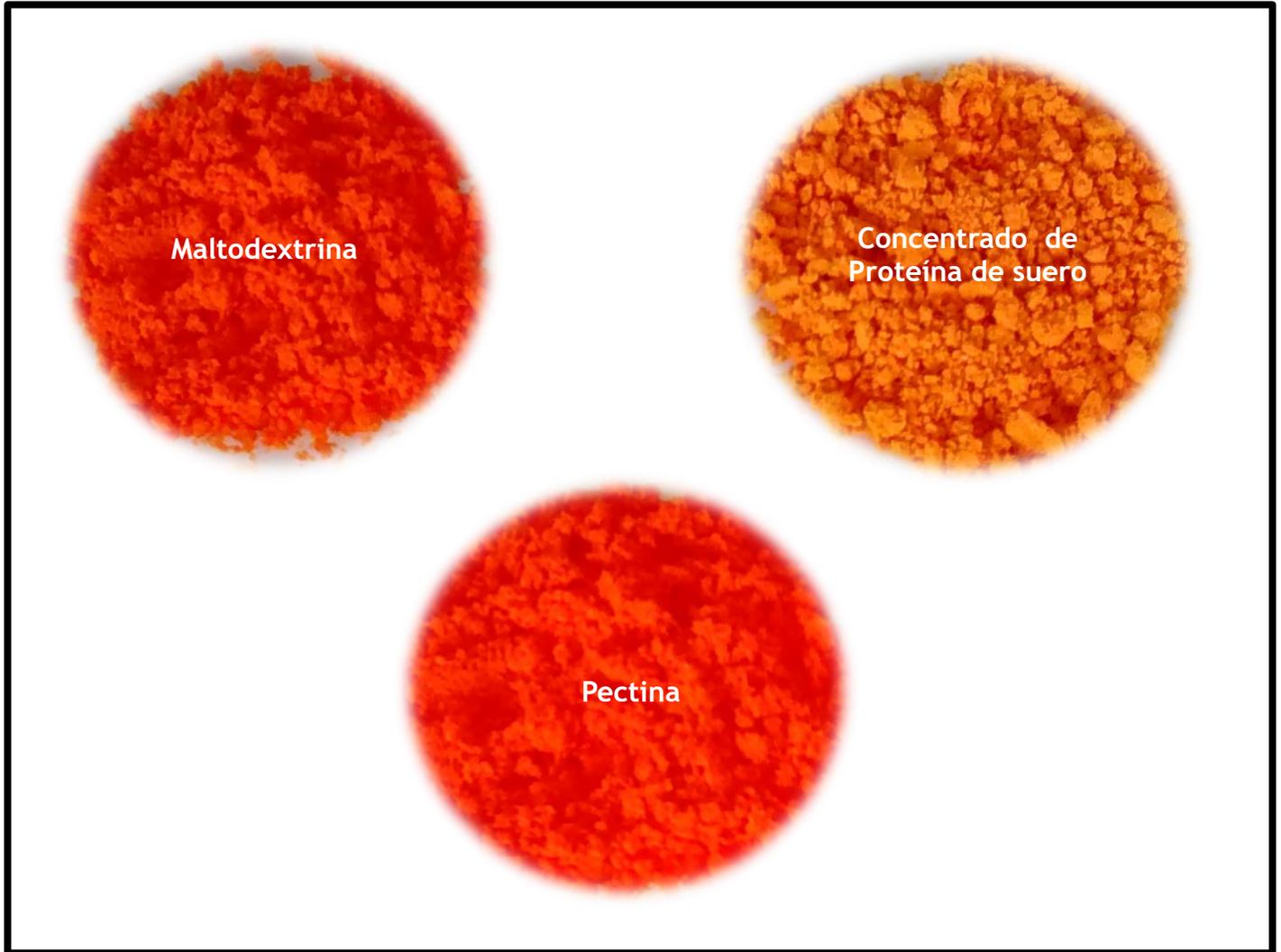
118. **Rosenberg MI, Kopelman J y Talmon Y.** 1985. A scanning electron microscopy study of microencapsulation. *Journal Food Science*. 50, 139-144.
119. **Rudnick E, Szczincinska, Gwardiak, Szulc A, and Winiarska A.** 2001. Comparative studies of oxidative stability of linseed oil. *Termochimica Acta*. 370. Pp. 135.140.
120. **Russel RM.** 2006. The multifunctional of carotenoids: Insights into their behaviour. *The Journal of Nutrition*, 136, 2690S–2692S.
121. **Sáiz Abajo, M J., González Ferrero, C., Moreno Ruiz, A., Romo Hualde, A., and González Navarro, C. J.** 2013. Thermal protection of  $\beta$ -carotene in re-assembled casein micelles during different processing technologies applied in food industry. *Food Chemistry*, 138(2-3): 1581-1587.
122. **Salmerón P, Romojaró F.** 1975. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* 15 (4), 560 - 572.
123. **Sánchez A, Flores CL, Langley E, Martin R, Maldonado G, Sánchez S.** 1999. Carotenoides: estructuras, función, biosíntesis, regulación y aplicaciones. *Revista Latino Americana de Microbiología*. 41: 175-91.
124. **Sansone F, Mencherini T Picerno, P, d'Amore M, Aquino, RP, and Lauro, MR.** 2011. Maltodextrin/pectin microparticles by spray drying gas carrier for nutraceutical extracts. *Journal of Food Engineering*, 105(2): 468–476.
125. **Shahidi F, Han XQ.** 1993. Encapsulation of Food Ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 33 (6): 501-47.
126. **Sharma R., Ahuja M, and Kaur H.** 2012. Thiolated pectin nanoparticles: preparation, characterization and ex vivo corneal permeation study. *Carbohydrate Polymers*, 87, 1606-1610.
127. **Shi AM, Li D, Wang LJ, Li, BZ, and Adhikari, B.** 2011. Preparation of starch-based nanoparticles through high-pressure homogenization and mini emulsion cross-linking: Influence of various process parameters on particle size and stability. *Carbohydrate Polymers*, 83(4): 1604–1610.
128. **Sinha, V. R., and Kumria, R.** 2001. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 224: 19-38.

129. **Singh R, Lillard J.** 2009. Nanoparticle-based targeted drug delivery, *Exp. Mol. Pathol.* 86: 215–223.
130. **Solans C, Esquena J, Forgiarini AM, Ulson N, Morales D, and Izquierdo P.** 2003. Absorption and aggregation of surfactants in solution. New York: Marcel Dekker.
131. **Sonia, TA., and Sharma, C. P.** 2012. An overview of natural polymers for oral insulin delivery. *Drug Discovery Today.* 17: 784-792.
132. **Sun-Waterhouse D, Wadhwa SS, Waterhouse GIN.** 2013 Spray-drying microencapsulation of polyphenol bioactives: a comparative study using different natural fibre polymers as encapsulants. *Food Bioprocess Technology*; 6:2376–88.
133. **Tiwari B, Mathukumarappan K, O'Donell, C y Cullen P.** 2008. Effects of sonication on the kinetics of orange juice quality parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 56 (7): 2423-28.
134. **Ulkowski M, Musialik M y Litwinienko G.** 2005 *J. Agr. Food Chem.* 53.
135. **VAN Duyn MA and Pivonka E.** 2000. Overview of the health benefits of fruit and vegetable consumption for the dietetics professional: Selected literature. *Journal of American Dietetics Association*, 110, 1511–1521.
136. **Vauthier C, Bouchemal K.** 2009. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles, *Pharm. Res.* 26 10025–11058.
137. **Velasco J, Marmesat S, Dobarganes C y Márquez-Ruiz G.** 2006 *Journal of agricultura and Food Chemistry.* 54, 1722.
138. **Velasco J, Andersen M and Leif S.** 2004. Evaluation of oxidative stability of vegetable oils by monitoring the tendency to radical formation. A comparison of electron spin resonance spectroscopy with the Rancimat method and differential scanning calorimetry. *Food Chemistry.* 85. Pp. 623-632.
139. **Venereo J.** 2002. Daño Oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes, *Rev Cub Med Mil*; 31(2):126- 133

140. **Wang S, Lin H.** 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and development stage. *Journal of agricultural and Food Chemistry*. 48:140-146.
141. **Wu, L., Zhang, J., and Watanabe, W.** 2011. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 456-469.
142. **Xie J., Lee S y Chen X.** 2010. Nanoparticle-based theranostic agents. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(11): 1064–1079.
143. **Xu J, Zhao W, Ning Y, Jin, Z, Xu, B, and Xu X.** 2012. Comparative study of springdextrin impact on amylose retrogradation. *Journal of Agricultural and Food Chem-istry*, 60: 4970–4976.
144. **Yeo Y, Baek N, and Park K.** 2001. Microencapsulation methods for delivery of protein drugs. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 6, 213-230.
145. **Yeum KJ, Taylor A, Tang G, Russell RM.** 1995. Measurement of carotenoids, retinoids and tocopherols in human lenses. *Invest Ophthalmol Vis.* 36: 2756- 2761.
146. **Young AJ, Lowe GM.** 2001. Antioxidant and Prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochem and Biophy.* 385(1): 20-7
147. **Yusop Salma M, O’Sullivan Maurice G, PreuB Matthias, Weber Hebert, Kerry John F, Kerry Joseph P.** 2011. Assessment of nanoparticle paprika oleoresin on marinating performance and sensory acceptance of poultry meat. *Food Science and Technology* 46:349-355.
148. **Yu, C Y, Cao, H Zhang, X C, Zhou, F Z, Cheng S.X, Zhang, X Z.** 2009. Hybrid nanospheres and vesicles based on pectin as drug carriers. *Langmuir.* 25: 11720-11726.
149. **Zhang ZY, Ping, Q N, and Xiao B.** 2000. Microencapsulation and characterization of tramadol–resin complexes. *Journal of Controlled Release*, 66, 107–113.
150. **Zilberboim, RIJ., Kopelman, Talmon, Y.** 1986. Microencapsulation by a dehydrating liquid: retention of paprika oleoresin and aromatic esters. *Journal Food Science* 51 (5): 1301-1306.

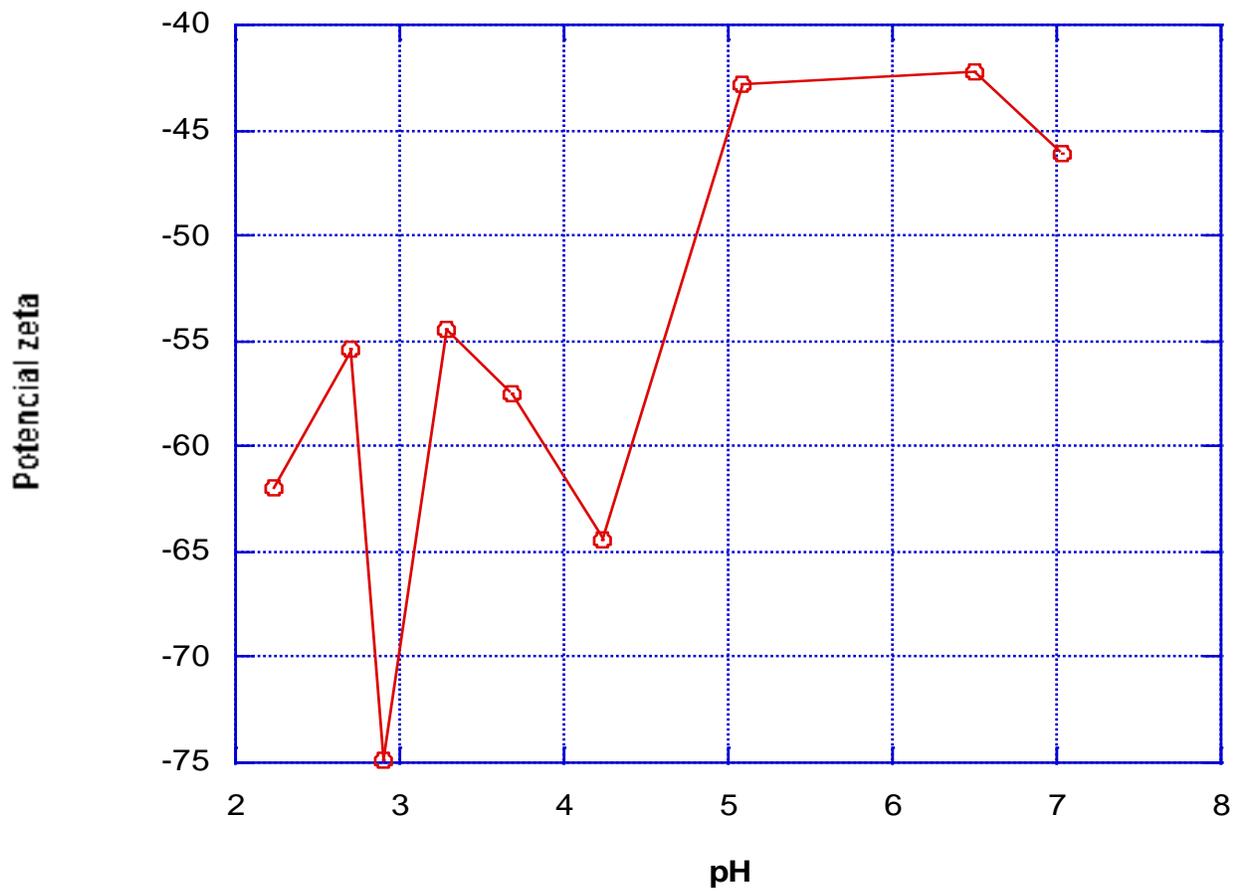
151. **Zorn H, Breithaupt DE, Takenburg M, Schwack W, and Berger RG.** 2003. Enzymatic hydrolysis of carotenoid esters of marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and red paprika (*Capsicum annuum* L.) by commercial lipases and *Pleurotus sapidus* extracellular lipase. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 623–628.
152. **Zumbado FH.** 2004. *Análisis químicos de los alimentos: Métodos clásicos*- Editorial Universitaria ISBN 978-959- 16-0253-4. Pág. 433.

**Anexo 1** Morfología macroscópica de las microcápsulas.



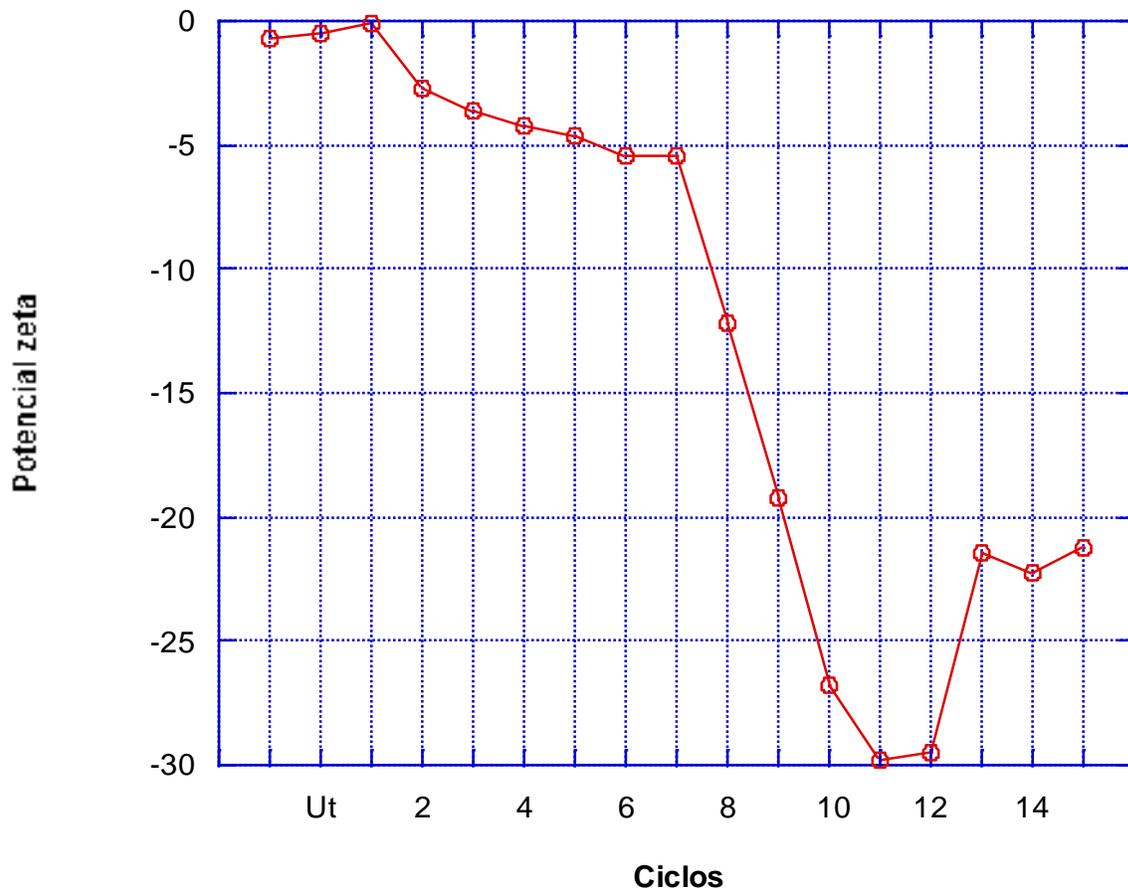
Microcápsulas obtenidas mediante secado por aspersión, utilizando tres diferentes biopolímeros.

## Anexo 2 Barrido de potencial zeta a diferentes pH



Gráfica que muestra el barrido de potencial zeta a diferentes pH.

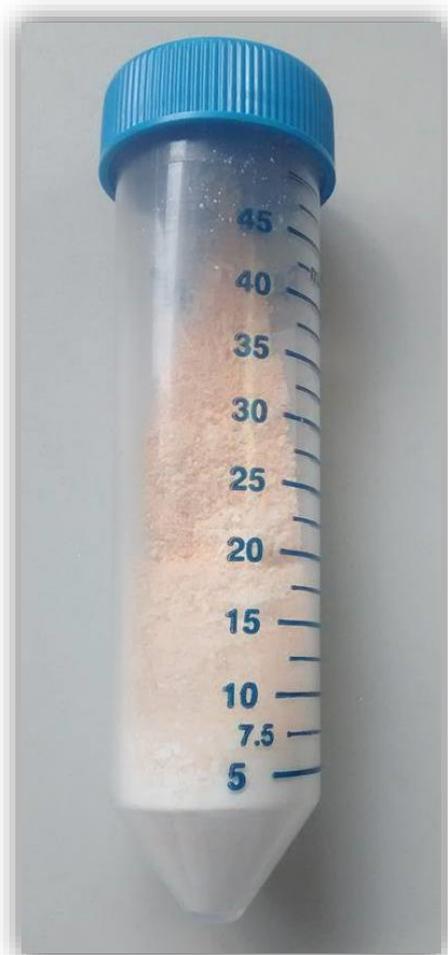
### Anexo 3 Potenciales zeta y los números de ciclos del microfluidizador.



Gráfica que muestra los potenciales zeta y los números de ciclos del microfluidizador tratados en la emulsión.

#### **Anexo 4 Nanocápsulas obtenidas mediante secado por aspersión.**

Nanocápsulas obtenidas mediante secado por aspersión, utilizando maltodextrina como material de pared.



## Anexo 5 Microestructura de las micro (a) y nanocápsulas (b).

Microestructura de las micro (a) y nanocápsulas (b) respectivamente en actividad de agua 0.000 estables a una temperatura de 25 °C durante 20 días en Pentóxido.

