

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN
TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO**

**ESTABILIDAD OXIDATIVA DE ÁCIDOS GRASOS
POLIINSATURADOS MICROENCAPSULADOS EN
MATRICES MULTICAPA**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO
ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA

OPCIÓN TERMINAL: PROCESOS AGROINDUSTRIALES

PRESENTA

Q.F.B. ROGELIO RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ

DIRECTOR

Dr. HUGO ESPINOSA ANDREWS

CO-DIRECTORA

M. en C. NORMA MORALES HERNÁNDEZ

GUADALAJARA, JAL. MAYO 2015

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN
TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO**

**ESTABILIDAD OXIDATIVA DE ÁCIDOS GRASOS
POLIINSATURADOS MICROENCAPSULADOS EN
MATRICES MULTICAPA**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO
ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA

OPCIÓN TERMINAL: PROCESOS AGROINDUSTRIALES

PRESENTA

Q.F.B. ROGELIO RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ

DIRECTOR

Dr. HUGO ESPINOSA ANDREWS

CO-DIRECTORA

M. en C. NORMA MORALES HERNÁNDEZ

GUADALAJARA, JAL. MAYO 2015

“Es justamente la posibilidad de realizar un sueño, lo que hace que la vida sea interesante”

Paulo Coelho

DEDICATORIA

A MIS PAPÁS

Por su amor, cariño, paciencia y apoyo incondicional que me han dado toda la vida.

Ustedes son lo más amado que tengo en esta vida, muchas gracias. Todo su esfuerzo en apoyarme en estos 5 años ha dado frutos y véanme aquí titulándome, nunca los defraudaré y sobre todo tengan la seguridad que llegaré lejos muy lejos.

Muchas gracias.

Los amo

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis Dr. Hugo Espinosa Andrews por la oportunidad, paciencia y la confianza de esta gran aventura la cual comencé hace 5 años (y los que faltan), desde el comienzo dándome todo su apoyo incondicional no solo como alumno sino como un amigo. Usted siempre me dejó un gran mensaje, cuando se quiere algo se logra no solo con el esfuerzo sino con la perseverancia. Este logro es gracias a usted.

A mi apreciable asesora Norma Morales Hernández por sus consejos, interés y apoyo incondicional dentro y fuera del CIATEJ, siendo parte fundamental en la realización y desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Inocencio Higuera Ciápara y Dr. Eristeo García Márquez por sus comentarios y valiosas aportaciones para esta investigación.

A mis amigos y compañeros del grupo COLOIDES Gretel, Gladys, Karina, Norma y Eristeo por todos los momentos que pasamos juntos y todos los comentarios, críticas y aportaciones en este trabajo.

Al Dr. Pedro Mondragón Cortez por sus consejos y apoyo a lo largo de estos 5 años.

A mis amigos de la maestría Hilda, Nancy, Jorge, Alexis y Roberto por su apoyo y todos los momentos que pasamos juntos dentro y fuera de las aulas.

A Nutrición y Salud Omegamex S.A. DE C.V y KURAGO BIOTEK HOLDINGS S.A.P.I. DE C.V por la donación del aceite de pescado.

A CONACyT por la beca otorgada en el posgrado PICyT

Al Fondo de Ciencia Básica SEP-CONACyT por el financiamiento de este trabajo a través del convenio CB-2008-01/104109.

A CIATEJ y PICyT por la formación académica y profesional otorgada en el posgrado

ÍNDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	12
1 ANTECEDENTES.....	13
1.1 Microencapsulación.....	13
1.1.1 Secado por aspersión.....	13
1.1.2 Material de pared.....	15
1.1.3 Polielectrolitos.....	18
1.2 Emulsión	20
1.2.1 Emulsiones multicapa.....	22
1.3 Ácidos grasos poliinsaturados.....	24
1.4 Oxidación lipídica	26
2 ESTADO DEL ARTE.....	28
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	30
4 HIPÓTESIS.....	31
5 OBJETIVO GENERAL.....	32
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
6 MATERIAL Y MÉTODOS	33
6.1 Materiales.....	34
6.2 Preparación de dispersiones de polielectrolitos.	34
6.3 Perfil de titulación de biopolímeros.	34
6.3.1 Potencial zeta.....	34

6.4	Formación de complejos electrostáticos.	35
6.4.1	Porcentaje de complejos dispersos	35
6.4.2	Turbidez.....	36
6.4.3	Potencial zeta	36
6.5	Emulsiones.....	36
6.5.1	Caracterización fisicoquímica de la emulsión simple y multicapas.	37
6.6	Microencapsulación por secado por aspersión.	37
6.6.1	Actividad de agua	37
6.6.2	Contenido de humedad	37
6.6.3	Higroscopicidad	38
6.6.4	Extracción de aceite superficial.	38
6.6.5	Aceite total (%)	38
6.6.6	Cálculo de la eficiencia de encapsulación	39
6.6.7	Oxidación lipídica.....	39
6.6.8	Parámetros cinéticos de la formación de hidroperóxidos.	40
6.6.9	Morfología de las partículas.....	40
6.7	Análisis Estadístico.	41
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
7.1	Interacción entre macromoléculas.	42
7.1.1	Complejos polielectrolitos	44

7.2	Formación de emulsiones	47
7.3	Microencapsulación.....	51
7.3.1	Estabilidad oxidativa de las microcápsulas.....	52
7.3.2	Microscopia electrónica de barrido (MEB)	56
8	CONCLUSIONES GENERALES.	59
9	PERSPECTIVAS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN	60
10	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema de un equipo de secado por aspersion.	14
Figura 2 Estructura de la goma de mezquite.....	16
Figura 3. Estructura del quitosano.....	17
Figura 4. Interacciones entre polielectrolitos	18
Figura 5. Complejos dispersos	19
Figura 6 Representación esquemática de la formación de una emulsión simple.	21
Figura 7 Principio del proceso de microfluidización.....	22
Figura 8 Representación esquemática de la formación de una emulsión multicapa .	22
Figura 9 Estructura de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3	25
Figura 10. Mecanismo de oxidación del aceite comestible.	26
Figura 11 Metodología general del trabajo.....	33
Figura 12 Perfil de titulación de goma de mezquite y quitosano en función del pH...	42
Figura 13 Formación de complejos electrostáticos goma de mezquite/quitosano.....	44
Figura 14 Emulsiones multicapa de aceite de pescado.	48
Figura 15 Potencial zeta e índice de sedimentación relativa en el sobrenadante de emulsiones multicapa.....	48
Figura 16 Formación de hidroperóxidos en microcápsulas de aceite de pescado a diferentes temperaturas.	52
Figura 17 Dependencia lineal de LN k respecto a $1/T$	54
Figura 18 Morfología externa de microcápsulas: monocapa (M_P), bicapa (M_S) y tricapa (M_T).	56
Figura 19 Espectro de absorción de complejo tiocianato férrico	68

Figura 20 Curva de calibración de hidroperóxidos de cumeno. 69

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Aplicaciones de complejos polielectrolitos en la microencapsulación por secado por aspersión	20
Tabla 2 Cálculo de orden de reacción	40
Tabla 3 Composición de mezclas de polielectrolitos	43
Tabla 4 Parámetros fisicoquímicos del sobrenadante de mezclas goma de mezquite/quitosano.	45
Tabla 6 Composición másica de emulsiones multicapa.	47
Tabla 7 Parámetros fisicoquímicos de microcápsulas de aceite de pescado.....	51
Tabla 8 Parámetros cinéticos de la formación de hidroperóxidos en microcápsulas de aceite de pescado.	55
Tabla 9 Coeficientes de regresión lineal	70

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el efecto del número de capas de polielectrolitos que conforman la pared de microcápsulas secadas por aspersion en la tasa de oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados. Las capas fueron electrodepositadas de manera secuencial sobre la superficie de glóbulos de aceite de pescado previamente emulsionado con la goma de mezquite. Inicialmente, la formación de complejos electrostáticos entre la goma de mezquite y el quitosano fue evaluada mediante mediciones de potencial zeta, turbidez y porcentaje de complejos dispersos. La mayor diferencia de electronegatividad fue localizada a un valor de pH de 4.5. A esta condición, la máxima formación de complejos insolubles fue posible a una relación másica de 8.5 gramos de goma de mezquite por gramo de quitosano. La total redispersión del sistema fue observada a relaciones mayores de 3 gramos de goma de mezquite por gramo de quitosano. Con base en estos resultados fueron diseñadas y caracterizadas emulsiones multicapa en función de la densidad de carga y porcentaje de sedimentación relativa. La densidad de carga influyó directamente en la estabilidad física de las emulsiones. Tres emulsiones estables a la agregación con diferente número de capas fueron elegidas y deshidratadas por el proceso de secado por aspersion. Las microcápsulas obtenidas fueron caracterizadas respecto a su actividad de agua, contenido de humedad, higroscopicidad, aceite total, eficiencia de encapsulación, y estabilidad oxidativa durante su almacenamiento a tres temperaturas. Las microcápsulas bicapa recubiertas en su capa externa con quitosano mostraron la menor energía de activación y la mayor formación de hidroperóxidos. En cambio, las microcápsulas tricapa mostraron la mayor eficiencia de encapsulación y la mayor estabilidad oxidativa, proporcionando una mejor protección contra la difusión de oxígeno.

INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos poliinsaturados son esenciales para el crecimiento y desarrollo del cuerpo humano, debido a que juegan un rol importante en la prevención y tratamiento de enfermedades coronarias, hipertensión, diabetes, artritis, enfermedades inflamatorias y desordenes autoinmunes, entre otros.

Una de las razones del desarrollo y crecimiento del mercado de los ácidos grasos poliinsaturados es el incremento en las áreas de aplicación, mientras que las ya existentes están encontrando nuevos mercados (Grand View Research, <http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/omega-3-market>).

En 2013, el mercado de los ácidos grasos poliinsaturados fue estimado en 24,000 toneladas y se espera un incremento del 13% entre 2014 y 2020. La proyección de ventas para el 2020 será alrededor de 7.3 billones de dólares, siendo uno de los alimentos funcionales de mayor demanda (55%). Las aplicaciones en fórmulas infantiles y productos farmacéuticos serán uno de los nichos de oportunidad más importantes para el crecimiento del mercado en los próximos años (Organización de Ingredientes Marinos; <http://www.ifo.net/about-us>).

Debido a la elevada susceptibilidad de los ácidos grasos poliinsaturados a la oxidación, los tecnólogos en alimentos han desarrollado tecnologías para su protección, entre la que destaca la encapsulación. La deposición electrostática capa por capa de emulsiones ha probado ser un buen método para la obtención de microcápsulas, con la finalidad de proteger los ácidos grasos poliinsaturados de factores ambientales que propicien su degradación (Klinkesorn y *otros*, 2005a). Se ha reportado un incremento en la estabilidad oxidativa de ácidos grasos poliinsaturados microencapsulados con el aumento del número de capas (Jiménez-Martín y *otros*, 2015; Aberkane y *otros*, 2014), sin embargo otras investigaciones han mostrado mayor estabilidad oxidativa en microcápsulas monocapa.

En este trabajo, se exploró el uso de polielectrolitos de carga opuesta goma de mezquite y quitosano en la formación membranas múltiples de microcápsulas de aceite de pescado obtenidas por secado por aspersion y su efecto en la estabilidad oxidativa durante su almacenamiento.

1 ANTECEDENTES

1.1 Microencapsulación.

La microencapsulación es utilizada en la industria de los alimentos debido a que imparte una barrera física entre el material activo y otros componentes del producto, reduce la reactividad del material activo contra factores ambientales, disminuye la velocidad de transferencia del material activo al ambiente externo, provee un mayor manejo del producto, ayuda al control de la liberación del material activo y enmascara sabores y olores indeseables (Gharsallaoui *y otros*, 2007).

Diversos métodos han sido propuestos para la producción de encapsulados y en general pueden ser divididos en tres grupos:

1. Procesos físicos: Secado por aspersion y extrusion.
2. Procesos fisicoquímicos: coacervación y atrapamiento en liposomas.
3. Procesos químicos: Polimerización interfacial e inclusion molecular.

La selección del proceso de encapsulación dependerá de las propiedades físicas y químicas del material de pared y principio activo, tamaño de partícula requerido, mecanismos de liberación, aplicaciones, entre otros (Desai y Park, 2005; Ré, 1998).

1.1.1 Secado por aspersion

Particularmente, la encapsulación por secado por aspersion es un proceso económico y flexible, el cual ofrece muchas ventajas sobre otros procesos de secado (Chen y Mujumdar, 2008; Gharsallaoui *y otros*, 2007):

1. La calidad de los polvos se mantiene constante durante el proceso de secado (estabilidad fisicoquímica y microbiológica).
2. Los polvos obtenidos son fáciles de empacar y se reducen los costos de almacenamiento y transporte.

3. El proceso es versátil, debido a que puede ser utilizado el mismo equipo para secar un amplio rango de materiales líquidos.
4. La operación y el mantenimiento de la planta puede ser totalmente automatizada.

El secado por aspersión involucra la atomización de un líquido en el interior de una cámara de secado, donde una corriente de aire caliente es mezclada con las gotas dispersas evaporando instantáneamente la humedad, produciendo polvos desde $10\mu\text{m}$ hasta partículas de tamaño de 2-3 mm (Chen y Mujumdar, 2008; Gharsallaoui *et al.*, 2007). Las partículas encapsuladas son denominadas microcápsulas cuando el tamaño oscila entre 0.2 y 5,000 μm , macrocápsulas cuando son mayores de 5,000 μm y nanocápsulas cuando son menores a 0.2 μm (Ré, 1998).

En la Figura 1 se muestra el esquema de un equipo de secado por aspersión a nivel laboratorio.

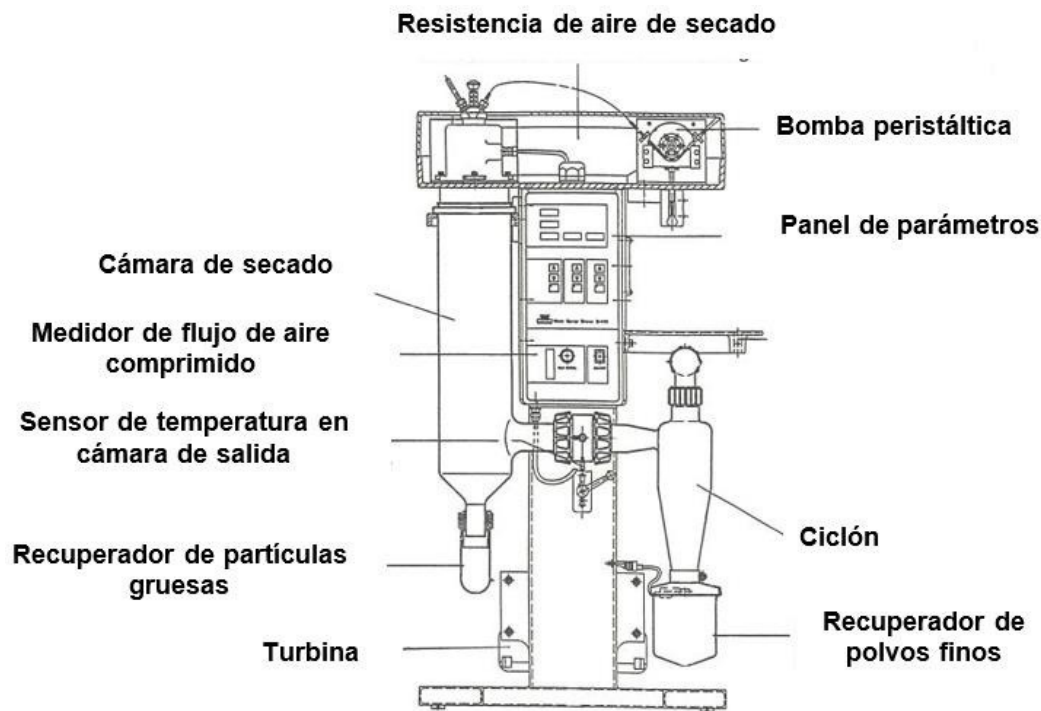


Figura 1 Esquema de un equipo de secado por aspersión.
(Figura tomada de <http://www.lagep.cpe.fr/wwwlagep7/category/material-scientists-equipments>)

Durante el proceso de secado por aspersión se forma una película en la superficie de las gotas. El material que es recubierto es llamado material activo o fase interna y la matriz que forma el recubrimiento es denominado material de pared. Gran parte de los encapsulados tienen poco parecido a las esferas, debido a que la forma y el tamaño dependen de los materiales utilizados en su preparación y obtención (Gharsallaoui y *otros*, 2007; Ré, 1998).

1.1.2 Material de pared

La elección del material de pared es muy importante para obtener una buena eficiencia de encapsulación y una alta estabilidad durante su almacenamiento. El criterio de selección se basa principalmente en las propiedades fisicoquímicas: solubilidad, peso molecular, temperatura de transición vítrea, punto de fusión, cristalinidad, formación de películas, propiedades emulsionantes, viscosidad, entre otras (Gharsallaoui y *otros*, 2007).

Si el compuesto activo a encapsular es de naturaleza hidrofóbica (ácidos grasos poliinsaturados), el material de pared deberá exhibir algunas características básicas tales como: a) alta actividad emulsionante, b) tendencia a formar una red fina y densa durante el secado, c) baja viscosidad en altas concentraciones, y d) alta re-dispersión (Chuan y Xin, 2013).

Pocos materiales de pared pueden reunir todas estas características, entre los que destacan proteínas (suero o leche), almidones modificados y gomas naturales (Gharsallaoui y *otros*, 2007).

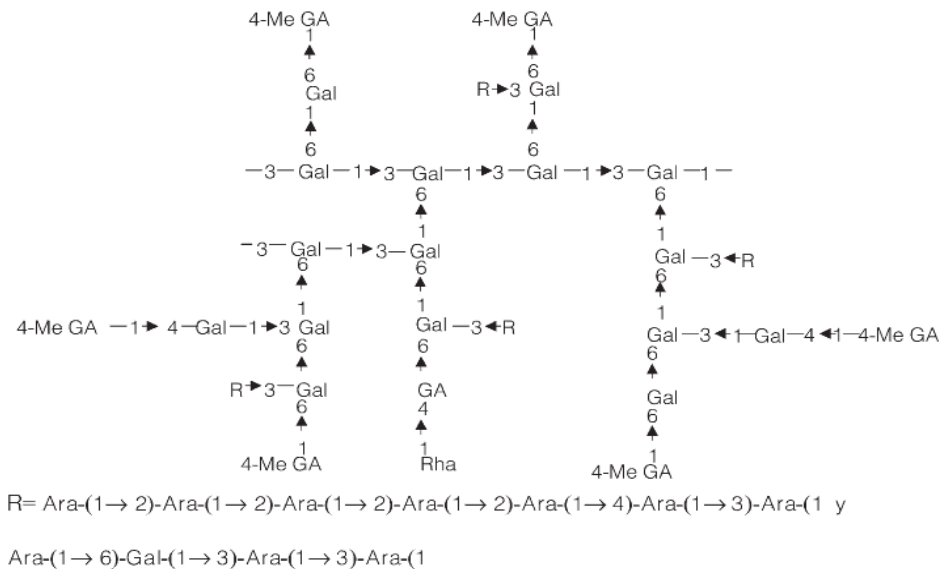
A nivel mundial, la goma arábiga es el biopolímero más utilizado en el proceso de microencapsulación (Gharsallaoui y *otros*, 2007). En 2002 los principales países productores (Sudán, Chad y Nigeria) exportaron cerca de 54,364 toneladas de goma arábiga (Muller y Okoro, 2004) de las cuales 4,994 toneladas fueron importadas a México (López-Franco y *otros*, 2006). En 2004, la importación disminuyó a 1457 toneladas, sin embargo el valor comercial de la goma incrementó.

La variabilidad en el costo y disponibilidad de la goma arábiga ha conducido a encontrar alternativas que reduzcan la importación y consumo de goma arábiga

(Djordjevic y otros, 2007). Una alternativa nacional es la goma de mezquite, ya que posee mejores propiedades emulsionantes y encapsulantes que la goma arábica (Rodea-González y otros, 2012).

La goma de mezquite es un exudado del árbol *Prosopis spp* y químicamente es una sal neutra de un polisacárido ramificado formado por una cadena central de unidades de D-galactosa enlazadas por uniones $\beta(1,3)$ y $\beta(1,6)$, unidas con cadenas laterales de L-galactosa, L-arabinosa, ácido D-glucurónico y ácido 4-O-metil-glucurónico (Figura 2), estos dos últimos son responsables del carácter aniónico de la goma en solución (López-Franco y otros, 2006).

La goma de mezquite es altamente soluble en agua (López-Franco y otros, 2012) y exhibe bajas viscosidades en altas concentraciones comparadas con otras gomas comerciales (Vernon-Carter y otros, 2000), además presenta propiedades emulsionantes por lo que es usada en la estabilización de ácidos grasos. (Perez-Orozco y otros, 2004; Rodea-González y otros, 2012; Roman-Guerrero y otros, 2009).



(4-Me-GA= 4-O-metil- β -D-Glucuronato, Gal= β -D-Galactosa, GA= β -D-Glucuronato, Rha= Ramnosa, Ara= Arabinosa

Figura 2 Estructura de la goma de mezquite
 (Vernon-Carter y otros, 2000)

Sin embargo, es un recurso que no se ha aprovechado totalmente, ya que se deben vencer diversas barreras técnicas y económicas antes de que sea aprovechada a nivel industrial, entre las que destacan la autorización para obtener el estatus “Generalmente Reconocido Como Seguro” por parte de la Administración de Drogas y Alimentos en Estados Unidos y la instrumentación de criterios de calidad y clasificación que permitan elaborar un sistema de precios. En México, su uso en alimentos fue aprobada por la Secretaria de Salud (López-Franco y *otros*, 2006).

Las microcápsulas pueden estar compuestas de uno o varios materiales de pared (multicapa) (Gharsallaoui y *otros*, 2007; Gibbs y *otros*, 1999). La multicapa puede ser formada por la técnica de deposición electrostática capa por capa, la cual permite la incorporación de materiales de pared con carga electrostática opuesta (polielectrolitos) sobre la superficie del sistema (Xiang y *otros*, 2014). Esto conduce a la formación de microcápsulas con un grosor deseable dependiendo en la aplicación final (Shchukina y Shchukin, 2012).

El quitosano es utilizado en la formación de sistemas multicapas, ya que es capaz de adsorberse en la superficie de los glóbulos de emulsión de carga opuesta y formar una capa interfacial conduciendo al desarrollo de emulsiones estables (Klinkesorn, 2013). Es un polisacárido que es obtenido a partir de la N-desacetilación de la quitina con una estructura lineal de naturaleza catiónica, el cual consiste en residuos de 2-acetamido-2-deoxi-β-D-glucopiranososa y 2-amino-2-deoxi-β-D-glucopiranososa (Figura 3), este último responsable de su carga catiónica en pH ácidos (Cardenas y *otros*, 2003; Goycoolea y *otros*, 2000).

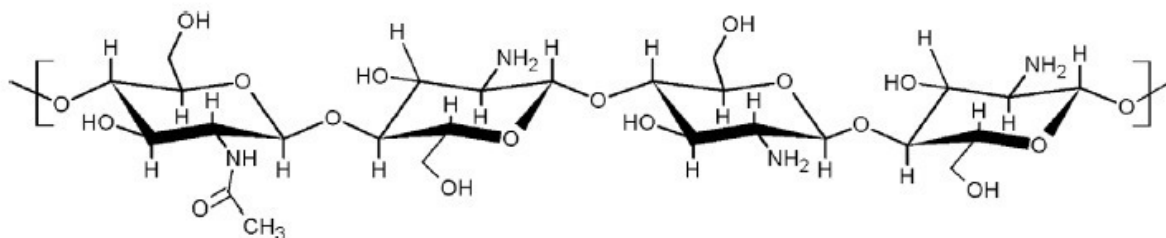


Figura 3. Estructura del quitosano

(Carreira y *otros*, 2010).

Sus propiedades en solución dependen del a) grado de polimerización (peso molecular), b) grado de desacetilación, c) concentración de polímero, d) pH, e) fuerza iónica y f) distribución de los residuos N-glucosamina y N-acetil-glucosamina a lo largo de la molécula (Ravi-Kumar, 2000).

1.1.3 Polielectrolitos

Los polielectrolitos son macromoléculas que poseen en su estructura grupos ionizables (Dobrynin y Rubinstein, 2005; Visakh y *otros*, 2014). Cuando dos polielectrolitos se dispersan, pueden originarse interacciones atractivas, repulsivas o miscibles (Figura 4). Estas interacciones son debido al gran número de fuerzas intermoleculares originadas entre sus estructuras y factores como naturaleza del polielectrolito, densidad de carga, peso molecular, sitios reactivos presentes, concentración y relación de polielectrolitos, así como por las condiciones del solvente (pH y fuerza iónica) (Klemmer y *otros*, 2012; Rwei-Yi y *otros*, 2014; Ye y *otros*, 2012).

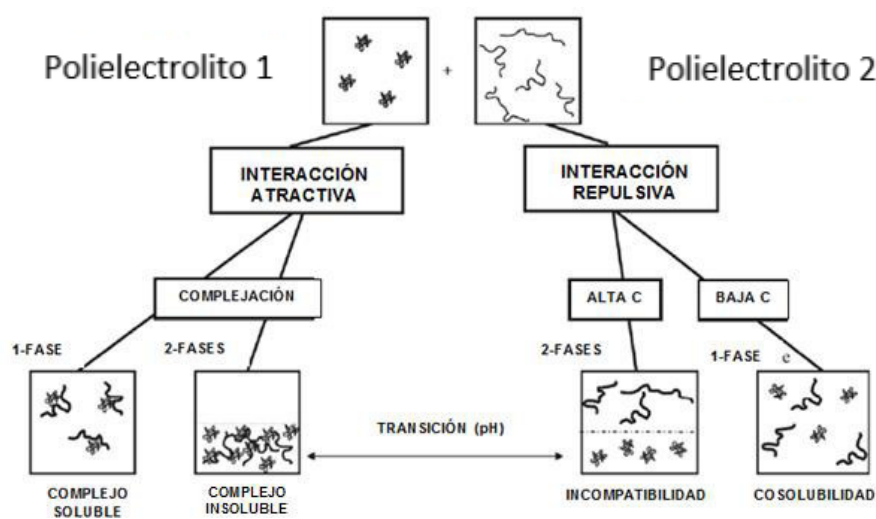


Figura 4. Interacciones entre polielectrolitos

(McClements, 2006)

Cuando dos polielectrolitos interaccionan de manera atractiva se presenta la formación de complejos, siendo evidentes de varias maneras: a) formación de un gel débil homogéneo, si las interacciones son débiles, b) precipitación de ambos polielectrolitos, si las interacciones son fuertes, y c) formación de complejos dispersos (Dickinson, 2003; Espinosa-Andrews y *otros*, 2013; Klemmer y *otros*, 2012).

La formación de complejos dispersos es la primera interacción atractiva entre polielectrolitos de carga opuesta, la cual es evidenciada por un cambio en la turbidez, en el que alguno de los polielectrolitos se encuentra en mayor concentración, proporcionando una densidad de carga suficientemente alta para repelerse entre ellos y permanecer en dispersión (Figura 5) (Liu y *otros*, 2010).



Figura 5. Complejos dispersos

Cuando los complejos alcanzan una densidad de carga cercana a la neutralidad, se observa una separación del sistema en dos fases: una fase densa (fase coacervada) y una fase con baja concentración en polielectrolitos y en equilibrio con la fase coacervada (sobrenadante) (Priftis y *otros*, 2012). El máximo rendimiento de coacervación se alcanza en la región de carga estequiométrica 1:1([+]/[-]) (Kizilay y *otros*, 2011). El potencial zeta afecta la estabilidad del sistema (Heurtault y *otros*, 2003) y es una medida de la magnitud de repulsión o atracción electrostática entre los complejos. El pH y la fuerza iónica del medio afectan la densidad de carga de los polielectrolitos (Espinosa-Andrews y *otros*, 2007; Espinosa-Andrews y *otros*, 2013), ya que modifican el grado de ionización de los grupos funcionales (Guo-Qing y *otros*, 2012).

Los complejos polielectrolitos han sido utilizados en la industria de los alimentos, principalmente en la microencapsulación de compuestos bioactivos (Tabla 1).

Tabla 1 Aplicaciones de complejos polielectrolitos en la microencapsulación por secado por aspersión

Complejos polielectrolíticos	Autores	Compuesto activo
Proteína de chícharo/pectina	Aberkane <i>y otros</i> (2014)	----
Lecitina/quitosano	Klinkesorn et al. (2005, 2006, 2007)	Aceite de pescado (AP)
Lecitina/quitosano	Jiménez-Martín <i>y otros</i> (2015)	AP
Lecitina/quitosano	Serfert <i>y otros</i> (2013a)	AP
β -lactoglobulina/pectina	Serfert <i>y otros</i> (2013b)	AP

1.2 Emulsión

Una emulsión es la dispersión de dos líquidos inmiscibles en pequeños glóbulos en presencia de un material de pared con propiedades emulsionantes. Durante este proceso, el emulsionante se adsorbe en la superficie de los glóbulos de aceite recién formados reduciendo la tensión interfacial, lo que facilita la dispersión, formando una capa protectora alrededor de los glóbulos que ayudan a reducir el efecto de las fuerzas atractivas, favoreciendo las fuerzas repulsivas y los mecanismos de estabilización estéricas (Guzey y McClements, 2006; Dickinson, 2009).

Las emulsiones se clasifican de acuerdo a la organización espacial de las fases aceite y agua. Un sistema que consiste en gotas de aceite dispersas en una fase acuosa es llamada emulsión aceite en agua (O/W) (Figura 6), mientras que un sistema que consiste de gotas de agua dispersas en una fase oleosa es llamada emulsión agua en aceite (W/O) (McClements *y otros*, 2007).

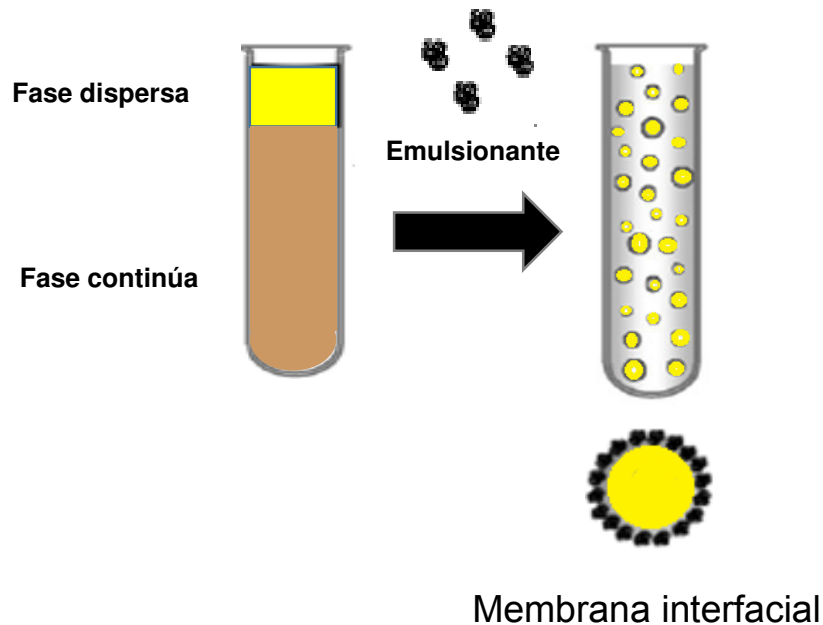


Figura 6 Representación esquemática de la formación de una emulsión simple.

(Guzey y McClements, 2006.)

La emulsificación es una etapa crítica en la formación de emulsiones, debido a que la distribución y tamaño de los glóbulos son importantes en la eficiencia de encapsulación (Jafari y Bhandari, 2007; Danviriyakul y *otros*, 2002).

La estabilidad de las emulsiones depende en gran medida del tamaño de partícula; glóbulos de emulsión $<1\mu\text{m}$ son más estables que valores $>1\mu\text{m}$ (Schultz y *otros*, 2004; Tonon y *otros*, 2012).

Las emulsiones son producidas en homogeneizadores de alta presión, en el que se obtienen tamaños de glóbulos $>1\mu\text{m}$ (Jafari y *otros*, 2006). En la literatura se ha reportado el uso del proceso de microfluidización en la homogeneización de emulsiones, donde son producidos glóbulos $<1.0\mu\text{m}$ y distribuciones de tamaño más estrechas que en los métodos convencionales (Jafari y *otros*, 2007; Piorkowski y McClements, 2014). De esta manera se obtienen emulsiones más estables.

Durante la microfluidización, la emulsión pasa a través de una cámara de interacción por medio de una bomba de alta presión. La cámara consiste en dos canales de flujo

en el que el fluido pasa a una determinada presión y chocan entre sí a alta velocidad, creando una alta fuerza de cizallamiento y subsecuente ruptura y disminución del tamaño de los glóbulos (Figura 7) (Lee y otros, 2013).

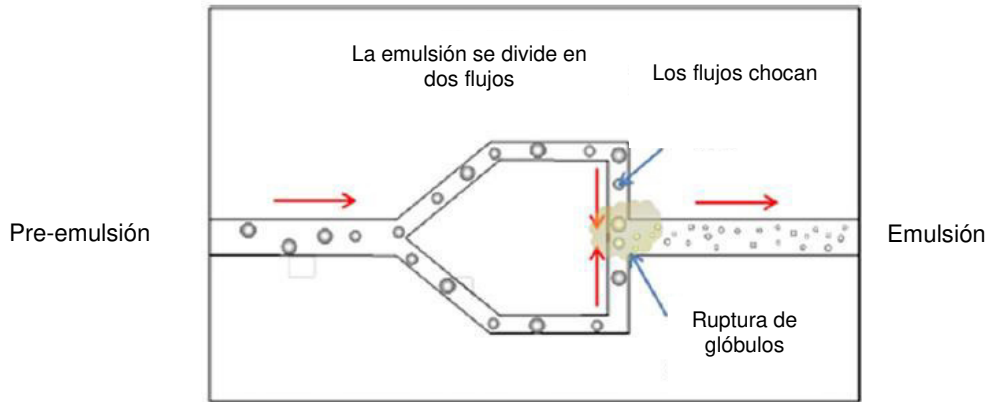


Figura 7 Principio del proceso de microfluidización

1.2.1 Emulsiones multicapa.

Una estrategia para obtener emulsiones fisicoquímicamente estables, es crear múltiples capas interfaciales utilizando emulsionantes y/o polielectrolitos alrededor de los glóbulos de aceite, mediante la técnica de deposición electrostática capa por capa (Figura 8).

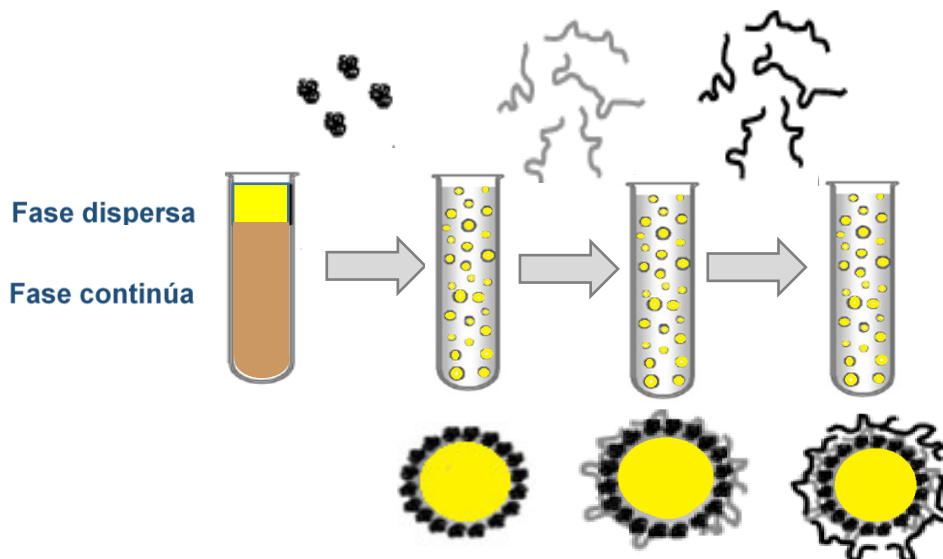


Figura 8 Representación esquemática de la formación de una emulsión multicapa

(Guzey y McClements, 2006)

Ésta técnica consiste en la formación de una emulsión primaria por la adsorción de un emulsionante iónico en el glóbulo de aceite, utilizando el proceso de homogeneización, y la posterior adición de un polielectrolito de carga opuesta, el cual se adsorbe en la superficie del glóbulo, produciendo una emulsión secundaria, este procedimiento puede ser repetido tres o más veces (Guzey y McClements, 2006).

Esta técnica fue desarrollada por Iler en el año de 1960. En sus experimentos, depositó de manera alternada capas de partículas coloidales cargadas positiva y negativamente sobre una superficie de vidrio. No fue sino hasta la década de 1990's que Decher y *otros* (1992) revolucionaron la técnica de deposición electrostática capa por capa, demostrando la adsorción de multicapas electrostáticas de polímeros cargados opuestamente en superficies sólidas (Decher y *otros*, 1992; Guzey y McClements, 2006)

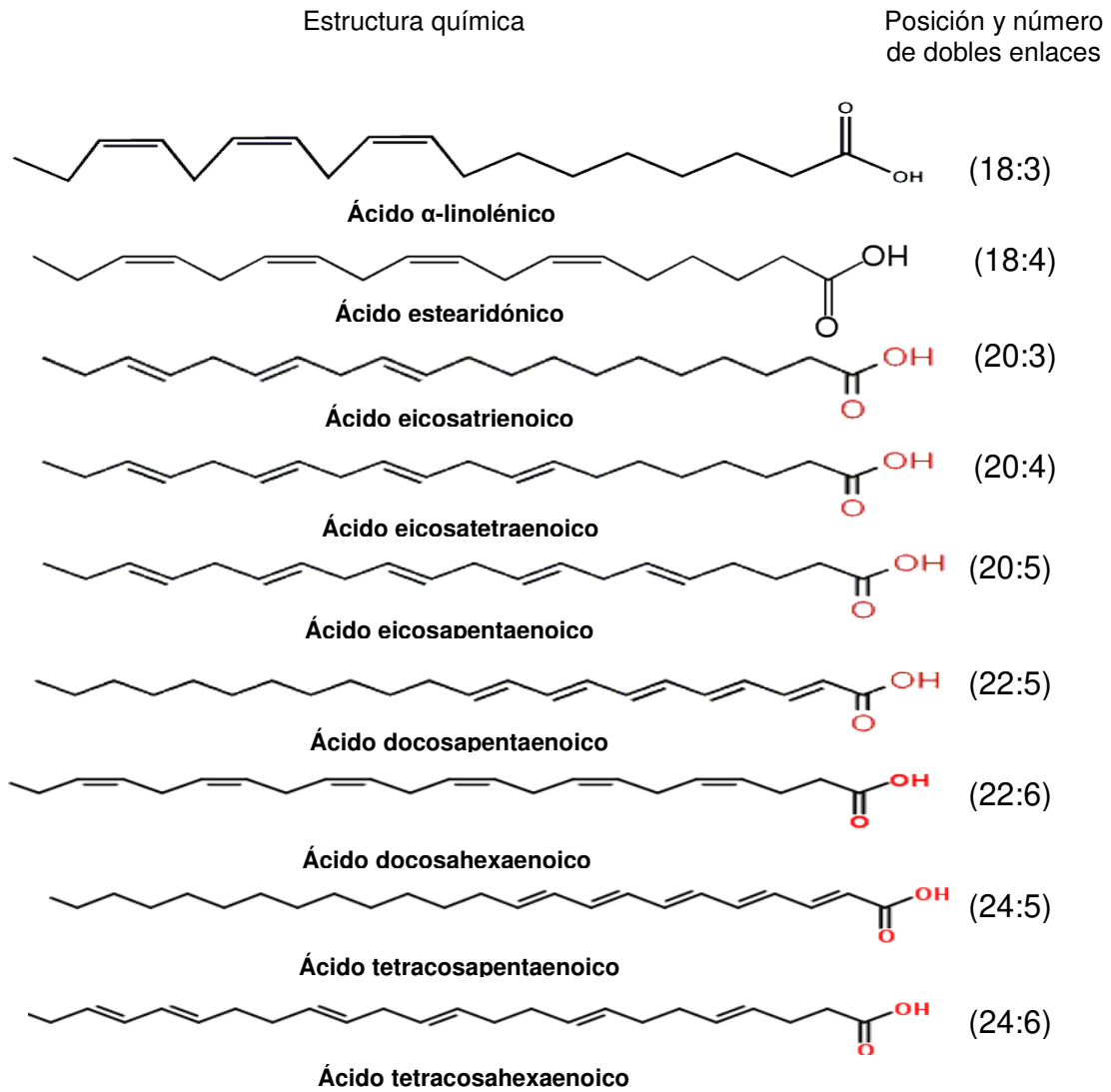
Algunas de las emulsiones multicapa reportadas incluyen sistemas Tween 80/quitosano (Klinkesorn y Namatsila, 2009), proteína de chícharo/pectina (Gharsallaoui y *otros*, 2010.), β -lactoglobulina/pectina (Serfert y *otros*, 2013b), proteína de suero de leche/alginato de sodio (Fioramonti y *otros*, 2015), entre otros.

Ogawa y *otros* (2003) desarrollaron emulsiones multicapa lecitina/quitosano y dodecil sulfato de sodio/quitosano/pectina, respectivamente, las cuales mostraron una mayor estabilidad al procesamiento térmico (30-90°C por 30 minutos), ciclos congelación/descongelación (-10°C por 22 horas/30°C por 2 horas), altos contenidos de cloruro de calcio (≤ 500 mM), así como una menor oxidación lipídica que las emulsiones primarias. Zhao y *otros* (2014) reportaron una mayor estabilidad al estrés ambiental (pH, fuerza iónica y luz) en emulsiones multicapa de lactoferrina/polisacáridos solubles de soya y lactoferrina/pectina que en emulsiones simples de lactoferrina. García-Marquez y *otros* (2015) estabilizaron carotenoides de oleorresina de chile rojo utilizando matrices multicapa fosfato de calcio/quitosano/goma de mezquite, mostrando que las emulsiones multicapa exhiben una mayor estabilidad y protección contra la degradación de los carotenoides.

Las emulsiones multicapa han sido utilizadas para microencapsular aceite de pescado, con la finalidad de proteger a los ácidos grasos poliinsaturados de la oxidación (Klinkesorn y otros, 2005a).

1.3 Ácidos grasos poliinsaturados.

Los ácidos grasos poliinsaturados son clasificados de acuerdo a la posición del doble enlace partiendo del carbono extremo al grupo funcional carboxílico; ácidos grasos omega-9 (primer doble enlace en el carbono 9), ácidos grasos omega-6 (primer doble enlace en el carbono 6) y ácidos grasos omega-3 (primer doble enlace en el carbono 3) (Castro-González, 2002). La Figura 9 muestra la estructura de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 más comunes:



(Gogus y Smith, 2010)

Figura 9 Estructura de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3

Los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 no pueden ser sintetizados en el cuerpo humano, por lo que deben ser ingeridos por medio de los alimentos. Estos se encuentran presentes en plantas y fuentes marinas como pescado, mejillones, ostras, camarones y peces de agua fría, además de una gran diversidad de productos de origen vegetal como frutos secos (nuez Inglesa, semillas de sésamo, soya, canola, oliva), entre otros (Gogus y Smith, 2010).

Su consumo tiene efectos en la salud debido a su capacidad a disminuir los riesgos a enfermedades cardiovasculares, mentales y aquellas afectadas por desórdenes de respuesta inmune tales como diabetes tipo 2 y artritis reumatoide (Coronado-Herrera *y otros*, 2006; Khoueiry *y otros*, 2013; Ruxton *y otros*, 2004). Sin embargo, son susceptibles a la oxidación durante su procesamiento y almacenamiento, lo que limita su empleo directo como aditivo alimentario. Los productos de la oxidación dan origen a la ranciedad y son nocivos para la salud (McClements *y otros*, 2007).

1.4 Oxidación lipídica

La oxidación lipídica es una de las principales causas de deterioro de calidad de los lípidos presentes en los alimentos. Es un término utilizado para describir una secuencia compleja de interacciones químicas entre los grupos acilo de los ácidos grasos con especies reactivas de oxígeno. Es una reacción en cadena que es dividida en tres etapas: iniciación, propagación y terminación (Figura 10) (Chaiyasit *y otros*, 2007).

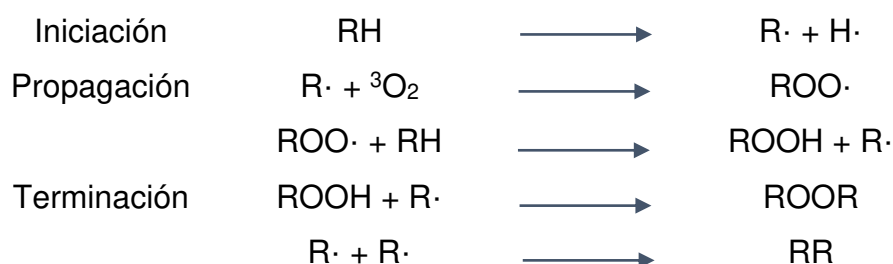


Figura 10. Mecanismo de oxidación del aceite comestible.

(Choe y Min, 2006)

En la iniciación, se forma un ácido graso radical conocido como radical alquilo ($R\cdot$) por la sustracción de un hidrógeno de un ácido graso en presencia de un iniciador, en el que un átomo de hidrógeno adyacente al doble enlace es removido más fácilmente.

La propagación involucra la adición de oxígeno al radical alquilo resultando en la formación de un radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$). Este radical puede extraer un hidrógeno de otro ácido graso insaturado y producir un hidroperóxido lipídico (ROOH) y un nuevo radical alquilo. La terminación es el resultado de la interacción de dos radicales libres, formando un producto final estable. El hidroperóxido lipídico producido sufre una reducción a un ácido graso hidroxilo o se cicla para producir endoperóxidos cíclicos estables que terminan el proceso de oxidación. La velocidad de reacción es dependiente de la temperatura, oxígeno, inhibidores de la oxidación y naturaleza de los sustratos (Chaiyasit y *otros*, 2007; O'Connor y O'Brien, 2006).

Los productos de la oxidación incluyen compuestos de bajo peso molecular e hidroperóxidos. Los hidroperóxidos son relativamente estables a la temperatura ambiente. Sin embargo, en presencia de metales o altas temperaturas se descomponen fácilmente a radicales alcoxi y forman aldehídos, cetonas, ácidos, ésteres, alcoholes e hidrocarburos de cadena corta, siendo compuestos volátiles y de bajo peso molecular responsables del sabor indeseable del aceite oxidado (trans,cis-decadienal, trans,trans-2,4-decadienal, trans,cis-2,4-heptadienal, 1-octen-3-ol, n-butanal y n-hexanal) (Choe y Min, 2006).

Varios estudios han demostrado que los productos derivados de la oxidación causan efectos adversos como cáncer, arterosclerosis, artritis y diabetes (Medina-Meza y *otros*, 2014; Percival, 1998).

2 ESTADO DEL ARTE.

Entre los polielectrolitos utilizados en la microencapsulación de aceite de pescado a partir de emulsiones multicapa están las proteínas (β -lactoalbúmina, proteína aislada de chícharo), carbohidratos (quitosano, pectinas de diferente grado metoxilo) y lecitinas.

Jiménez-Martín y otros (2015) estudiaron la estabilidad oxidativa de microcápsulas de ácidos grasos poliinsaturados, utilizando emulsiones monocapa (lecitina) y multicapa (lecitina/quitosano) secadas por aspersion, almacenadas por 12 días (4, 30 y 60°C). Ellos encontraron que el incremento de la concentración de quitosano (0.125 y 0.250%) y número de capas interfaciales (2 capas) logró retardar el proceso de oxidación. En cambio, el incremento del tiempo y temperatura de almacenamiento aceleró la velocidad de oxidación lipídica, alcanzando los máximos valores en el día 12 a 60°C.

Aberkane y otros (2014) evaluaron la influencia de la composición de la capas de polielectrolitos (proteína aislada de chícharo/pectina) en la estabilidad oxidativa de emulsiones secadas por aspersion a diferente humedad relativa (11, 33, 57 y 75 %) a 20°C. Las microcápsulas a partir de emulsiones multicapa mostraron mayor protección contra la oxidación.

Serfert y otros (2013a) evaluaron la estabilidad oxidativa de microcápsulas multicapa lecitina y lecitina/quitosano a 20°C y 33% de humedad relativa por ocho semanas. Las microcápsulas monocapa mostraron los valores más bajos de hidroperóxidos. **Serfert y otros (2013b)** investigaron la estabilidad oxidativa de emulsiones monocapa (proteína de chícharo) y bicapa (proteína de chícharo/pectina) con dos grados de metoxilación de pectina (bajo y alto) secadas por aspersion, durante su almacenamiento a 20°C y 33% de humedad relativa. Las microcápsulas bicapa con pectina de bajo metoxilo disminuyó la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados.

Klinkesorn y otros (2006) examinaron el impacto del proceso de secado por aspersión en las propiedades fisicoquímicas y en la estabilidad oxidativa de microcápsulas multicapa lecitina/quitosano de aceite de pescado. La temperatura de secado (165, 180 y 195 °C) y el aceite superficial no tuvo un efecto en la estabilidad oxidativa.

Klinkesorn y otros (2005a) investigaron el efecto de la humedad relativa (11, 33 y 52%) en la estabilidad oxidativa de emulsiones lecitina/quitosano de aceite de pescado secados por aspersión. La oxidación lipídica no se correlacionó con el contenido de aceite libre. El sistema multicapa lecitina/quitosano proporcionó una mayor estabilidad oxidativa que la adición de tocoferoles en el aceite sin microencapsular. Las microcápsulas almacenadas a una humedad relativa de 33%, fueron más susceptibles a la oxidación.

Todas estas investigaciones indicaron un efecto del número y tipo de capas polielectrolíticas en la estabilidad oxidativa de microcápsulas de ácidos grasos poliinsaturados provenientes del aceite de pescado.

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los complejos polielectrolitos son formados a partir de las interacciones entre macromoléculas de carga opuesta. Estos sistemas son influenciados por el peso molecular, densidad de carga, concentración y relación de polielectrólitos, pH, temperatura y fuerza iónica del solvente en el que se encuentran dispersos. Frecuentemente, son empleados en la industria de los alimentos como sustitutos de grasas, mejoradores de textura y en la microencapsulación de compuestos bioactivos. Particularmente en el campo de la microencapsulación, los complejos polielectrolitos son usados con la finalidad de enmascarar sabores indeseados, incrementar la estabilidad física y química del principio activo durante su procesamiento y almacenamiento, y como sistemas de liberación controlada. En los últimos años, los ácidos grasos poliinsaturados provenientes del aceite de pescado han sido un modelo apropiado para el estudio de sistemas microencapsulados, debido a su rápida degradación por factores oxidativos y una mayor accesibilidad de la materia prima.

La selección apropiada de los materiales de pared y el número de capas que conforman el sistema, juegan un papel crucial en la calidad, eficiencia de encapsulación y estabilidad oxidativa de las microcápsulas.

Se ha reportado una mayor estabilidad oxidativa en microencapsulados de aceite de pescado a partir de la formación de emulsiones multicapa (Aberkane *y otros*, 2014; Jiménez-Martín *y otros*, 2015; Serfert *y otros*, 2013b). En cambio, Serfert *y otros* (2013a) reportaron una mayor estabilidad oxidativa en microcápsulas de aceite de pescado formados a partir de una emulsión simple.

Así, ante lo anteriormente expuesto, el problema de investigación es: ¿Cómo afecta el incremento del número de capas de polielectrolitos en la estabilidad oxidativa de microcápsulas de aceite de pescado durante su almacenamiento a diferentes temperaturas?

4 HIPÓTESIS

El **incremento del número de capas de polielectrolitos** disminuirá la tasa de oxidación de ácidos grasos polinsaturados microencapsulados provenientes del aceite de pescado durante su almacenamiento a diferentes temperaturas.

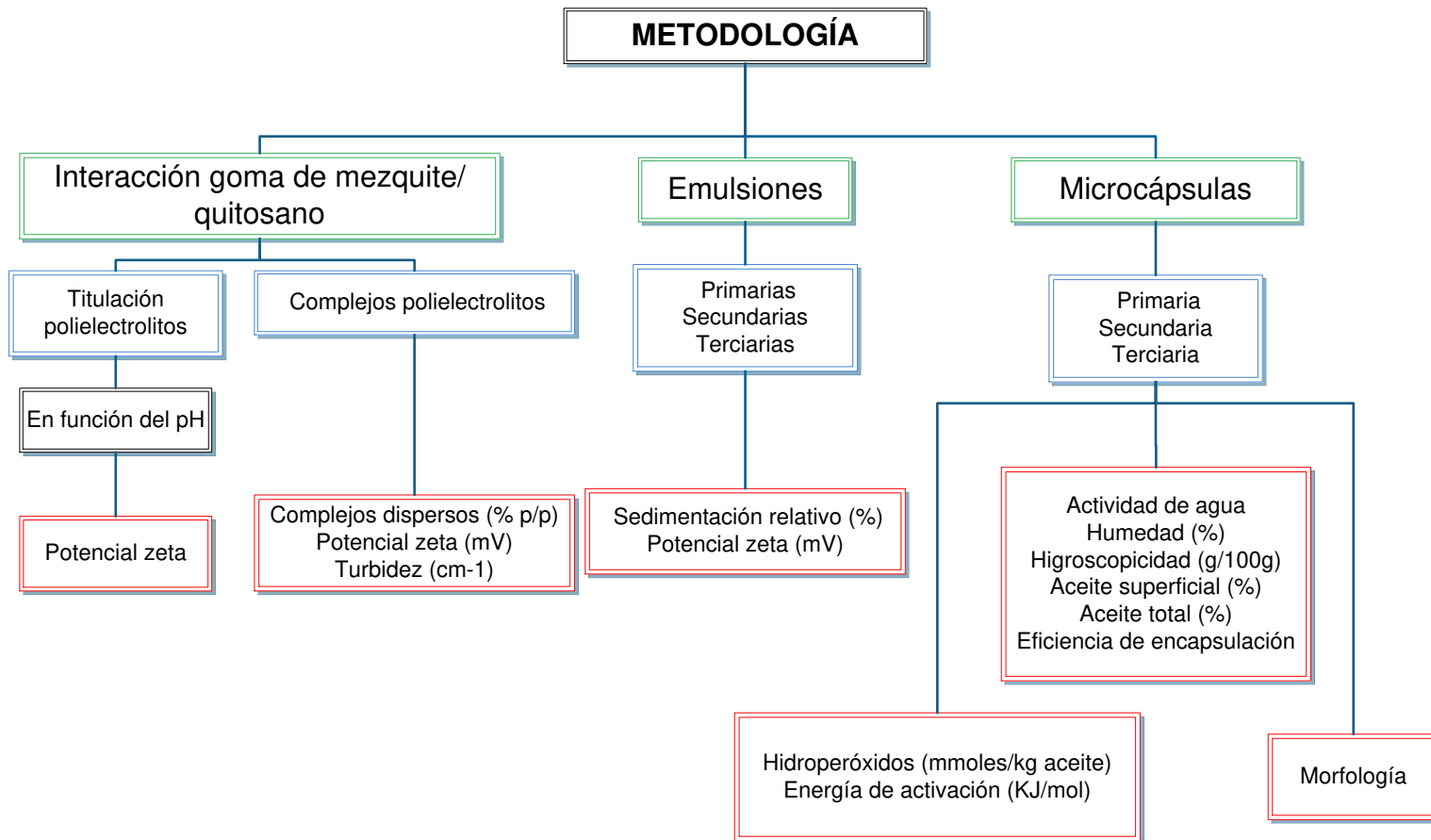
5 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la influencia del número de capas de polielectrolitos en la estabilidad oxidativa de microcápsulas de aceite de pescado durante su almacenamiento a diferentes temperaturas.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer el grado de asociación entre la goma de mezquite y quitosano empleando mediciones electroforéticas de los polielectrolitos en dispersión en función del pH.
- Caracterizar los complejos electrostáticos resultantes de la interacción entre la goma de mezquite y quitosano en función de las proporciones relativas de polielectrolitos, empleando mediciones de porcentaje de complejos dispersos, potencial zeta y turbidez.
- Caracterizar el proceso de agregación entre los polielectrolitos de carga opuesta goma de mezquite/quitosano en una emulsión simple en función de la relación de polielectrolitos, empleando el porcentaje de sedimentación relativo y potencial zeta.
- Obtener y caracterizar microcápsulas a partir de emulsiones multicapa estables a la agregación por el método de secado por aspersion, empleando mediciones de actividad de agua, porcentaje de humedad, higroscopicidad y eficiencia de encapsulación.
- Evaluar el índice de oxidación de las microcápsulas durante su almacenamiento en función de la temperatura con base a mediciones espectrofotométricas de hidroperóxidos.
- Determinar la morfología externa de los microcápsulas utilizando microscopía electrónica de barrido.

1 6 MATERIAL Y MÉTODOS



2

3

Figura 11 Metodología general del trabajo.

6.1 Materiales.

Se adquirió goma de mezquite (*Prosopis spp.*) en Natural Products de México S.A de C.V (Morelos, México). El quitosano de bajo peso molecular (83.53 % desacetilación) y ácido acético glacial se adquirió en Sigma Aldrich (Estado de México, México). Se adquirió hidroperóxidos de cumeno (hidroperóxido de α,α -dimetil beciolo) [$C_6H_5C(CH_3)_2OOH$], sulfato de fierro (II) heptahidratado ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$), cloruro de bario ($BaCl_2$), ácido clorhídrico (HCl) concentrado (37%) y tiocianato de amonio (CH_4N_2S) de Sigma Aldrich (Estado. de México, México). Las soluciones valoradas hidróxido de sodio 0.1N y ácido clorhídrico 0.1N fueron adquiridas de HYCEL de México (Jalisco, México). El aceite de pescado (DHA 55.69 $\mu g/mL$; EPA 10.31 $\mu g/mL$; ETA 0.96 $\mu g/ml$ ALA 0.69 $\mu g/mL$) fue donado por Nutrición y Salud Omegamex S.A. DE C.V (Baja California Sur, México) y KURAGO BIOTEK HOLDINGS S.A.P.I. DE C.V. (Jalisco, México)

6.2 Preparación de dispersiones de polielectrolitos.

La goma de mezquite fue preparada con base en la metodología propuesta por Vernon-Carter *y otros* (1996), ajustada a una concentración de 10% p/p. Se preparó una dispersión de quitosano al 2% (p/p) en ácido acético glacial (1% p/p). Las dispersiones fueron mezcladas durante 24 horas y almacenadas a 4°C para asegurar su completa hidratación (Espinosa-Andrews *y otros*, 2007).

6.3 Perfil de titulación de biopolímeros.

6.3.1 Potencial zeta.

A partir de las dispersiones estándar, se obtuvieron soluciones de 5 mg/mL y 0.2 mg/mL de goma de mezquite y quitosano respectivamente. El potencial zeta fue determinado en función del pH, utilizando un equipo de movilidad electroforética Nano-ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) equipado con un sistema de microtitulación automática MTP-2 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK).

Alícuotas de 10 mL de cada dispersión fueron utilizadas para determinar el potencial zeta. El pH fue modificado utilizando soluciones valoradas 0.1 N de NaOH y HCl en un intervalo de pH de 2.0 a 7.0 unidades cada 0.5 ± 0.1 unidades a 20°C.

El potencial zeta fue determinado con base en la movilidad electroforética de los polielectrolitos utilizando la ecuación de Henry: $U_E = (2\varepsilon\zeta f(k_a))/3\eta$. Dónde: U_E es la movilidad electroforética, ε es la constante dieléctrica (80.4), η es la viscosidad, $f(k_a)$ es la función de Henry, donde k es el grosor de la doble capa y a es el radio de la partícula. Para $f(ka)$ se utilizó el modelo matemático de *Smoluchowsky* (valor de 1.5).

6.4 Formación de complejos electrostáticos.

Con la finalidad de evaluar la formación de complejos electrostáticos entre la goma de mezquite y quitosano se prepararon siete diferentes mezclas a distintas relaciones de polielectrolitos y una concentración total de 5% p/p. Las mezclas de polielectrolitos fueron seleccionadas a partir de los resultados de la formación de complejos insolubles. El pH del sistema fue basado en los resultados de la sección (6.3.1). Las muestras fueron mezcladas mediante agitación magnética por 30 minutos. Después, permanecieron en reposo durante 72 horas a 20°C. Posteriormente, los sistemas fueron centrifugados a 14,000g por 10 minutos y el sobrenadante fue separado y almacenado para su análisis.

6.4.1 Porcentaje de complejos dispersos

El porcentaje de complejos dispersos en el sobrenadante fue calculado mediante un balance de masa (Espinosa-Andrews y otros, 2007):

$$\% \text{ Complejos dispersos} = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde m_0 es la masa de polielectrolito inicial en base seca y m_1 es la masa de complejos dispersos deshidratados.

6.4.2 Turbidez.

La turbidez del sobrenadante (τ) fue determinada empleando un espectrofotómetro CINTRA 6 UV/Vis (GBC Scientific Equipment, E.U.A) a una longitud de onda de 800 nm. Las muestras fueron colocadas en una celda de cuarzo de 1 cm.

$$\tau = -Ln(T) \qquad \text{Ecuación 2}$$

Dónde: T es la transmitancia (Espinosa-Andrews *y otros*, 2007).

6.4.3 Potencial zeta

El potencial zeta de los complejos dispersos en el sobrenadante fue determinado como se describe en la sección 6.3.1 en un valor de pH de máxima diferencia de carga.

6.5 Emulsiones.

La emulsión primaria se obtuvo utilizando como agente emulsionante goma de mezquite. Se formó una pre-emulsión en un dispersor de alta velocidad Silverson L5M-A (Silverson Machines, Ltd, Inglaterra), empleando como fase dispersa 10% p/p de aceite de pescado (relación goma de mezquite /aceite 1:1). Posteriormente, se formó una fina emulsión al pasar la emulsión primaria a través de un microfluidizador (Microfluidics, E.U.A) a 103.421 MPa. Las emulsiones multicapa fueron desarrolladas con base en los resultados de interacción entre los polielectrolitos (Sección 6.4). Las emulsiones secundarias fueron obtenidas añadiendo diferentes concentraciones de quitosano (2% p/p) a la emulsión primaria hasta sobrepasar la zona de agregación. Las emulsiones terciarias se formaron a partir de la selección de una emulsión secundaria estable a la agregación, adicionando diferentes concentraciones de goma de mezquite (15% p/p) hasta sobrepasar la zona de agregación de los glóbulos y alcanzar una zona de estabilidad total. Todas las emulsiones multicapa fueron mezcladas durante 30 minutos a 100g. Una vez formadas permanecieron en reposo durante 72 horas a 20°C. Posteriormente, los sistemas fueron centrifugados a 14,000g por 10 minutos a 20°C y el sobrenadante fue separado para su caracterización.

6.5.1 Caracterización fisicoquímica de la emulsión simple y multicapas.

El índice de sedimentación relativa fue determinado a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Índice de sedimentación} = \frac{m_1}{m_0} \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde m_0 es la masa inicial de sólidos de la emulsión y m_1 es la masa de agregados en la emulsión. Los resultados fueron reportados en base seca.

El potencial zeta se determinó del sobrenadante de acuerdo al apartado 6.4

6.6 Microencapsulación por secado por aspersion.

Con base en los resultados de la sección anterior, la emulsión primaria y dos emulsiones multicapa (secundaria y terciaria) estables a la agregación fueron deshidratadas, utilizando un mini secador por aspersion Büchi B-191 (Büchi Labortechnik A.G, Suiza) equipado con un deshumidificador Büchi B-296 (Büchi Labortechnik A.G, Suiza). Las microcápsulas fueron obtenidas a 185°C y una alimentación de 5 mL/minuto. Los polvos fueron inmediatamente almacenados a 20°C en un desecador conteniendo sílice gel para su caracterización, donde M_P corresponde a las microcápsulas obtenidas a partir de la emulsión primara, M_S a partir de la emulsión secundaria y M_T a partir de la emulsión terciaria. Las microcápsulas obtenidas se caracterizaron de acuerdo a lo siguiente:

6.6.1 Actividad de agua

La actividad de agua de las microcápsulas fue determinada empleando un higrómetro de punto de rocío (Aqualab 4TVE, Decagon Devices, Estados Unidos) a 20°C.

6.6.2 Contenido de humedad

El contenido de humedad de las microcápsulas fue determinado gravimétricamente. Aproximadamente, un gramo de polvo fue colocado en una charola de aluminio. Las charolas fueron colocadas en un horno de convección a 105°C hasta alcanzar un peso constante. El contenido de humedad fue calculado mediante un balance de masa:

$$\text{Contenido de humedad} = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \times 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde m_0 es la masa de polvo inicial, m_1 es la masa del polvo deshidratado

6.6.3 Higroscopicidad

Un gramo de microcápsulas fue colocado en un desecador con una solución sobresaturada de NaCl (humedad relativa de 75%). Después de una semana, las muestras fueron pesadas. La higroscopicidad fue expresada como la cantidad de agua adsorbida por 100 g de muestra (Frascareli y otros, 2012).

$$\text{Higroscopicidad} = \frac{m_1 - m_0}{m_0} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde m_0 es la masa de microcápsulas inicial, m_1 es la masa de microcápsulas hidratadas después de una semana.

6.6.4 Extracción de aceite superficial.

El aceite superficial de las microcápsulas fue determinado de acuerdo al método de Frascareli y otros (2012). Quince mililitros de hexano fueron añadidos a 2 gramos de polvo en un tubo de polipropileno de 50mL, el cual fue mezclado en un vortex por dos minutos a 20°C. Posteriormente, la fase orgánica fue filtrada a través de un papel filtro Whatman No. 41. El polvo colectado en el filtro fue lavado tres veces con 20 mL de hexano, el solvente fue evaporado hasta peso constante y el aceite superficial calculado con la siguiente fórmula:

$$\text{Aceite superficial} = \frac{\text{Aceite}_{\text{no encapsulado}}}{\text{Aceite}_{\text{total}}} \times 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

6.6.5 Aceite total (%)

El aceite total fue extraído y cuantificado por la re-constitución de 50mg de polvo con 300μL de 1) agua desionizada, para las microcápsulas M_P , 2) una solución valorada de HCl 0.1N, para las microcápsulas M_S y 3) una solución de NaCl 1M, para las microcápsulas M_T . Las muestras fueron sonicadas hasta su completa dispersión (16% p/v). Posteriormente, 1.5mL de una mezcla de solventes isooctano-2 propanol (3:1)

fue añadido, mezclándolo en un vortex por un minuto. La fase orgánica fue separada por centrifugación a 7000g por diez minutos (Serfert y otros, 2009) y volatilizada en un evaporador (Vacufuge concentrator 5301, Eppendorf, Alemania) a 65°C por una hora. El contenido de aceite total fue calculado:

$$Aceite\ total = \frac{Aceite_{extraído}}{Aceite_{total\ teórico}} \times 100 \quad \text{Ecuación 7}$$

6.6.6 Cálculo de la eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación fue determinada por la fracción de aceite encapsulado sobre la cantidad de aceite total teórico.

$$\frac{Eficiencia\ de\ encapsulación}{} = \frac{Aceite_{total} - Aceite_{superficial}}{Aceite_{total}} \times 100 \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde $Aceite_{total}$ es la cantidad de aceite total y $Aceite_{superficial}$ es la cantidad de aceite no encapsulado (Frascareli y otros, 2012).

6.6.7 Oxidación lipídica

Los polvos obtenidos fueron almacenados en desecadores de plástico conteniendo una solución sobresaturada de LiCl (11.11% humedad relativa) a tres temperaturas de almacenamiento (4, 20 y 40°C). La estabilidad oxidativa fue estimada por la concentración de hidroperóxidos en el tiempo (Alamed y otros, 2006; N Shanta y E Decker, 1994). Para ello, fueron re-dispersados 50 mg de microcápsulas (apartado 6.6.5). Un volumen de 1.5mL de una mezcla de solventes isooctano/2 propanol (3:1) fue añadido, mezclando posteriormente en un vortex por un minuto. La fase orgánica fue separada por centrifugación en una minicentrífuga Galaxy (VWR International, USA) a 7000g por diez minutos. Los hidroperóxidos fueron cuantificados tomando una alícuota entre 5-200µL de la fase orgánica y añadiendo un volumen de 1.8mL de una mezcla de solventes metanol/butanol (2:1). La solución fue homogeneizada en un vortex por quince segundos, seguido de la adición de 15µL de tiocianato de amonio

(3.94 M) y 15 μ L de cloruro de hierro (II). El cloruro de hierro se preparó mezclando 0.132 M BaCl₂ y 0.144 M de FeSO₄ en una relación 1:1 (v/v).

Después de veinte minutos de reacción, se determinó la absorbancia a 505nm (**Anexo A**), utilizando un espectrofotómetro CINTRA 6 UV/Vis. La concentración de hidroperóxidos fue calculada usando una curva estándar de hidroperóxidos de cumeno (**Anexo B**). La corrección de la concentración de hidroperóxidos fue realizada cuantificando el contenido de aceite extraído en cada medición (Ecuación 7).

6.6.8 Parámetros cinéticos de la formación de hidroperóxidos.

Se determinó el orden de reacción a partir de las cinéticas de oxidación por el método gráfico.

Tabla 2 Cálculo de orden de reacción

Orden de reacción	X (Día)	Y
0		[Concentración hidroperóxidos]
1	Tiempo	LN[Concentración hidroperóxidos]
2		$\frac{1}{[Concentración hidroperóxidos]}$

Se ajustó a un modelo lineal, utilizando la ecuación general de la recta:

$$y = mx + b \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde m es la pendiente y b es la ordenada al origen.

6.6.9 Morfología de las partículas.

La morfología externa de los polvos fue evaluada en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6610LV de alto vacío (USA) con una magnificación de 3000 a 4000x. Los polvos fueron recubiertos con oro de alta pureza en un equipo de deposición por plasma DENTON VACUUM DESK V (USA).

6.7 Análisis Estadístico.

Los resultados fueron el promedio de tres determinaciones experimentales. Los valores promedio no presentaron diferencias significativas. Los análisis de varianza ANOVA simple ($p < 0.05$) fueron obtenidos utilizando el software Statgrafics Centurion XIV, Statpoint Inc.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Interacción entre macromoléculas.

El pH del medio impactó fuertemente el potencial zeta de los polielectrolitos débiles goma de mezquite y quitosano (Borukhov y *otros*, 2000). Con el fin de localizar el intervalo de pH donde ambos polielectrolitos poseen la mayor diferencia de cargas, se determinó el cambio del potencial zeta en función del pH (Figura 12).

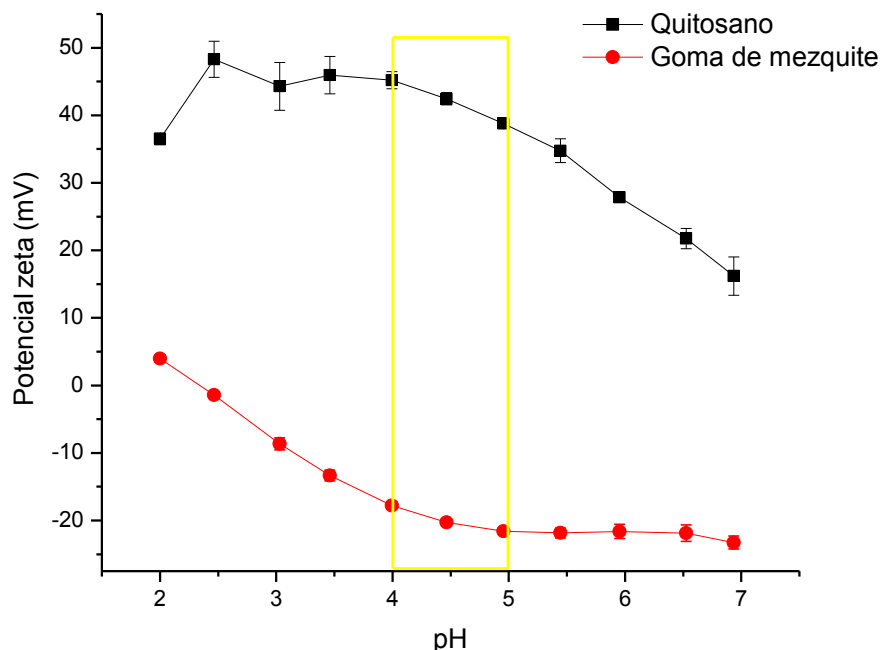


Figura 12 Perfil de titulación de goma de mezquite y quitosano en función del pH.

El quitosano presentó en pH 2.0 valores de densidad de carga positiva. En el intervalo de pH entre 2.5 a 3.5, el potencial zeta permaneció constante y a partir de pH 4.0 se observó un decremento de la carga neta de los segmentos de glucosamina debido a la proximidad a su pK_a (6.3-7.5) (Espinosa-Andrews y *otros*, 2013). La goma de mezquite mostró en pH 2.0 una carga positiva, debido probablemente a la protonación de los segmentos de ácido glucurónico (Liu y *otros*, 2009). Aryee y Nickerson (2012) reportaron en goma arábica una densidad de carga positiva en valores de pH <2.07. En pH 2.5, la goma de mezquite cambió de carga de positivo a negativo y al aumentar el pH de 2.5 a 4.5 la magnitud en el potencial zeta cambió debido a un incremento del

grado de ionización de los residuos del ácido glucurónico manteniéndose estable en valores de pH>4.5.

De acuerdo a los resultados (Figura 12), en un intervalo de pH entre 4.0 y 5.0 ambas macromoléculas poseen la mayor diferencia de cargas. Investigaciones previas reportaron que bajo estas condiciones, la formación de complejos electrostáticos puede efectuarse con mayor rapidez (García-Marquez y *otros*, 2015). Este intervalo es característico de cada par de polielectrolitos, ya que depende de la presencia de sales, naturaleza, grado de ionización y peso molecular de los polielectrolitos (Borukhov y *otros*, 2000). Por ejemplo, Weinbreck y *otros* (2004) obtuvieron en pH 4.0 una mayor diferencia de cargas entre proteína de suero de leche y goma arábica, An-Cheol y Youn-Ho (2009) en pH 6.0-6.5 (lactoalbumina α y β /quitosano) y Espinosa-Andrews y *otros* (2013) en pH 4.0 a 5.0 (goma arábica y quitosano).

Con base en estos resultados se prepararon siete diferentes mezclas de polielectrolitos goma de mezquite/quitosano a un valor de pH 4.5 (Tabla 3). Las mezclas de polielectrolitos fueron seleccionadas a partir de investigaciones previas, en el que relaciones de mezclado goma de mezquite/quitosano cercanas a 8.5:1 se observó la formación de una mayor concentración de complejos insolubles. A partir de estos resultados, se eligieron tres relaciones de mezclado mayores y tres relaciones menores a 8.5:1.

Tabla 3 Composición de mezclas de polielectrolitos

Mezcla	Masa goma de mezquite	Masa quitosano	Relación de mezclado inicial goma de mezquite/quitosano
C1	4.81	0.19	25:1
C2	4.61	0.38	12:1
C3	4.54	0.53	10:1
C4	4.47	0.53	8.5:1
C5	4.37	0.62	7:1
C6	4.17	0.83	5:1
C7	2.50	2.50	1:1

En la Figura 13 se muestra la formación de complejos electrostáticos goma de mezquite/quitosano.

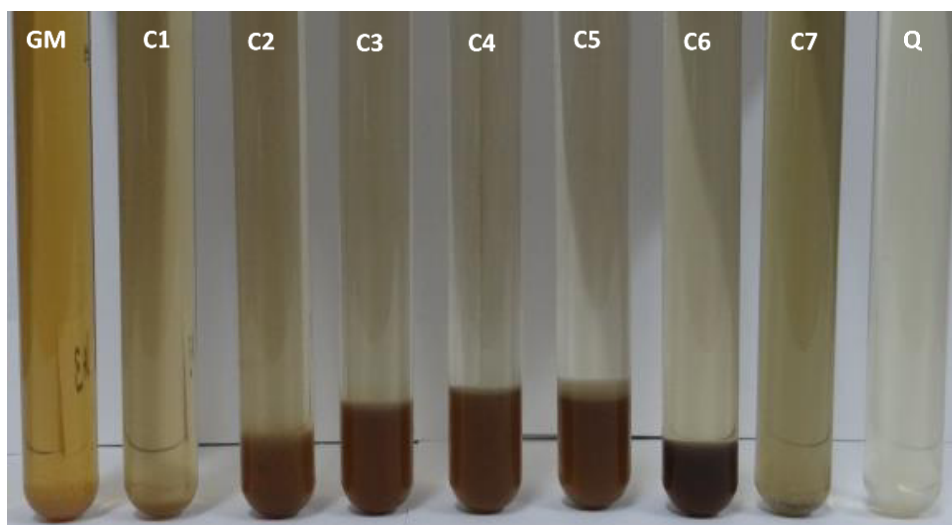


Figura 13 Formación de complejos electrostáticos goma de mezquite/quitosano.

Las interacciones electrostáticas entre los polielectrolitos de carga opuesta promovieron la formación de complejos dispersos en un sistema de fase única e insolubles formando un sistema de dos fases (Yang y otros, 2012).

Se observa que las dispersiones goma de mezquite y quitosano no presentaron la formación de agregados. Los sistemas C1 y C7 fueron caracterizados por la formación de una fase homogénea, mientras que los sistemas C2 a C6 fueron caracterizados por contener dos fases, observándose una mayor formación de complejos insolubles en los sistemas C4 y C5.

7.1.1 Complejos polielectrolitos

Después de 72 h de reposo, el sobrenadante obtenido en cada sistema fue caracterizado con la finalidad de evaluar la formación de complejos electrostáticos. El porcentaje de complejos dispersos, turbidez y potencial zeta del sobrenadante de mezclas de polielectrolitos se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4 Parámetros fisicoquímicos del sobrenadante de mezclas goma de mezquite/quitosano.

Mezcla	Complejos dispersos (%p/p)	Turbidez (cm ⁻¹)	Potencial zeta (mV)
C1	95.45±0.32 ^a	0.06±0.02 ^a	-11.86±2.71 ^a
C2	48.42±0.93 ^b	0.04±0.01 ^{a,b}	-3.19±0.99 ^b
C3	24.50±0.54 ^c	0.02±0.01 ^b	-2.59±0.60 ^b
C4	14.84±0.12 ^d	0.02±0.01 ^b	0.45±0.04 ^{b,c}
C5	17.74±0.47 ^e	0.02±0.01 ^b	3.86±1.45 ^c
C6	54.21±0.52 ^f	0.09±0.01 ^c	9.48±1.58 ^d
C7	93.07±0.85 ^g	0.13±0.01 ^d	37.30±1.73 ^e

Las letras indican diferencia significativa por columna en los 7 tratamientos evaluados en cada uno de los parámetros fisicoquímicos realizados. Los promedios con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

La turbidez en el sobrenadante indicó la formación de complejos electrostáticos dispersos en el sistema; donde el incremento de turbidez está asociado a cambios en tamaño y masa de los complejos (Ru y otros, 2012). La turbidez varió en función de la relación de mezclado inicial, mostrando en C2-C5 los valores más bajos. Estos resultados están relacionados a una menor concentración de macromoléculas en el sobrenadante, originados por la formación de complejos insolubles.

Las mezclas C6-C7 mostraron un aumento en la turbidez, debido al incremento en la dispersión de los complejos insolubles, aumentando la concentración de complejos dispersos (Elmer y otros, 2011; Espinosa-Andrews y otros, 2007). Con el incremento en la concentración de quitosano en las mezclas de polielectrolitos, se originó un cambio en la carga de los complejos en el sobrenadante de negativo a positivo. Valores negativos están relacionados con una mayor concentración del poli-anión (goma de mezquite), mientras que valores positivos son relacionados con una mayor concentración del poli-cation (quitosano) (Espinosa-Andrews y otros, 2013). Las mezclas entre C2-C5 presentaron los valores de potencial zeta más cercanos a cero, alcanzando una zona de máxima agregación (máxima formación de complejos insolubles). Resultados similares han sido obtenidos por Elmer y otros (2011), Guo-Qing y otros (2012), Klemmer y otros (2012), Espinosa-Andrews y otros (2013), Huang y otros (2014), entre otros.

CONCLUSIONES DE LA SECCIÓN

- La mayor diferencia de carga entre los polielectrolitos de carga opuesta fue ubicada en el intervalo de pH entre 4.0 y 5.0. En este intervalo, la formación de complejos electrostáticos puede efectuarse con mayor rapidez.
- La medición de los parámetros fisicoquímicos permitió estudiar las asociaciones atractivas entre los polielectrolitos de carga opuesta goma de mezquite/quitosano.
- La mayor formación de complejos electrostáticos dispersos se observó en las mezclas de polielectrolitos con mayor densidad de carga (C1 y C7), debido a que favoreció la repulsión electrostática.
- La formación de complejos insolubles fue favorecida, cuando la densidad de carga de la mezcla de los polielectrolitos se aproximó a cero.

7.2 Formación de emulsiones

A partir de los resultados de la sección 7.1, se prepararon las emulsiones multicapa de acuerdo con la metodología propuesta por Guzey y McClements (2006) (Tabla 5).

Tabla 5 Composición másica de emulsiones multicapa.

Clave	Fase dispersa Aceite pescado (%)	Capa 1 Goma de mezquite (%)	Capa 2 Quitosano (%)	Capa 3 Goma de mezquite (%)
E1	10	10	-	-
E2	4.81	4.81	0.19	-
E3	4.69	4.69	0.31	-
E4	4.62	4.62	0.38	-
E5	4.47	4.47	0.53	-
E6	4.17	4.17	0.83	-
E7	3.75	3.75	1.25	-
E8	3.13	3.13	1.04	2.50
E9	2.40	2.40	0.29	6.35
E10	1.56	1.56	0.19	6.75
E11	1.20	1.20	0.14	6.92
E12	0.68	0.68	0.08	7.17

A partir de la emulsión E1 (emulsión primaria) se añadieron concentraciones conocidas de Q (2% p/p) hasta obtener una emulsión secundaria (E7), a partir de esta emulsión se añadieron concentraciones conocidas de goma de mezquite (15% p/p) hasta obtener una emulsión terciaria (E12).

En la Figura 14 y Figura 15 se muestran las emulsiones multicapa de aceite de pescado y su caracterización fisicoquímica. La emulsión E1 fue caracterizada por presentar una fase homogénea estable al proceso de agregación, debido a la alta densidad de carga de los glóbulos en dispersión. La adición de quitosano en la emulsión (E1) favoreció la interacción electrostática entre los grupos amino del quitosano y grupos carboxilo de la goma de mezquite.

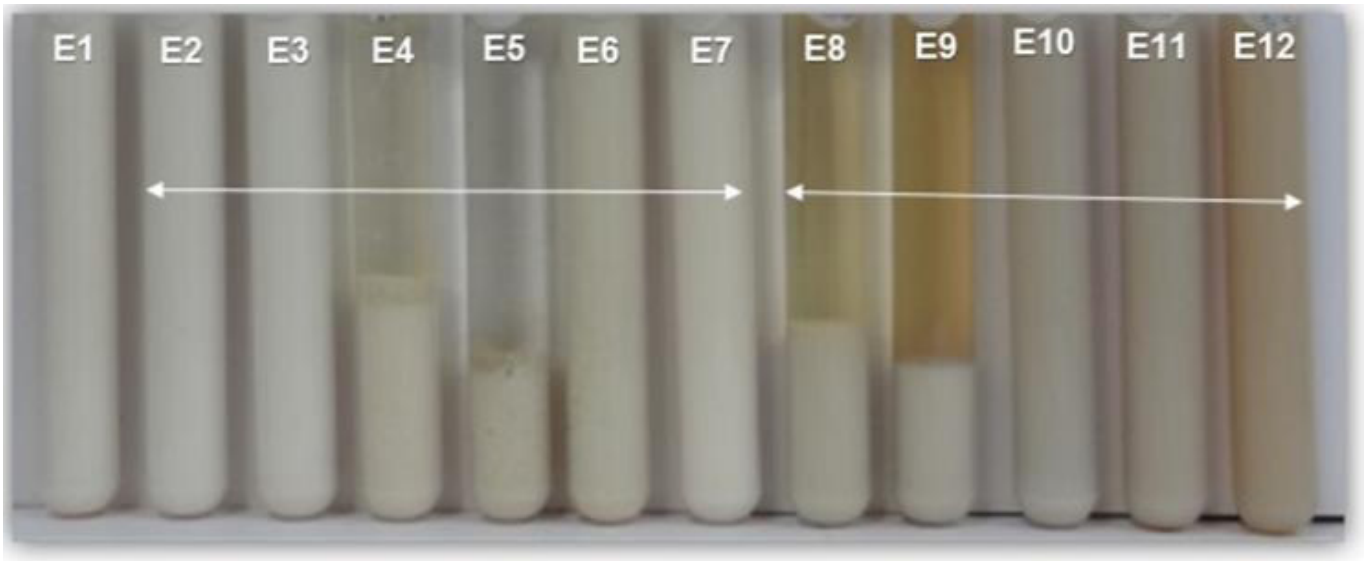


Figura 14 Emulsiones multicapa de aceite de pescado.

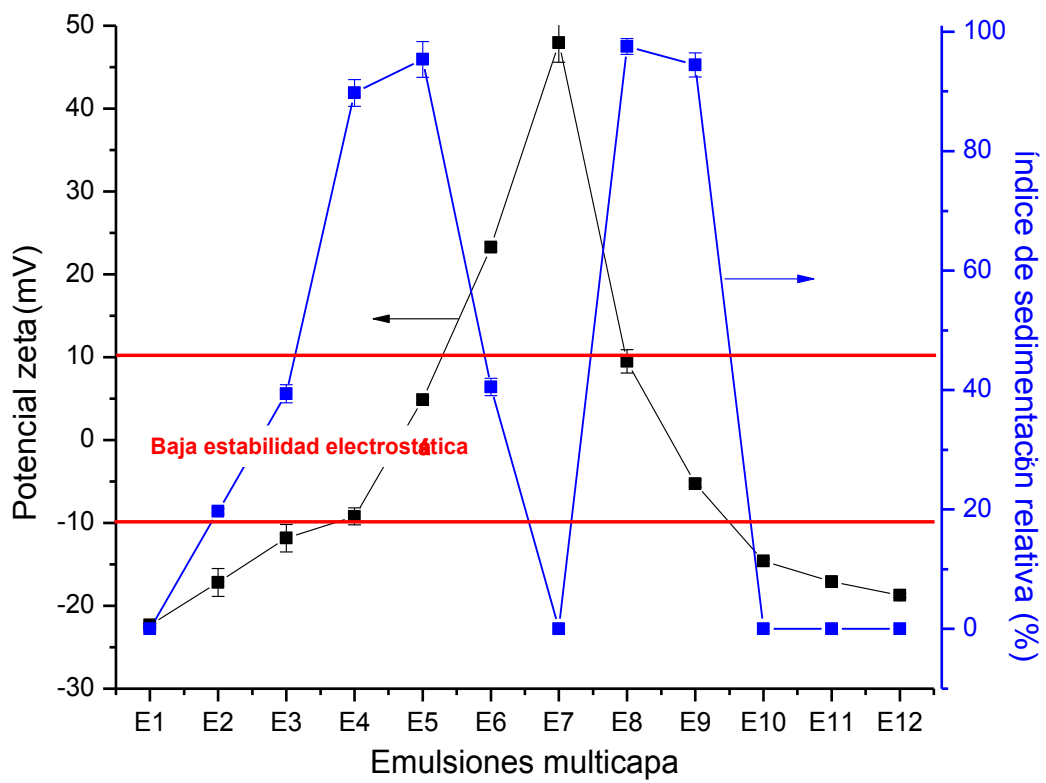


Figura 15 Potencial zeta e índice de sedimentación relativa en el sobrenadante de emulsiones multicapa..

El incremento de la concentración de quitosano propició la disminución de carga electrostática de los glóbulos, debido a la adsorción del quitosano sobre la superficie de dos o más glóbulos de la emulsión (floculación por puenteo), favoreciendo la formación de una red tridimensional (agregados) (Adachi y Xiao, 2013; Binks, 1998; McClements, 2005; Blijdenstein y *otros*, 2004). La máxima agregación fue observada en las emulsiones E4 y E5. Posteriormente, el incremento de la concentración de quitosano aumentó la densidad de carga del sistema originando la re-dispersión de los glóbulos en E6 y E7. El bajo porcentaje de agregación presentado en E7 (0% de agregación de glóbulos) indicó la generación de la bicapa (Stone y Nickerson, 2012; Fioramonti y *otros*, 2015). En una tercera etapa de acomplejamiento, conforme se fue añadiendo goma de mezquite a la emulsión E7, se observó la agregación de los glóbulos de la emulsión (sistemas E8 y E9) ocasionados por la floculación por puenteo, alcanzando la dispersión total de los glóbulos a partir de E10 (formación de la tricapa). Gu y *otros* (2004) evaluaron el efecto de la concentración de ι -carragenina (0-0.15%) en la densidad de carga de emulsiones primarias de β -lactoglobulina. Al incrementar la concentración de ι -carragenina, la densidad de carga de los glóbulos cambió de +60 a -63mV, alcanzando una neutralización de cargas y una máxima agregación de glóbulos (0.08-0.1% ι -carragenina). Perrechil y Cunha (2013) evaluaron el efecto de la concentración de κ -carragenina (0.05-1.0% p/v) en la estabilidad de emulsiones de caseinato de sodio. En una concentración de 1% p/v de κ -carragenina, obtuvieron una emulsión estable, en cambio a 0.5% 1% p/v de κ -carragenina presentó la formación de agregados.

Las emulsiones multicapa que presentaron la formación de agregados fueron descartadas para el proceso de secado por aspersion. Estos sistemas presentaron estructuras tipo gel, lo que hace imposible llevar a cabo la atomización en el proceso de secado por aspersion (McClements, 2005). Con base en estos resultados, fueron elegidas las emulsiones E1, E7 y E11 como candidatas al proceso de deshidratación por aspersion, debido a que mostraron una alta estabilidad a la agregación, manteniendo los glóbulos de emulsión dispersos en el sistema.

CONCLUSIONES DE LA SECCIÓN.

- Las emulsiones multicapa con densidad de carga cercanas a la electroneutralidad propiciaron la mayor formación de agregados.
- La formación de agregados macromoleculares es indeseable para el proceso de secado por aspersión debido a que su estructura tipo gel no favorece el rendimiento de secado.
- Las emulsiones E1, E7 y E11 fueron elegidas para ser microencapsuladas por secado por aspersión debido a que presentaron la dispersión total de los glóbulos.

7.3 Microencapsulación

A continuación se presentan los resultados de los parámetros fisicoquímicos de las microcápsulas obtenidas (Tabla 6) donde M_P corresponde a las microcápsulas obtenidas a partir de la emulsión E1, M_S a partir de E7 y M_T a partir de E11.

Tabla 6 Parámetros fisicoquímicos de microcápsulas de aceite de pescado.

Parámetro	M _P	M _S	M _T
Actividad de agua	0.17±0.01 ^a	0.23±0.01 ^b	0.32±0.01 ^c
Humedad (%)	0.86±0.08 ^a	2.87±0.14 ^b	4.27±0.15 ^c
Higroscopicidad (g agua/100g muestra)	8.01±0.02 ^a	8.68±0.17 ^b	9.77±0.02 ^c
Aceite total (%)	48.12±1.06 ^a	36.98±2.15 ^b	14.59±3.75 ^c
Aceite libre (%)	15.79±0.80 ^a	2.6±0.12 ^b	0.19±0.05 ^c
Eficiencia de encapsulación (%)	67.18±1.66 ^a	92.92±0.34 ^b	99.98±0.01 ^c

^{a,b,c} Los promedios en el mismo renglón son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Las microcápsulas de aceite de pescado mostraron una baja actividad de agua, bajo contenido de agua y baja higroscopicidad. Las microcápsulas M_T mostraron el valor de higroscopicidad más alto, debido a que contiene una mayor concentración de goma de mezquite en su capa externa. La higroscopicidad muestra la capacidad de adsorción de agua de las microcápsulas en un ambiente de humedad relativa controlada (75%). Altos valores de higroscopicidad indican una alta captación de humedad propiciando una disminución en la fluidez de los polvos.

La eficiencia de encapsulación en las microcápsulas disminuyó con el incremento de capas múltiples. Bajas eficiencias son relacionados con una baja fluidez y humectabilidad de los polvos, así como un alto grado de oxidación (Drusch y Berg, 2008). Aberkane y otros (2014) obtuvieron una eficiencia de encapsulación de 83% en microcápsulas de proteína de chícharo, mientras que las producidas con una bicapa (proteína de chícharo/pectina) presentaron una eficiencia de encapsulación de 77%.

Jiménez-Martín y otros (2015) reportaron un incremento en la eficiencia de encapsulación de 45.7% a 61.9% en microcápsulas bicapa lecitina/quitosano con el aumento de la concentración de quitosano, debido a la formación de una capa superficial más compacta.

7.3.1 Estabilidad oxidativa de las microcápsulas.

Se ha reportado que la estabilidad oxidativa de las microcápsulas es mayor en valores de actividad de agua entre 0.2-0.4 debido a que valores menores a 0.2 y mayores a 0.4, la difusión de oxígeno y velocidad de oxidación lipídica incrementa (Velasco y otros, 2003; Aberkane y otros, 2014).

La Figura 16 muestra el efecto del incremento del número de capas de polielectrolitos en la estabilidad oxidativa de microcápsulas de aceite de pescado durante su almacenamiento a 3 temperaturas (4, 20 y 40°C) a una actividad de agua de 0.11.

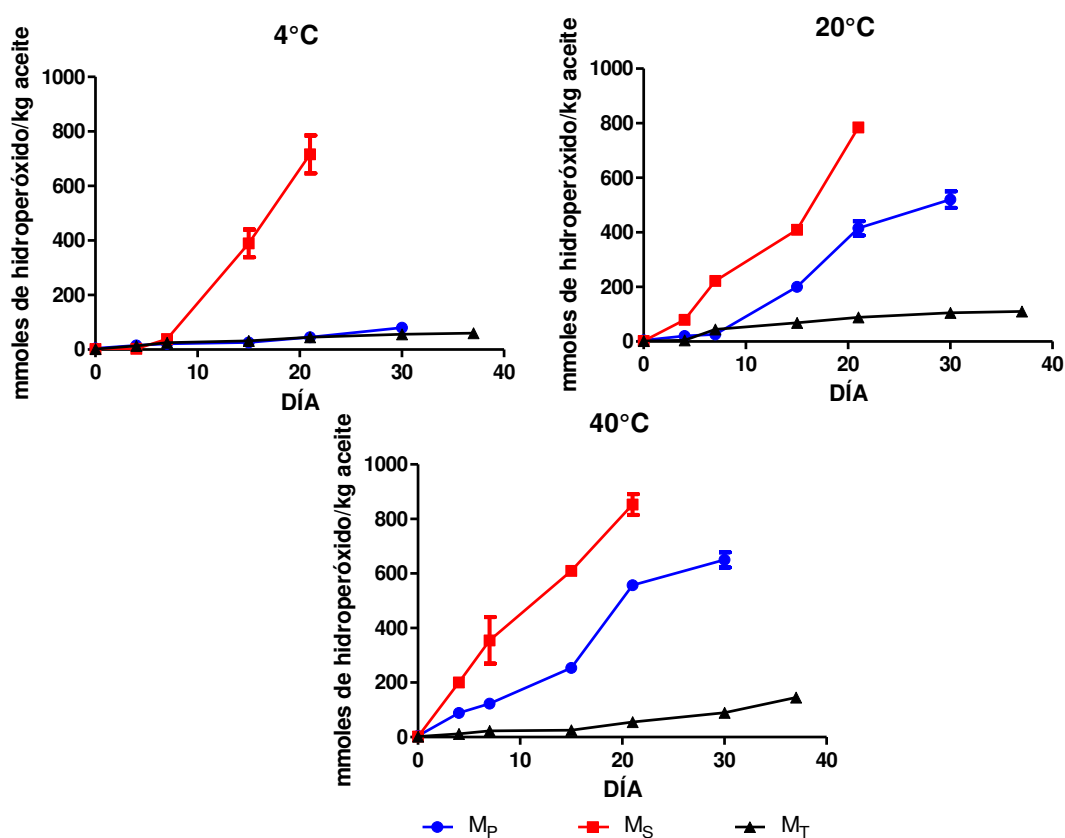


Figura 16 Formación de hidropéroxidos en microcápsulas de aceite de pescado a diferentes temperaturas.

Las microcápsulas M_P , M_S y M_T mostraron valores iniciales de hidroperóxidos de 2.2 ± 0.3 a 4.84 ± 0.9 mmoles de hidroperóxidos/kg de aceite, lo que indicó una baja degradación de los ácidos grasos poliinsaturados por las condiciones de procesamiento (emulsificación y temperatura de secado) (Aberkane y *otros*, 2014). El proceso de emulsificación favoreció la formación de hidroperóxidos debido a la inclusión de oxígeno por el intenso estrés mecánico al cual es sometida la emulsión primaria (Serfert y *otros*, 2009).

Las microcápsulas M_S mostraron la menor estabilidad oxidativa durante el almacenamiento a 3 temperaturas, alcanzando rápidamente los valores más altos de hidroperóxidos, debido probablemente a una elevada difusión de oxígeno a través de la matriz bicapa, la cual es un parámetro clave en la velocidad de oxidación (Serfert y *otros*, 2013a). En cambio, M_T mostró la mayor estabilidad oxidativa, este sistema está compuesto por una membrana interfacial de tres capas de polielectrolitos (goma de mezquite-quitosano-goma de mezquite), la cual actuó como una eficiente barrera física contra la difusión de oxígeno.

Serfert y *otros* (2013a) evaluaron la estabilidad oxidativa de microcápsulas monocapa (lecitina) y bicapa (lecitina/quitosano) de aceite de pescado durante su almacenamiento (20°C y 33% HR). Las microcápsulas monocapa mostraron una mayor estabilidad oxidativa que las microcápsulas bicapa. En cambio Serfert y *otros* (2013b) obtuvieron en microcápsulas bicapa una mayor estabilidad oxidativa. Resultados similares han sido reportados por Aberkane y *otros* (2014), en las que microcápsulas bicapa proteína de chicharo/pectina mostraron una mayor estabilidad oxidativa que las microcápsulas monocapa, durante su almacenamiento a 33% de humedad relativa.

En otras investigaciones, Jiménez-Martín y *otros* (2015) reportaron en microcápsulas bicapa con una concentración de quitosano de 0.125%, una menor estabilidad oxidativa que las microcápsulas monocapa durante el almacenamiento. Sin embargo, el aumento en la concentración de quitosano (0.250%) ocasionó una mayor estabilidad oxidativa.

En nuestros resultados, las cinéticas de oxidación presentaron un orden de reacción cero (**Anexo C**), debido a que la velocidad de formación de hidroperóxidos no dependió de la concentración de los ácidos grasos poliinsaturados (sustrato) (Fogler 2001).

La constante de reacción (k) presentó una dependencia con la temperatura tipo Arrhenius: $k = A * e^{-\frac{Ea}{RT}}$; donde A es el factor pre-exponencial o factor de frecuencia (mismas unidades de k) y Ea es la energía de activación (KJ/mol) (Figura 17).

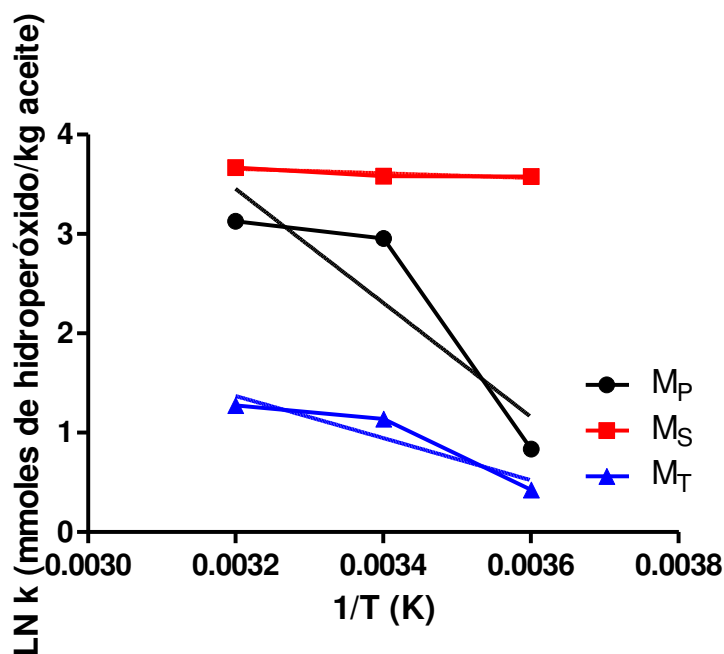


Figura 17 Dependencia lineal de LN k respecto a $1/T$.

El valor k para las microcápsulas M_P y M_T aumentó de manera exponencial con el incremento de la temperatura, en cambio en M_S la formación de hidroperóxidos no dependió de la temperatura.

La energía de activación se relaciona con la barrera de energía que deben superar los sustratos (ácidos grasos poliinsaturados) para transformarse en productos (hidroperóxidos), por lo que un valor elevado de Ea resultó en un valor menor de k y una baja velocidad de reacción (Fogler 2001).

Los parámetros cinéticos en la formación de hidroperóxidos en microcápsulas se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7 Parámetros cinéticos de la formación de hidroperóxidos en microcápsulas de aceite de pescado.

Matriz	T (°C)	k (mmol hidroperóxidos* kg aceite ⁻¹ * días ⁻¹)	R ²	Ea (KJ/mol)	R ²
M _P	4	2.30 ± 0.31	0.9698	47.9 ± 29.83 ^a	0.9362
	20	19.22 ± 2.13	0.9462		
	40	22.85 ± 2.44	0.9563		
M _S	4	35.81 ± 5.95	0.9234	1.90 ± 0.98 ^b	0.7909
	20	35.99 ± 4.19	0.9608		
	40	39.25 ± 1.98	0.9924		
M _T	4	1.53 ± 0.14	0.9561	17.61 ± 6.90 ^a	0.8669
	20	3.11 ± 0.44	0.9086		
	40	3.57 ± 0.47	0.9187		

Las microcápsulas M_S presentaron la menor energía de activación, ya que requirió una menor cantidad de energía para comenzar el proceso de oxidación lipídica.

Rojas-Padilla y otros (2010) reportaron valores de energía de activación de 41.8 a 104.605 KJ/mol para reacciones de oxidación de lípidos. *Klinkesorn y Geraldine (2012)* evaluaron la influencia de la temperatura (5, 10, 15 y 25°C) en la estabilidad oxidativa de emulsiones multicapa lecitina/quitosano durante su almacenamiento por 28 días. La temperatura de almacenamiento incrementó la formación de hidroperóxidos, obteniendo una cinética de reacción de orden cero y una energía de activación de 83.2 kJ/mol. *Michel-Barba (2014)* investigó la estabilidad oxidativa en microcápsulas de aceite de linaza liofilizados, utilizando como materiales de pared goma arábica y quitosano. En su estudio, reportó valores de energía de activación de 15.05 a 47.43 KJ/mol, mostrando las microcápsulas bicapa goma arábica/quitosano la menor energía de activación.

7.3.2 Microscopia electrónica de barrido (MEB)

La Figura 18 muestran las morfologías superficiales de las microcápsulas M_P , M_S y M_T .

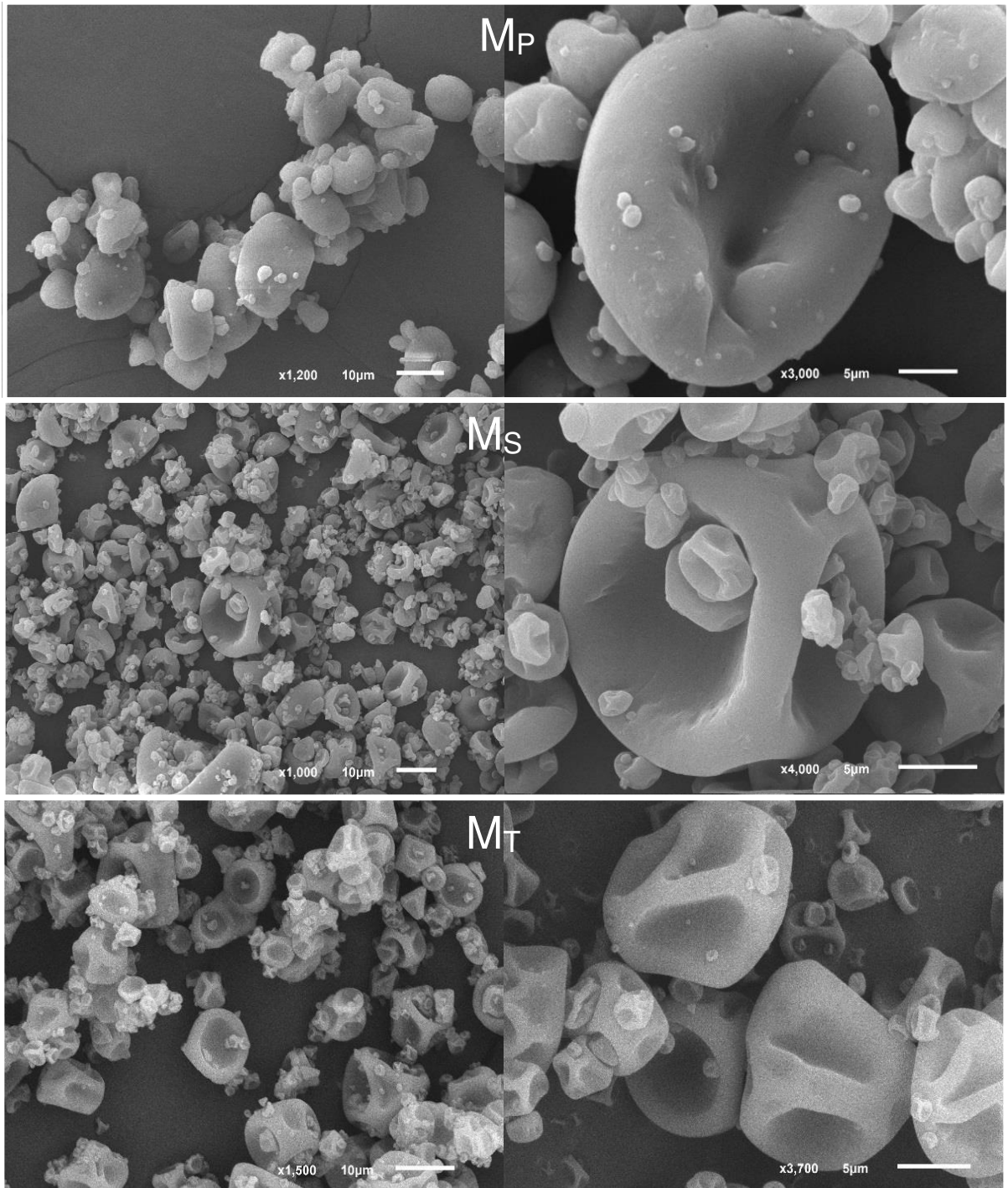


Figura 18 Morfología externa de microcápsulas: monocapa (M_P), bicapa (M_S) y tricapa (M_T).

Las partículas exhibieron una forma cóncava con superficie irregular y varios tamaños de partícula (entre 9.2 y 17.1 μm), las cuales son típicos de polvos secados por aspersión. Las partículas no presentaron fisuras o rupturas de la superficie externa. M_P presentó una expansión causada por una rápida fijación de la estructura en la primera etapa del secado y una subsecuente formación de vapor de agua en el interior de la partícula hasta un límite donde la partícula colapsó (Drusch *y otros*, 2007; Rodríguez-Huezo *y otros*, 2004). Las microcápsulas M_S y M_T mostraron estructuras colapsadas con formas irregulares, las cuales son resultado de la rápida evaporación del agua y un lento proceso de formación de la película alrededor de la fase dispersa durante el proceso de secado (Frascareli *y otros*, 2012; Aniesrani-Delfiy *y otros*, 2015). Esta morfología ha sido reportada previamente por Aniesrani-Delfiy *y otros* (2015) y Rodríguez-Huezo *y otros* (2004) utilizando como material encapsulante goma arábica y goma de mezquite, respectivamente.

Conclusiones de sección

- El incremento del número de capas en microcápsulas de aceite de pescado proporcionó una mayor eficiencia de encapsulación y mayor estabilidad oxidativa.
- Las microcápsulas bicapa mostraron la menor estabilidad oxidativa y menor energía de activación.
- El aumento de la temperatura de almacenamiento incrementó la velocidad de oxidación del aceite de pescado contenido en las microcápsulas M_P y M_T.
- El número de capas influyó en el grado de aglomeración de las microcápsulas.
- La composición de la membrana externa afectó la morfología de las microcápsulas.

8 CONCLUSIONES GENERALES.

- El estudio de los parámetros fisicoquímicos, potencial zeta, concentración de complejos dispersos y turbidez permitieron confirmar las zonas estables e inestables a la agregación.
- La relación de polielectrolitos goma de mezquite/quitosano fue el parámetro más importante en la formación de emulsiones multicapa.
- Las emulsiones multicapa con densidad de carga cercanas a la electroneutralidad (E4, E5, E8 y E9) mostraron la mayor inestabilidad a la agregación.
- Las emulsiones multicapa estables a la agregación (E7 y E11) fueron secadas por aspersión.
- El número de capas influyó en la estabilidad oxidativa de las microcápsulas de aceite de pescado, obteniendo M_T la mayor estabilidad oxidativa.

9 PERSPECTIVAS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

- Conocer el perfil de liberación del aceite de pescado contenido en las microcápsulas M_T.
- Desarrollar microcápsulas empleando quitosano con diferente grado de desacetilación y evaluar la estabilidad oxidativa.

10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aberkane, L., Roudaut, G., y Saurel, R. "Encapsulation and Oxidative Stability of Pufa-Rich Oil Microencapsulated by Spray Drying Using Pea Protein and Pectin." *Food Bioprocess Technology* 7 (2014): 1505-17.
- Adachi, Y., y Xiao, J. "Initial Stage of Bridging Flocculation of Psl Particles Induced by an Addition of Polyelectrolyte under High Ionic Strength." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 435, no. 20 (2013): 127–31.
- Alamed, J., Mcclements, J., y Decker, E. "Influence of Heat Processing and Calcium Ions on the Ability of Edta to Inhibit Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions Containing Omega-3 Fatty Acids." *Food Chemistry* 95 (2006): 585-90.
- An-Cheol, L., y Youn-Ho, H. "Coacervate Formation of a-Lactalbumin–Chitosan and B-Lactoglobulin–Chitosan Complexes." *Food Research International* 42 (2009): 733-38.
- Aniesrani-Delfiy, D., Thangavel, K., Natarajan, N., Kasthuri, R., y Kailappan, R. "Microencapsulation of Turmeric Oleoresin by Spray Drying and in Vitro Release Studies of Microcapsules." *Journal of Food Process Engineering* 38 (2015): 37–48.
- Aryee, F., y Nickerson, M. "Formation of Electrostatic Complexes Involving Mixtures of Lentil Protein Isolates and Gum Arabic Polysaccharides." *Food Research International* 48 (2012): 520–27.
- Binks, B. *Modern Aspects of Emulsion Science*. Emulsion Flocculation and Creaming. The Royal Society Of Chemistry, 1998.
- Blijdenstein, T., Winden, A. V., Vliet, T. V., Linden, E. V. D., y Aken, G. V. "Serum Separation and Structure of Depletion- and Bridging-Flocculated Emulsions: A Comparison." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering* 245 (2004): 41-48.
- Borukhov, I., Andelman, D., Borrega, R., Cloitre, M., Leibler, L., y Orland, H. "Polyelectrolyte Titration: Theory and Experiment." *Journal of Physical Chemistry B* 104 (2000): 11027-34.
- Cardenas, A., Arguelles-Monal, W., Goycoolea, F. M., Higuera-Ciapara, I., y Peniche, C. "Diffusion through Membranes of the Polyelectrolyte Complex of Chitosan and Alginate." *Macromolecular Bioscience* 3 (2003): 535–39.
- Carreira, A., Gonçalves, F., Mendonça, P., Gil, M., y Coelho, J. "Temperature and Ph Responsive Polymers Based on Chitosan: Applications and New Graft Copolymerization Strategies Based on Living Radical Polymerization." *Carbohydrate Polymers* 80 (2010): 618-30.
- Castro-González, M. I. "Ácidos Grasos Omega 3: Beneficios Y Fuentes." *Interciencia* 27, no. 3 (2002): 128-36.
- Coronado-Herrera, M., Vega-León, S., Gutiérrez-Tolentino, R., García-Fernández, B., y Díaz-González, G. "Los Ácidos Grasos Omega-3 Y Omega-6: Nutrición, Bioquímica Y Salud." *Revista de Educación Bioquímica* 25, no. 3 (2006): 72-79.
- Chaiyasit, W., Ryan Elias, Mcclements, J., y Decker, E. "Role of Physical Structures in Bulk Oils on Lipid Oxidation." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47 (2007): 299-317.

- Chen, X., y Mujumdar, A. *Drying Technology in Food Processing*. Spray Drying of Food Materials- Process and Product Characteristics. Blackwell Publishing, 2008.
- Choe, E., y Min, D. "Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 5 (2006): 169-86.
- Chuan, T., y Xin, L. "Microencapsulation Properties of Soy Protein Isolate and Storage Stability of the Correspondingly Spray-Dried Emulsions." *Food Research International* 52 (2013): 419-28.
- Danviriyakul, S., McClements, D., Decker, E., Nawar, W., y Chinachoti, P. "Physical Stability of Spray-Dried Milk Fat Emulsion as Affected by Emulsifiers and Processing Conditions." *Food Engineering and Physical Properties* 67, no. 6 (2002): 2183-89.
- Decher, G., Hong, J., y Schmitt, J. "Buildup of Ultrathin Multilayer Films by a Self-Assembly Process: Iii. Consecutively Alternating Adsorption of Anionic and Cationic Polyelectrolytes on Charged Surfaces." *Thin Solid Films* 210, no. 211 (1992): 831-35.
- Desai, K., y Park, H. "Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients ". *Drying Technology* 23 (2005): 1361–94.
- Dickinson, E. "Hydrocolloids as Emulsifiers and Emulsion Stabilizers." *Food Hydrocolloids* 23 (2009): 1473–82.
- Dickinson, E. "Hydrocolloids at Interfaces and the Influence on the Properties of Dispersed Systems." *Food Hydrocolloids* 17 (2003): 25-39.
- Djordjevic, D., Cercaci, L., Alamed, J., McClements, J., y Decker, E. "Chemical and Physical Stability of Citral and Limonene in Sodium Dodecyl Sulfate-Chitosan and Gum Arabic-Stabilized Oil-in-Water Emulsions." *Journal Agricultural and Food Chemistry* 55 (2007): 3585-91.
- Dobrynin, A., y Rubinstein, M. "Theory of Polyelectrolytes in Solutions and at Surfaces." *Program. Polymers Science* 30 (2005): 1049-118.
- Drusch, S., y Berg, S. "Extractable Oil in Microcapsules Prepared by Spray-Drying: Localisation, Determination and Impact on Oxidative Stability." *Food Chemistry* 109 (2008): 17–24.
- Drusch, S., Serfert, Y., Scampicchio, M., Schmidt, B., y Schwarz, K. "Impact of Physicochemical Characteristics on the Oxidative Stability of Fish Oil Microencapsulated by Spray-Drying." *Journal Agricultural and Food Chemistry* 55 (2007): 11044–51.
- Elmer, C., Karaca, A., Low, N. H., y Nickerson, M. T. "Complex Coacervation in Pea Protein Isolate–Chitosan Mixtures." *Food Research International* 44 (2011): 1441-46.
- Espinosa-Andrews, H., Baez-Gonzalez, J., Cruz-Sosa, F., y Vernon-Carter, J. "Gum Arabic-Chitosan Complex Coacervation." *Biomacromolecules* 8 (2007): 1313-18.
- Espinosa-Andrews, H., Enríquez-Ramírez, K. E., García-Márquez, E., Ramírez-Santiago, C., Lobato-Calleros, C., y Vernon-Carter, J. "Interrelationship between the Zeta Potential and Viscoelastic Properties in Coacervates Complexes." *Carbohydrate Polymers* 95 (2013): 161- 66.

- Fioramonti, S., Martinez, M., Pilosof, A., Rubiolo, A., y Santiago, L. "Multilayer Emulsions as a Strategy for Linseed Oil Microencapsulation: Effect of Ph and Alginate Concentration." *Food Hydrocolloids* 43 (2015): 8-17.
- Frascareli, E., Silva, V., Tonon, R., y Hubinger, M. "V of Coffee Oil by Spray Drying." *Food and Bioproducts Processing* 90 (2012): 413-24.
- García-Marquez, E., Roman-Guerrero, A., Cruz-Sosa, F., Lobato-Calleros, C., Alvarez-Ramírez, J., Vernon-Carter, E. J., y Espinosa-Andrews, H. "Effect of Layer (Calcium Phosphate-chitosan)-by-Layer (Mesquite Gum) Matrix on Carotenoids-in-Water-Emulsion Properties." *Food Hydrocolloids* 43 (2015): 451-58.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., y Saurel, R. "Applications of Spray-Drying in Microencapsulation of Food Ingredients: An Overview." *Food Research International* 40 (2007): 1107-21.
- Gharsallaoui, A., Saurel, R., Chambin, O., Cases, E., Voilley, A., y Cayot, P. "Utilisation of Pectin Coating to Enhance Spray-Dry Stability of Pea Protein-Stabilised Oil-in-Water Emulsions ". *Food Chemistry* 122 (2010.): 447-54.
- Gibbs, B., Kermasha, S., y Mulligan, A. "Encapsulation in the Food Industry: A Review.". *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 50 (1999): 213-24.
- Gogus, U., y Smith, C. "N-3 Omega Fatty Acids: A Review of Current Knowledge." *International Journal of Food Science and Technology* 45 (2010): 417-36.
- Goycoolea, F., Arguelles-Monal, W., Peniche, C., y Higuera-Ciapara, I. "Chitin and Chitosan." *Novel Macromolecules in Food Systems* (2000): 265-308.
- Gu, Y., Decker, E., y McClements, J. "Influence of Ph and κ -Carrageenan Concentration on Physicochemical Properties and Stability of A-Lactoglobulin-Stabilized Oil-in-Water Emulsions." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, no. 11 (2004): 3626–32.
- Guo-Qing, H., Yan-Ting, S., Jun-Xia, X., y Yang, J. "Complex Coacervation of Soybean Protein Isolate and Chitosan." *Food Chemistry* 135 (2012): 534-39.
- Guzey, D., y McClements, D. "Formation, Stability and Properties of Multilayer Emulsions for Application in the Food Industry." *Advances in Colloid and Interface Science* 128, no. 130 (2006): 227-48.
- Heurtault, B. E., Saulnier, P., Pech, B., Jacques-Emile, P., y Jean-Pierre, B. "Physico-Chemical Stability of Colloidal Lipid Particles ". *Biomaterials* 24 (2003): 4283-300.
- Huang, G.-Q., Xiao, J.-X., Jia, L., y Yang, J. "Complex Coacervation of O-Carboxymethylated Chitosan and Gum Arabic." *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 64 (2014): 198–204.
- Jafari, S., y Bhandari, Y. "Effectiveness of Encapsulating Biopolymers to Produce Sub-Micron Emulsions by High Energy Emulsification Techniques." *Food Research International* 40 (2007): 862–73.
- Jafari, S., He, Y., y Bhandari, B. "Nano-Emulsion Production by Sonication and Microfluidization—a Comparison." *International Journal of Food Properties* 9 (2006): 475–85.

- Jafari, S., He, Y., y Bhandari, B. "Production of Sub-Micron Emulsions by Ultrasound and Microfluidization Techniques." *Journal of Food Engineering* 82 (2007): 478-88.
- Jiménez-Martín, E., Gharsallaoui, A., Pérez-Palacios, T., Ruiz-Carrascal, J., y Antequera-Rojas, T. "Suitability of Using Monolayered and Multilayered Emulsions for Microencapsulation of Ω -3 Fatty Acids by Spray Drying: Effect of Storage at Different Temperatures." *Food and Bioprocess Technology* 8 (2015): 100-11.
- Khoueiry, G., Rafeh, N. A., Sullivan, E., Saiful, F., Jaffery, Z., David Kenigsberg, Krishnan, S., Khanal, S., Bekheit, S., y Kowalski, M. "Do Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Reduce Risk of Sudden Cardiac Death and Ventricular Arrhythmias? A Meta-Analysis of Randomized Trials." *Heart & Lung* 42 (2013): 251-56.
- Kizilay, E., Kayitmazer, A., y Dubin, P. "Complexation and Coacervation of Polyelectrolytes with Oppositely Charged Colloids." *Advances in Colloid and Interface Science* 167 (2011): 24–37.
- Klemmer, K., Waldner, L., Stone, A., Low, N., y Nickerson, M. "Complex Coacervation of Pea Protein Isolate and Alginate Polysaccharides." *Food Chemistry* 130 (2012): 710-15.
- Klinkesorn, U. "The Role of Chitosan in Emulsion Formation and Stabilization." *Food Reviews International* 29 (2013): 371–93.
- Klinkesorn, U., y Geraldine, P. "Effect of Temperature on Lipid Oxidation Kinetics of Tuna Oil Two-Layers Emulsion During Storage." *Italian Journal of Food Science* 24, no. 4 (2012): 22-25.
- Klinkesorn, U., y Namatsila, Y. "Influence of Chitosan and Nacl on Physicochemical Properties of Low-Acid Tuna Oil-in-Water Emulsions Stabilized by Non-Ionic Surfactant." *Food Hydrocolloids* 23 (2009).
- Klinkesorn, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., Decker, E., y McClements, D. "Characterization of Spray-Dried Tuna Oil Emulsified in Two-Layered Interfacial Membranes Prepared Using Electrostatic Layer-by-Layer Deposition." *Food Research International* 39 (2006): 449-57.
- Klinkesorn, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., McClements, J., y Decker, E. "Stability of Spray-Dried Tuna Oil Emulsions Encapsulated with Two-Layered Interfacial Membranes." *Journal Agricultural Food Chemistry* 53 (2005a): 8365-71.
- Lee, L., Niknafs, N., Hancocks, R., y Norton, I. "Emulsification: Mechanistic Understanding." *Trends in Food Science and Technology* 31 (2013): 72-78.
- Liu, S., Cao, Y.-L., Ghosh, S., Rousseau, R., Low, N., y Nickerson, M. "Intermolecular Interactions During Complex Coacervation of Pea Protein Isolate and Gum Arabic." *Journal Agricultural Food Chemistry* 58 (2010): 552-56.
- Liu, S., Low, N., y Nickerson, M. "Effect of Ph, Salt, and Biopolymer Ratio on the Formation of Pea Protein Isolate-Gum Arabic Complexes." *Journal Agricultural and Food Chemistry* 57 (2009): 1521–26.
- López-Franco, Y., Córdova-Moreno, R., Goycoolea, F., Valdez, M., Juárez-Onofre, J., y Lizardi-Mendoza, J. "Classification and Physicochemical Characterization of Mesquite Gum (*Prosopis* Spp.)." *Food Hydrocolloids* 26 (2012): 159-66.

- López-Franco, Y., Goycoolea, F., María, M. V. A., y Barca, C. D. L. "Goma De Mezquite: Una Alternativa De Uso Industrial." *Interciencia* 31, no. 3 (2006): 183-89.
- McClements, D. *Food Emulsions Principles, Practices, and Techniques*. Emulsion Stability. CRC PRESS, 2005.
- McClements, D. "Non-Covalent Interactions between Proteins and Polysaccharides." *Biotechnology Advances* 24 (2006): 621-25.
- McClements, D., Decker, E., y Weiss, J. "Emulsion-Based Delivery Systems for Lipophilic Bioactive Components." *Concise Reviews/Hypotheses in Food Science* 72, no. 8 (2007): 109-24.
- Medina-Meza, I. G., Barnaba, C., y Barbosa-Cánovas, G. "Effects of High Pressure Processing on Lipid Oxidation: A Review." *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 22 (2014): 1-10.
- Michel-Barba, M. G. "Análisis Termodinámico De Mezclas De Biopolímeros Y Su Efecto En La Estabilidad Oxidativa En Encapsulados De Ácidos Grasos Poliinsaturados (Linum Usitatissimum) Liofilizados." Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C, 2014.
- Muller, D., y Okoro, C. "Production and Marketing of Gum Arabic." *NGARA Publication* 2 (2004): 1-89.
- O'Connor, N., y O'Brien, N. *Lipid Oxidation*. Springer Science+Business Media, Inc, 2006.
- Ogawa, S., Decker, E., y McClements, D. "Influence of Environmental Conditions on the Stability of Oil in Water Emulsions Containing Droplets Stabilized by Lecithin-Chitosan Membranes." *Journal Agricultural Food Chemistry* 51 (2003): 5522-27.
- Percival, M. "Antioxidants." *Clinical Nutrition Insights* 96, no. 98 (1998): 1-4.
- Perez-Orozco, J., Beristain, C., Espinosa-Paredes, G., Lobato-Calleros, C., y Vernon-Carter, E. "Interfacial Shear Rheology of Interacting Carbohydrate Polyelectrolytes at the Water–Oil Interface Using an Adapted Conventional Rheometer." *Carbohydrate Polymers* 57 (2004): 45-54.
- Perrechil, F., y Cunha, R. "Stabilization of Multilayered Emulsions by Sodium Caseinate and K-Carrageenan." *Food Hydrocolloids* 30 (2013): 606-13.
- Piorkowski, D., y McClements, D. "Beverage Emulsions: Recent Developments in Formulation, Production, and Applications." *Food Hydrocolloids* 42 (2014): 5-41.
- Priftis, D., Laugel, N., y Tirrell, M. "Thermodynamic Characterization of Polypeptide Complex Coacervation." *Langmuir* 28 (2012): 15947–57.
- Ravi-Kumar, M. "A Review of Chitin and Chitosan Applications." *Reactive & Functional Polymers* 46 (2000): 1-27.
- Ré, M. "Microencapsulation by Spray Drying." *Drying Technology: An International Journal* 16, no. 6 (1998): 1195-236.
- Rodea-González, D. A., Cruz-Olivares, J., Román-Guerrero, A., Rodríguez-Huezo, M. E., Vernon-Carter, E. J., y Pérez-Alonso, C. "Spray-Dried Encapsulation of Chia Essential Oil (*Salvia Hispanica* L.) in Whey Protein Concentrate-Polysaccharide Matrices." *Journal of Food Engineering* 111 (2012): 102-09.
- Rodríguez-Huezo, M., Pedroza-Islas, R., Prado-Barragán, L., Beristain, C., y Vernon-Carter, E. "Microencapsulation by Spray Drying of Multiple Emulsions

- Containing Carotenoids." *Food Engineering and Physical Properties* 69, no. 7 (2004): 351-59.
- Rojas-Padilla, C., Arteaga-Miñano, H., Barraza-Jáuregui, G., Méndez-Reyna, E., y Miano-Pastor, C. "Estimación De La Vida Útil De Corazones De Alcachofa (*Cynara Scolymus* L.) Marinados En Conserva Y El Contenido De Omega 3 Y Omega 6." *Scientia Agropecuaria* 1 (2010): 207-11.
- Roman-Guerrero, A., Orozco-Villafuerte, J., Perez-Orozco, J., Cruz-Sosa, F., Jimenez-Alvarado, R., y Vernon-Carter, E. "Application and Evaluation of Mesquite Gum and Its Fractions as Interfacial Film Formers and Emulsifiers of Orange Peel-Oil." *Food Hydrocolloids* 23 (2009): 708-13.
- Ru, Q., Wang, Y., Lee, J., Ding, Y., y Huang, Q. "Turbidity and Rheological Properties of Bovine Serum Albumin/Pectin Coacervates: Effect of Salt Concentration and Initial Protein/Polysaccharide Ratio." *Carbohydrate Polymers* 88 (2012): 838-46.
- Ruei-Yi, T., Pin-Wen, C., Ting-Yun, K., Che-Min, L., Da-Ming, W., Tzu-Yang, H., y Hsyue-Jen, H. "Chitosan/Pectin/Gum Arabic Polyelectrolyte Complex: Process-Dependent Appearance, Microstructure Analysis and Its Application." *Carbohydrate Polymers* 101 (2014): 752- 59.
- Ruxton, C., Reed, S., Simpson, M., y Millington, K. "The Health Benefits of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids: A Review of the Evidence." *Journal of Human Nutrition and Dietetics* 17 (2004): 449-59.
- Schultz, S., Wagner, G., Urban, K., y Ulrich, J. "High-Pressure Homogenization as a Process for Emulsion Formation." *Chemical Engineering & Technology* 27, no. 4 (2004): 361-68.
- Serfert, Y., Drusch, S., y Schwarz, K. "Chemical Stabilisation of Oils Rich in Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids During Homogenisation, Microencapsulation and Storage." *Food Chemistry* 113 (2009): 1106-12.
- Serfert, Y., Schröder, J., Mescher, A., Laackmann, J., Rätzke, K., Shaikh, M., Gaukel, V., Moritz, H., Schuchmann, H., Walzel, P., Drusch, S., y Schwarz, K. "Spray Drying Behaviour and Functionality of Emulsions with B-Lactoglobulin/Pectin Interfacial Complexes." *Food Hydrocolloids* 31 (2013b): 438-45.
- Serfert, Y., Schroder, J., Mescher, A., Laackmann, J., Shaikh, M., Ratzke, K., Gaukel, V., Schuchmann, H., Walzel, P., Moritz, H., Drusch, S., y Schwarz, K. "Characterization of the Spray Drying Behaviour of Emulsions Containing Oil Droplets with a Structured Interface." *Journal of Microencapsulation* 30, no. 4 (2013a): 325-34.
- Shanta, N., y Decker, E. "Rapid, Sensitive, Iron-Based Spectrophotometric Methods for Determination of Peroxide Values of Food Lipids." *Journal of AOAC International* 77, no. 2 (1994): 421-24.
- Shanta, N. C., y Decker, E. A. "Rapid, Sensitive, Iron-Based Spectrophotometric Methods for Determination of Peroxide Values of Food Lipids." *Journal of AOAC International* 77, no. 2 (1994): 421-24.
- Shchukina, E., y Shchukin, D. "Layer-by-Layer Coated Emulsion Microparticles as Storage and Delivery Tool." *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 17 (2012): 281–89.

- Stone, A., y Nickerson, M. "Formation and Functionality of Whey Protein Isolatee(Kappa-, Iota-,and Lambda-Type) Carrageenan Electrostatic Complexes." *Food Hydrocolloids* 27 (2012): 271-77.
- Tonon, R., Pedro, R., Grosso, C., y Hubinger, M. "Microencapsulation of Flaxseed Oil by Spray Drying: Effect of Oil Load and Type of Wall Material." *Drying Technology* 30 (2012): 1491–501.
- Velasco, J., Dobarganes, A., y Márquez-Ruiz, G. "Variables Affecting Lipid Oxidation in Dried Microencapsulated Oils." *Grasas y Aceites* 54, no. 3 (2003): 304-14.
- Vernon-Carter, E., Beristain, C., y Pedroza-Islas, R. "Mesquite Gum (Prosopis Gum)." *Novel Macromolecules in Food System* (2000): 217-38.
- Vernon-Carter, E., Gómez, S., Beristain, C., Mosqueira, G., Pedroza-Islas, R., y Moreno-Terrazas, R. "Color Degradation and Coalescence Kinetics of Aztec Marigold Oleoresin-in-Water Emulsions Stabilized by Mesquite or Arabic Gums and Their Blends." *Journal of Texture Studies* 27, no. 6 (1996): 625–41.
- Visakh, P., Bayraktar, O., y Picó, G. *Polyelectrolytes. Thermodynamics and Rheology*. Engineering Materials. Suiza: Springer, 2014.
- Weinbreck, F., Tromp, R., y Kruif, C. D. "Composition and Structure of Whey Protein/Gum Arabic Coacervates." *Biomacromolecules* 5 (2004): 1437-45.
- Xiang, G., Ma, Y., Jiang, X., y Mao, P. "Polyelectrolyte Multilayers on Magnetic Silica as a New Sorbent for the Separation of Trace Copper in Food Samples and Determination by Flame Atomic Absorption Spectrometry." *Talanta* 130 (2014): 192–97.
- Yang, Y., Anvari, M., Pan, C.-H., y Chung, D. "Characterisation of Interactions between Fish Gelatin and Gum Arabic in Aqueous Solutions." *Food Chemistry* 135 (2012): 555-61.
- Ye, A., Edwards, P., Gilliland, J., Jameson, G., y Singh, H. "Temperature-Dependent Complexation between Sodium Caseinate and Gum Arabic." *Food Hydrocolloids* 26 (2012): 82-88.
- Zhao, J., Xiang, J., Wei, T., Yuan, F., y Gao, Y. "Influence of Environmental Stresses on the Physicochemical Stability of Orange Oil Bilayer Emulsions Coated by Lactoferrin–Soybean Soluble Polysaccharides and Lactoferrin–Beet Pectin." *Food Research International* 66 (2014): 216-27.

ANEXOS

A. BARRIDO DE LONGITUD DE ONDA COMPLEJO TIOCIONATO-FIERRO⁺³

Con la finalidad de corroborar el espectro de absorción del complejo formado, se hizo un barrido de longitud de onda entre 350 a 1100 nm.

En la siguiente figura se muestra el espectro de absorción del complejo colorimétrico, obteniendo la mayor absorbancia a una longitud de onda de 505 nm.

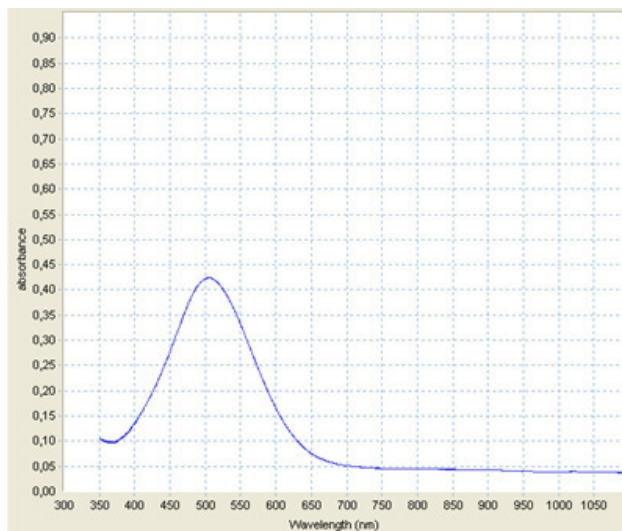


Figura 19 Espectro de absorción de complejo tiocianato férrico

B. CURVA DE CALIBRACIÓN

Con la finalidad de determinar la concentración de hidroperóxidos del aceite contenido en las microcápsulas, se hizo una curva de calibración utilizando como estándar los hidroperóxidos de cumeno a una concentración de 2.7 a 27 nmoles de hidroperóxidos de cumeno. Los resultados fueron graficados y ajustados a la ecuación general de la recta.

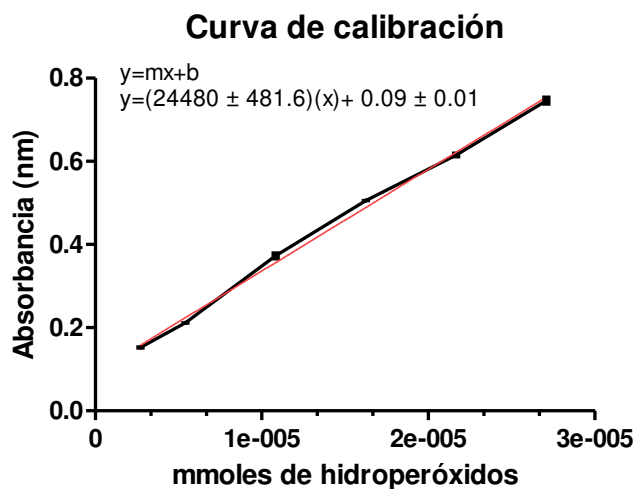


Figura 20 Curva de calibración de hidroperóxidos de cumeno.

C. PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA FORMACIÓN DE HIDROPERÓXIDOS COEFICIENTES DE REGRESIÓN LINEAL

Para determinar el orden de reacción se graficó lo siguiente:

ORDEN DE REACCIÓN	X	Y
0		[Concentración]
1	TIEMPO	LN[Concentración]
2		$\frac{1}{[Concentración]}$

Se ajustó a un modelo lineal, utilizando la ecuación general de la recta:

$$y = mx + b$$

Donde m es la pendiente y b es la ordenada al origen.

Tabla 8 Coeficientes de regresión lineal

ORDEN 0	4°C	20°C	40°C
M _P	0.9308	0.9528	0.9563
M _S	0.9234	0.9608	0.9924
M _T	0.9561	0.9086	0.9187
ORDEN 1	4°C	20°C	40°C
M _P	0.5594	0.9063	0.7274
M _S	0.9257	0.7253	0.6025
M _T	0.6743	0.6772	0.8545
ORDEN 2	4°C	20°C	40°C
M _P	0.5207	0.5257	0.3473
M _S	0.6981	0.4008	0.3887
M _T	0.3667	0.4975	0.4061.

Los mejores ajustes en cada temperatura proporcionaron el orden de reacción de las cinéticas de oxidación.