



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**LIBERACIÓN DE α -TOCOFEROL NANOENCAPSULADO
APLICADO COMO RECUBRIMIENTO EN MANZANA
RED DELICIOUS FRESCA-CORTADA Y REFRIGERADA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

VERONICA MIRANDA LINARES

**ASESORES: M. C. María de la Luz Zambrano Zaragoza
I.A. Alfredo Álvarez Cárdenas**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

D. F. C. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**



**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la **Tesis:**

Liberación de α -tocoferol nanoencapsulado aplicado como recubrimiento en manzana Red

Delicioso fresca-cortada y refrigerada

Que presenta la pasante: Veronica Miranda Linares

Con número de cuenta: 302765461 para obtener el Título de: Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcallí, Méx. a 05 de septiembre de 2011.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Juan Manuel Aceves Hernández	
VOCAL	I.Q. Guadalupe Franco Rodríguez	
SECRETARIO	M. en C. Ma. de la Luz Zambrano Zaragoza	
1er SUPLENTE	Dra. Ma. de los Angeles Cornejo Villegas	
2do SUPLENTE	I.A. Pablo Leodegario Navarro González	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

El presente trabajo fue financiado por el proyecto PAPIME PE203711 "Fortalecer el área de procesos y sistemas frigoríficos con atmósferas modificadas" de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM.

Y por el proyecto PAPIIT: IT231511-3 "Nanopartículas en recubrimientos comestibles para la conservación de frutas frescas cortadas" de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM.

AGRADECIMIENTOS

*A mis papás **Beto y Emma...** por su amor grandísimo e incondicional, por su apoyo, sus consejos, sus palabras de aliento, por ser un gran ejemplo de vida y fortaleza, por creer en mi y estar conmigo hasta el final...*

*A mis hermanitos **Dan y Bicho...** por hacer mi vida más divertida, por ser además de hermanos unos excelentes amigos y por ser un ejemplo a seguir...*

*A mi **Moyz...** por estar a mi lado estos últimos años en los que he aprendido tanto, por toda tu ayuda, tu apoyo y comprensión, pero sobre todo por tu gran amor y tantas risas...*

*A mi **gran y grandiosa familia...** porque cada uno de ustedes me ha mostrado siempre y de diferentes maneras su apoyo y amor, por ser parte esencial de mi vida...*

*A mis **amigos...** porque se han presentado en mi vida en el momento justo, por su cariño, apoyo y confianza...*

*A mis asesores **Maestra Luz y Prof. Alfredo...** por sus enseñanzas pero especialmente por todo su apoyo, dedicación y paciencia...*

*Al **Dr. David** y a tod@s l@s chic@s del **LIPTF...** por su orientación y su gran ayuda...*

*A la **UNAM...** porque tuve la fortuna de formar parte de tan importante institución...*

*A **Dios, a la vida y al destino...** por permitirme llegar hasta aquí y cerrar éste ciclo que por momentos parecía tan complicado...*

...Mil Gracias.

'Las decisiones son solamente el comienzo de algo. Cuando alguien toma una decisión, se zambulle en una poderosa corriente que le lleva hasta un lugar que jamás hubiera soñado en el momento de decidirse' - (Paulo Coelho)

RESUMEN

Recientemente se ha comenzado a estudiar el uso de la nanotecnología como método de conservación de alimentos debido a que por sus propiedades las nanocápsulas pueden emplearse como medios de transporte y liberación de aditivos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la velocidad y cinética de liberación de dl- α -tocoferol en distintos recubrimientos nanométricos así como su efecto en la dispersión de la luz ($^{\circ}$ HUE, cromaticidad, índice de oscurecimiento y velocidad de oscurecimiento) e influencia en la vida útil de manzanas *Red Delicious* frescas-cortadas y refrigeradas. Los recubrimientos nanométricos empleados fueron nanocápsulas (NCS), nanocápsulas con goma xantana (NCSX), nanoemulsión con goma xantana (NEX) y nanoesferas (NEsf) los cuales se compararon con goma xantana (GX) y cloruro de calcio (BCC). Las manzanas recubiertas con NCS y NCSX presentaron un menor oscurecimiento en función del tiempo representado por la velocidad de cambio de $^{\circ}$ HUE el cual fue de 0.28 en ambos casos; sin embargo, las NCS presentaron un comportamiento más homogéneo en cuanto al cambio de color con respecto al tiempo; este efecto se debe no sólo al tamaño nanométrico del recubrimiento sino también a la presencia de dl- α -tocoferol ya que las NEsf presentaron una velocidad de cambio de $^{\circ}$ HUE/día de 0.12 pero no existe homogeneidad en su comportamiento. Por otro lado los recubrimientos de NCSX y NEX en un principio presentan una mayor velocidad de liberación de la vitamina, $9E-3$ y $8.2E-3$ mg de dl- α -tocoferol/mg fruta*día respectivamente, mientras que NCS fue de $6.8E-3$ mg de dl- α -tocoferol/mg fruta*día; a pesar de esto, la liberación de NCSX y NEX fue una liberación instantánea cuyo comportamiento después del día 3 fue heterogéneo. Las NCS fueron el único recubrimiento que mostró una liberación constante del dl- α -tocoferol cuyos bajos coeficientes de difusión efectiva disminuyen de $4.15E-3$ a $1.43E-10$ cm^2/s en función del tiempo y permiten una liberación lenta por largos periodos de almacenamiento y por lo tanto un mayor tiempo de disponibilidad del dl- α -tocoferol.

ÍNDICE

	Pág.
INTRODUCCIÓN	x
I. ANTECEDENTES	
1.1 Alimentos frescos-cortados	1
1.1.1 Métodos de conservación de frutas frescas-cortadas	3
1.1.2 Manzana: características, producción y propiedades	5
1.1.3 Recubrimientos comestibles	7
1.2 Alimentos convenientes o de conveniencia	8
1.3 Alimentos saludables	8
1.4 Alimentos funcionales	8
1.5 Nanotecnología	10
1.5.1 Nanotecnología en alimentos	11
1.6 Nanopartículas	13
1.6.1 Nanoesferas	13
1.6.2 Nanocápsulas	13
1.7 Métodos de preparación de nanocápsulas	14
1.8 Caracterización de nanocápsulas	16
1.8.1 Tamaño de partícula	17
1.8.2 Potencial zeta (ζ)	17
1.8.3 Eficiencia de Encapsulación (EE)	19
1.8.4 Eficiencia de Liberación	19
1.9 Mecanismos de liberación controlada	20
1.10 Métodos de evaluación de la liberación	22

II. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL

2.1 Objetivo General	24
2.2 Objetivos Particulares	24
2.3 Materiales y reactivos	24
2.4 Materia prima	25
2.5 Actividades preliminares	25
2.5.1 Curvas de calibración	25
2.6 Preparación de nanocápsulas de dl- α -tocoferol	25
2.7 Preparación de nanoesferas	26
2.8 Preparación de nanoemulsión	26
2.9 Preparación de solución de dióxido de titanio	26
2.10 Preparación de recubrimientos	27
2.11 Caracterización de los sistemas de talla submicrónica	28
2.11.1 Tamaño de partícula e índice de polidispersión	28
2.11.2 Determinación de ζ	28
2.11.3 Microscopía electrónica de barrido	29
2.11.4 Determinación de la Eficiencia de Encapsulación	29
2.12 Recubrimiento de manzanas para pruebas de dispersión de luz y liberación <i>in vivo</i>	30
2.13 Análisis estadístico	33

III. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 Actividades preliminares	34
3.1.1 Barrido espectral	34
3.1.2 Curvas de calibración	35
3.1.3 Determinación de Eficiencia de Encapsulación	36

3.2 Caracterización de recubrimientos	37
3.2.1 Microscopía electrónica de barrido	38
3.3 Pruebas de dispersión de luz	40
3.3.1 Cambios en °HUE	41
3.3.2 Cambios de cromaticidad (C)	42
3.3.3 Velocidad de oscurecimiento	44
3.4 Liberación <i>in vivo</i> de dl- α -tocoferol	46
3.4.1 Determinación del coeficiente de difusión de NCS	47
3.4.2 Velocidad de liberación de dl- α -tocoferol	49
CONCLUSIONES	51
BIBLIOGRAFÍA	52

ÍNDICE DE TABLAS

No. de Tabla	Título de la Tabla	Pág.
1	Composición de manzana por 100 g de porción comestible	6
2	Resumen de las aplicaciones de la nanotecnología en la cadena de producción de alimentos	12
3	Diseño experimental para la comparación de la efectividad de los tratamientos	27
4	Datos de tamaño de partícula y ζ de diferentes recubrimientos	38
5	Datos obtenidos mediante una regresión lineal de la Fig. 14	37
6	Determinación de la VO de las manzanas con recubrimiento de NCS dividido en dos periodos	46
7	Determinación de la velocidad de liberación de dl- α -tocoferol	51

ÍNDICE DE FIGURAS

No. de Fig.	Título de la Fig.	Pág.
1	Nanopartículas biodegradables: nanocápsulas y nanoesferas	15
2	Potencial zeta	18
3	Eficiencia de encapsulación de nanocápsulas en función del método de preparación empleado	20
4	Esquema del comportamiento de la velocidad de liberación de sustancias activas	21
5	a) Corte de manzana en “gajos” para evaluación de IO; b) Corte en rodajas para pruebas de liberación	30
6	Diagrama de bloques de la preparación de muestras para las distintas pruebas	31
7	Curva de barrido espectrofotométrico de dl- α -tocoferol en EtOH	34
8	Curva de calibración de dl- α -tocoferol en CHCl ₃ evaluada a 285nm	35
9	Curva de calibración de dl- α -tocoferol en EtOH evaluada a 285nm	36
10	Superficie de manzana recubierta con NCSX	38
11	Superficie de manzana recubierta con NEX	39
12	Superficie de manzana recubierta con NCS	39
13	(a) Lote de manzanas tratadas con un recubrimiento de TiO ₂ en el que se aprecian las partículas blancas en la superficie de los gajos comparada con recubrimiento de NCS.	40
14	Evaluación del cambio de °HUE de manzana empleando diferentes recubrimientos.	41
15	Efectos sobre el color de diferentes recubrimientos después de 14 días de almacenamiento	43
16	Evaluación del cambio de cromaticidad de manzana empleando diferentes recubrimientos.	44
17	Velocidad de oscurecimiento de manzanas con diferentes recubrimientos a través de 14 días de almacenamiento	45

18	Liberación de dl- α -tocoferol por mg de manzana con diferentes recubrimientos durante 14 días de almacenamiento	47
19	Coefficiente de difusión efectiva de un recubrimiento de NCS en función del tiempo de almacenamiento	49
20	Curvas de velocidad de liberación de los recubrimientos que contenían dl- α -tocoferol	50

NOMENCLATURA

A	Absorbancia
A_{sl}	Área superficial del sistema de liberación controlada expuesto al medio de liberación (cm^2)
BCC	Blanco con cloruro de calcio
C	Coefficiente de difusión efectivo del dl- α -tocoferol en el recubrimiento (cm^2/s)
C_o	Concentración inicial del compuesto activo en el sistema matricial.
$C_{\alpha\text{-toc}}$	Concentración de dl- α -tocoferol en la formulación de nanocápsulas
C_p	Concentración del polímero en la formulación
C_r	Concentración real de dl- α -tocoferol
C_s	Solubilidad del compuesto activo en el medio polimérico
C_t	Concentración teórica de dl- α -tocoferol
D	Coefficiente de difusión efectivo del dl- α -tocoferol (cm^2/s)
EE	Eficiencia de encapsulación
GX	Goma xantana
$^{\circ}\text{HUE}$	Ángulo HUE
IO	Índice de oscurecimiento
L	Espesor del recubrimiento (cm)
$\lambda_{\text{máx}}$	Longitud de onda máxima
M_t	Cantidad de sustancia activa liberada a un tiempo t (g).
M_{∞}	Cantidad de sustancia activa liberada a en condiciones de equilibrio (g).
NCS	Nanocápsulas
NCSX	Nanocápsulas con goma xantana
NEX	Nanoemulsión con goma xantana
NEsf	Nanoesferas
NP	Nanopartículas

t	Tiempo (s).
VO	Velocidad de oscurecimiento
q_n	Raíces positivas de $\tan q_n = -\alpha q_n$
ζ	Potencial zeta

INTRODUCCIÓN

Desde hace algún tiempo se ha desarrollado la idea de que una alimentación natural permite una mejor calidad de vida en cuanto a salud se refiere, por esto y por el acelerado ritmo de vida actual, hay una creciente demanda de alimentos frescos, saludables y listos para usarse (Rico *et al.*, 2007). Los más comunes son los vegetales y frutas frescas-cortadas ya que aportan una buena porción de las vitaminas y minerales necesarias en la dieta; sin embargo, éstos presentan grandes dificultades para su conservación durante tiempos prolongados debido a su carácter altamente perecedero (Soliva-Fortuny y Martín-Belloso, 2003).

Después de la cosecha los frutos continúan vivos y respirando (Lozano, 2006), por lo tanto siguen los cambios químicos, físicos y bioquímicos que pueden causar reacciones de deterioro. La forma más común para reducir este tipo de daños es el empleo de bajas temperaturas, de ésta manera se detiene la degradación enzimática y la actividad respiratoria, se evita la pérdida de peso, se inhibe el crecimiento de microorganismos y se reduce la producción de etileno causante de la maduración de los frutos. No obstante, cuando se trata de frutos cortados, la aplicación de bajas temperaturas no es suficiente para detener algunas reacciones por lo que es necesario recurrir a otras técnicas que coadyuven a la refrigeración dando como resultado una mayor calidad del producto y menores pérdidas.

Una de estas técnicas es la nanotecnología en la cual se manipula la materia a nivel atómico y molecular, haciendo que los materiales manifiesten nuevas propiedades desconocidas a escala macro (Foladori e Ivernizzi, 2008). Esta tecnología ha sido ampliamente empleada en el área farmacéutica y ha ganado terreno en el área de los alimentos ya que aunque todavía son pocos los productos en el mercado que la emplean, ésta tiene el potencial de generar nuevos productos, procesos, envases etc. Se han estudiado diferentes y variadas aplicaciones de la nanotecnología dentro de la industria alimentaria, por ejemplo, el aseguramiento de la calidad y seguridad alimentaria, análisis de la composición, detección y neutralización de microorganismos y contaminantes abióticos detección de factores anti nutricionales y alérgenos y el control de procesos (Almengor, 2009).

Una de las formas de nanotecnología son las nanocápsulas las cuales tienen una estructura que consta de un centro líquido, generalmente un aceite, rodeado por una membrana polimérica (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998), lo que permite la liberación de sustancias como colores, olores, sabores, conservadores y nutrientes con el fin de desarrollar alimentos más saludables, nutritivos y/o con mejores características organolépticas. Además tienen propiedades de bloqueo UV atribuidas a su tamaño particularmente en rangos de 200 a 400 nm (Villalobos-Hernández y Müller-Gotmann, 2006).

Hasta el momento son pocos los estudios realizados sobre el uso de nanopartículas directamente sobre alimentos; uno de éstos trata acerca del empleo de nanocápsulas de dl- α -tocoferol aplicadas como recubrimiento en manzanas *Red Delicious* cortadas como método de conservación disminuyendo el oscurecimiento (Sánchez-Reyes, 2011), además, este recubrimiento hace de la manzana un alimento enriquecido. Es importante conocer la cantidad de dl- α -tocoferol encapsulada así como la cinética de liberación de la vitamina sobre la manzana con el fin de determinar el tipo y tiempo de liberación durante el cual la vitamina adicionada se encuentra disponible.

I. ANTECEDENTES

Desde un principio el hombre consciente de su necesidad de alimentarse, se preocupó de encontrar soluciones para alargar la vida de los alimentos. A través del tiempo se han hecho numerosos descubrimientos surgiendo así las diferentes clasificaciones de los productos alimentarios (Carballo, 1991). Estas clasificaciones pueden darse de acuerdo a diferentes aspectos como: origen, naturaleza, composición química, funciones en el organismo, métodos de conservación, facilidad de descomposición.

Ramírez *et al.* (2008) y Salas-Salvadó *et al.* (2008) mencionaron la clasificación de los alimentos en gamas de acuerdo al método de conservación.

I Gama: De los alimentos comercializados en bruto, los cuales requieren condiciones determinadas de almacenamiento como temperatura y humedad relativa.

II Gama: De las conservas y semiconservas, las cuales se envasan de forma impermeable a líquidos, gases y microorganismos. Reciben un tratamiento térmico que destruye enzimas, microorganismos, toxinas y esporas que pueden dañar al producto.

III Gama: De los Productos congelados y ultracongelados los cuales deben ser almacenados a temperaturas de -18°C .

IV Gama: Frutas y hortalizas crudas, envasadas al vacío o bajo atmósferas controladas. Generalmente se trata de productos seleccionados, limpios, desinfectados, blanqueados, secados, listos para su uso, calibrado e inspeccionados los cuales deben ser almacenados a temperaturas de refrigeración.

V Gama: De los alimentos preparados, envasados al vacío, cocinados dentro del empaque y listos para su uso simplemente recalentando.

1.1 Alimentos frescos-cortados

En la actualidad existe una creciente demanda de los alimentos pertenecientes a la IV y V Gama, en especial de aquellos alimentos frescos, saludables y convenientes como las frutas

y hortalizas ya que éstas contienen una buena porción de las vitaminas y minerales necesarias en la dieta (Ahvenainen, 1996; Allende *et al.*, 2006; Rico *et al.*, 2007).

Los alimentos frescos-cortados, también conocidos como mínimamente procesados, son definidos por la *International Fresh-cut Produce Association* (Asociación Internacional de Productos Frescos Cortados) como frutas o vegetales que han sido recortadas y/o peladas y/o cortadas hasta tener un 100% de producto utilizable que es embolsado o preenvasado para ofrecer a los consumidores alta nutrición, conveniencia y sabor mientras que aún mantienen su frescura (Rico *et al.*, 2007).

Balla y Farkas (2006) hacen referencia a dos definiciones para los procesos mínimos:

- a) Son aquellos que influyen mínimamente en las características cualitativas de un producto alimenticio, dando al mismo tiempo una vida de anaquel suficiente para su almacenamiento y distribución.
- b) Son las tecnologías que preservan los alimentos pero que también retienen su calidad nutricional y sus características sensoriales, reduciendo la dependencia que se tiene hacia el empleo del calor como el principal método de conservación.

No obstante, cumplir con los objetivos de este tipo de productos presenta grandes dificultades para la conservación de su frescura por tiempos prolongados ya que aún después de la cosecha los frutos continúan vivos y respirando (Lozano, 2006), por lo tanto se siguen presentando cambios químicos, físicos y bioquímicos que pueden causar reacciones de deterioro como la senescencia, descomposición enzimática, descomposición química y crecimiento microbiano, además, las heridas de los tejidos inducen desordenes fisiológicos como el ablandamiento y oscurecimiento los cuales deben ser minimizados (Soliva-Fortuny y Martín-Belloso, 2003).

La temperatura de almacenamiento es el factor más importante que afecta el deterioro de los alimentos frescos-cortados, generalmente se manejan temperaturas de refrigeración $\leq 5^{\circ}\text{C}$ (Ahvenainen, 1996) ya que así se disminuye la actividad respiratoria y la propagación de microorganismos (Balla y Farkas, 2006); sin embargo, con la finalidad de incrementar la vida útil de los productos, se puede combinar con otros métodos de conservación como el

uso de antioxidantes, antimicrobianos, atmósferas controladas entre otros (Allende *et al.*, 2006).

1.1.1 Métodos de conservación de frutas frescas-cortadas

El procesamiento mínimo de las frutas y vegetales tiene dos propósitos fundamentales: (a) es importante mantener el producto fresco y ofrecerlo en una forma conveniente sin perder su calidad nutricional; (b) el producto debe tener una vida de anaquel lo suficientemente larga para que pueda llegar hasta el consumidor final (Ahvenainen, 1996; Balla y Farkas, 2006).

Los métodos tradicionales de conservación que emplean altas temperaturas provocan cambios en la apariencia del alimento así como ablandamiento de la textura, formación de algunos compuestos aromáticos y pérdida de vitaminas y minerales (Balla y Farkas, 2006) por lo tanto para la conservación de frutas frescas-cortadas se emplean tecnologías no térmicas de manera que se garantice su seguridad y conservación así como para mantener las características de frescura típicas de las frutas el mayor tiempo posible (Allende *et al.*, 2006).

Las operaciones no térmicas de conservación más comunes empleadas en frutas frescas-cortadas son las siguientes:

- a) Adición de conservadores durante el lavado y desinfección.* Generalmente se utiliza cloro por su capacidad de disminuir la carga microbiana pero éste debe ser eliminado debido a su carácter tóxico. Otros antimicrobianos empleados son el peróxido de hidrógeno y ácidos orgánicos como el peroxiacético y el octanóico (Soliva-Fortuny y Martín-Belloso, 2003; Allende, 2006; Balla y Farkas, 2006).
- b) Inmersión después del corte.* Se realiza en una solución acuosa generalmente con compuestos antimicrobianos con la finalidad de eliminar las sustancias y enzimas dañinas liberadas que quedan sobre la superficie del producto. Es preferible emplear altas temperaturas ($\approx 60^{\circ}\text{C}$) ya que se acelera el proceso de difusión; sin embargo, no es conveniente para aquellas frutas en las que existe actividad de la polifenol oxidasa ya que en este caso se debe mantener la cadena de frío (Soliva-

Fortuny y Martín-Belloso, 2003). Otro inconveniente que presenta este método es que las sustancias son rápidamente neutralizadas y/o difundidas en la superficie del alimento de manera que limitan el efecto del compuesto antimicrobiano (Rojas-Graü *et al.*, 2009).

- c) **Irradiación UV.** Puede emplearse como medio de desinfección el agua, aire, superficies y contenedores así como directamente sobre la superficie de los frutos aunque dependiendo del tipo éstos pueden sufrir daños en los tejidos (Allende, 2006).
- d) **Ultrasonido.** En este método se emplean ondas de gran amplitud que forman burbujas de cavitación las cuales generan la energía mecánica que tiene una acción limpiadora en las superficies (Allende, 2006).
- e) **Atmósferas modificadas.** Se trata de crear un balance óptimo de gases dentro del envase donde la actividad respiratoria del producto sea lo más baja posible (Soliva-Fortuny y Martín-Belloso, 2003; Allende, 2006; Balla y Farkas, 2006, Martín-Belloso *et al.*, 2006). Son creadas de forma pasiva, utilizando materiales permeables a ciertos gases como el oxígeno (O₂) y el dióxido de carbono (CO₂); o activa, empleando mezclas de gases en la proporción adecuada de acuerdo con cada tipo de alimento junto con envases permeables (Ahvenainen, 1996).
- f) **Envases inteligentes.** Yam *et al.* (2005), los definieron como el sistema de envases capaz de llevar a cabo funciones inteligentes (detectar, registrar, trazar, comunicar y aplicar lógica científica) para facilitar la toma de decisiones que permiten alargar la vida útil de un producto, mejorar su calidad, proveer información y prevenir acerca de posibles problemas. Estos envases pueden hacer uso de uno varios dispositivos como por ejemplo códigos de barras, indicadores de gases, indicadores tiempo-temperatura, y biosensores entre otros.
- g) **Envases activos.** Son sistemas en los cuales el producto, el envase y el ambiente interactúan de forma activa para cambiar las condiciones de un envase para extender la vida útil o mejorar la seguridad alimentaria o propiedades sensoriales mientras se mantiene la seguridad del alimento. Pueden actuar como

absorbentes/emisores de un gas específico como O₂, etileno y/o CO₂; como medios de liberación de sustancias activas (antimicrobianos, antioxidantes, enzimas, sabores o nutraceuticos); absorbentes de humedad, entre otros (Brody *et al.*, 2001; Yam *et al.*, 2005, Dainelli *et al.*, 2008).

h) Películas y recubrimientos comestibles. Constan de capas delgadas de un material que puede ser consumido como parte del producto y puede tener diversas funciones; reducción de la pérdida de humedad, restricción de la entrada de oxígeno, disminución de la respiración, retardo de la producción de etileno, fijación de algunos componentes volátiles, además pueden contener aditivos que retarden la decoloración y el crecimiento microbiano (Ahvenainen, 1996).

1.1.2 Manzana: características y propiedades

Una de las frutas más importantes y más estudiadas es la manzana debido a la diversidad de procesos a los que se puede someter y a la gran variedad de productos y presentaciones que de ella se derivan.

La manzana común domesticada (*Malus domestica*) es un fruto climatérico, se cultiva de manera comercial en regiones templadas del mundo pero se adapta bien a climas donde la temperatura de invierno esta cercana a la congelación por al menos dos meses. La fase de producción de frutos comienza al final de la primavera cuando los árboles tienen flores blancas; después de la floración deben pasar 140-170 días para cosechar el fruto, en esta etapa se alcanza la madurez comercial. Un árbol nuevo de manzanas producirá frutos en aproximadamente 6 a 8 años. Estos frutos se consumen frescos o secos, en purés, mermeladas, conservas, congelados, jugos, o bebidas alcohólicas (Luby, 2003; Sinha, 2006).

Al igual que en México, a nivel mundial la variedad *Red Delicious* es una de las más producidas (SIAP, 2010) y por lo tanto de las más importantes y estudiadas debido a sus características.

El consumo de manzana está relacionado con su composición. En la Tabla 1, se muestran sus componentes, resaltando su aporte vitamínico, mineral y el aporte energético.

Las manzanas *Red Delicious* presentan una piel dura y resistente a magulladuras, seca, suave y brillante, de color rojo con líneas más oscuras. Tiene una forma alargada con pulpa muy firme, de textura granulosa y jugosa. Su sabor es dulce, ligeramente ácido y de aroma característico. Es muy buena para servir como postre y para jugos. Se tienen dificultades cuando se somete a secado, pero es buena presentada en rebanadas frescas-cortadas. En almacenamiento a temperatura ambiente puede durar hasta 4 meses y si se somete a atmósferas controladas puede durar hasta un año. No es sensible a daños por frío o a bajos niveles de O₂ pero puede presentar quemaduras si se cosecha antes de tiempo. (Hampson y Kemp, 2003).

Tabla 1. Composición de manzana por 100 g de porción comestible.

Agua (g)	85.7
Energía (kcal)	46
Proteína (g)	0.3
Lípidos (g)	0.35
Carbohidratos (g)	12
Fibra (g)	2
Vitaminas (mg)	10.53
Minerales (mg)	133.502

Fuente: Moreiras et al., 2005

Los indicadores de madurez de esta variedad son (NMX-FF-061-SCFI-2003):

- Cambio de color en la pulpa verde a crema
- Color de la piel rojo intenso
- Tamaño mediano a grande
- Firmeza, la cual se determina por pruebas de presión, para almacenamiento y proceso debe resistir 15 lb mientras que para consumo inmediato solo 13 lb.
- Concentración de sólidos solubles (11%)
- Acidez
- Contenido de almidón

El color en productos como las rebanadas de manzana es un índice de calidad importante, rebanadas de manzana oscuras son estéticamente no atractivas (Lee *et al.*, 2003). El

oscurecimiento enzimático se presenta en la superficie de las manzanas cortadas y es causado por la acción de la enzima polifenoloxidasas (PPO) la cual al romperse la pared celular se pone en contacto con los sustratos fenólicos y en presencia de oxígeno inicia la reacción que conduce a la formación de quinonas, éstas reaccionan con otros compuestos formando melaninas que son compuestos macromoleculares de color oscuro (Villegas-Ochoa *et al.*, 2006).

La intensidad del oscurecimiento y cambios de color está influenciada por la concentración de formas activas de la enzima y por el contenido de fenoles en el tejido vegetal; la distribución de PPO en diferentes partes de las frutas así como la relación entre partículas ligadas y enzimas solubles varía considerablemente con el grado de madurez, variedad del fruto y algunos factores medioambientales (Lamikanra, 2002, Villegas-Ochoa *et al.*, 2006). En manzanas la PPO se encuentra en toda la fruta; en algunas variedades se localiza principalmente cerca del centro y en segundo lugar cerca de la cáscara (Lamikanra, 2002).

1.1.3 Recubrimientos comestibles

Pavlat y Orts (2009) definen los recubrimientos comestibles como cualquier material usado para “envolver” un alimento con el fin de prolongar su vida útil el cual puede consumirse junto con el éste sin necesidad de removerlo. Tradicionalmente los recubrimientos comestibles han sido utilizados en la industria de los frescos-cortados como una estrategia para reducir los efectos del deterioro que los procesos provocan a los tejidos ya que inducen daños en la superficie aumentando la respiración y dando lugar al deterioro bioquímico como oscurecimiento, desarrollo de sabores y olores extraños, deterioro de la textura, crecimiento microbiano, proceso de senescencia y en consecuencia la pérdida de calidad en general (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2008).

Los recubrimientos comestibles tienen una amplia variedad de aplicaciones que permite utilizarlos en diferentes productos ya que proveen de una barrera semipermeable a gases como el O₂, CO₂, etileno (C₂H₄) y al vapor de agua de manera que se reduce la tasa de respiración, la velocidad de maduración y de las reacciones de oxidación, se evita la pérdida o ganancia de humedad dando como resultado el alargamiento de la vida útil del producto. También se emplean para prevenir daños físicos y resaltar la apariencia del

producto. Una de las mayores ventajas del uso de recubrimientos comestibles es que sirven como portadores de diferentes sustancias activas como antioxidantes, agentes antimicrobianos, colorantes, saborizantes y nutraceuticos de modo que se incrementa la seguridad del alimento (Lee *et al.*, 2003; Rojas-Graü *et al.*, 2008; Pavlath y Orts, 2009; Rojas-Graü *et al.*, 2009).

Los recubrimientos comestibles son una alternativa complementaria para el uso de bajas temperaturas y/o atmósferas modificadas. Una adecuada formulación puede ser una manera de controlar las pérdidas de calidad en la superficie debidas a los daños en los tejidos. Los recubrimientos comestibles pueden estar compuestos por uno o más ingredientes proteicos, lipídicos o de polisacáridos naturales aunque los polisacáridos y proteínas son normalmente lipofílicos y no tienen buen comportamiento como barreras al agua. Por el contrario, los recubrimientos lipídicos son hidrofílicos y funcionan muy bien como barreras al agua pero pueden ser incompatibles con las frutas frescas cortadas (Oms-Oliu *et al.*, 2008).

1.2 Alimentos convenientes o de conveniencia

Este tipo de alimentos pueden definirse como aquellos que reducen el tiempo y el esfuerzo tanto físico como mental requerido para llevar a cabo desde la compra, preparación y cocción de los alimentos hasta la limpieza después del consumo (de Boer *et al.*, 2004; Brunner *et al.*, 2010).

1.3 Alimentos saludables

Los productos saludables son presentados comúnmente como tipos de alimentos que contribuyen a una dieta sana por ejemplo: productos bajos en grasas, productos altos en fibra etc. sin hacer énfasis en el rol de un producto o componente particular (Urala y Lähteenmäki, 2004).

1.4 Alimentos funcionales

La dieta no es el único factor que afecta el bienestar y salud de las personas pero si es uno de los más importantes. Un alimento funcional es aquel similar en apariencia a los

alimentos convencionales y que promete a los consumidores mejoras fisiológicas en el cuerpo humano (Urala y Lähteenmäki, 2004), es decir, además de satisfacer el hambre y proveer los nutrientes necesarios se usa también para prevenir y tratar ciertos desordenes y enfermedades (Jiménez-Colmenero *et al.*, 2001; Menrad, 2003; Siró *et al.*, 2008).

Hay tres requerimientos básicos para que un alimento pueda ser considerado funcional: (a) es un alimento (no una cápsula, tableta o polvo) derivado de ingredientes naturales, (b) puede y debe ser consumido como parte de la dieta diaria; y (c) una vez ingerido debe regular procesos específicos como el incremento de los mecanismos de defensa biológica, prevención y tratamiento de enfermedades, control de condiciones físicas y mentales o retrasar el proceso de envejecimiento (Jiménez-Colmenero *et al.*, 2001).

Los alimentos funcionales han sido reportados como la tendencia con mayor crecimiento en la industria alimenticia (Verbeke, 2005). Este tipo de alimentos junto con los suplementos vitamínicos tienen un gran rango de aplicaciones incluyendo medicinales, terapéuticas y cosméticas. Algunos alimentos funcionales han sido desarrollados para proporcionar al consumidor aquellos nutrientes que pueden estar faltando en la dieta o que el cuerpo no puede producir y que no se encuentra suficientemente en los alimentos tradicionales (O'Connor y White, 2010).

Uno de los usos que se están investigando en cuanto a alimentos funcionales es la capacidad antioxidante de algunas vitaminas. Recientemente Muñoz (2010) publicó un artículo acerca de la determinación de la eficacia de un alimento funcional; se evalúa el efecto de una bebida que incluye vitaminas sobre la actividad física y su efecto antioxidante en adultos mayores sanos y que realizan ejercicio físico regular llegando a la conclusión de que el efecto fue significativo ya que previno el daño oxidativo en lípidos, proteínas y ADN, además de que normaliza los niveles de vitamina C en la sangre. De esta forma la ingesta de la bebida funcional contrarresta el estrés oxidativo inducido por el ejercicio regular.

Una de las vitaminas estudiadas es la vitamina E la cual es un importante antioxidante que puede ayudar a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, prevención del cáncer,

mejora del sistema inmune y alentamiento de los procesos de envejecimiento. (Chen y Wagner, 2004).

Como se mencionó antes, los recubrimientos comestibles tienen la gran ventaja de ser acarreadores de distintas sustancias activas lo que los convierte en una perfecta opción para la creación de alimentos funcionales y/o suplementos vitamínicos. Recientemente se ha comenzado a utilizar la nanotecnología también como medio de transporte para diferentes sustancias.

1.5 Nanotecnología

En el área de la conservación de alimentos la nanotecnología es una nueva y novedosa tecnología que trata acerca de medir, ver, manipular y fabricar materiales a escalas individuales y muy pequeñas en un rango que va de 1 a 1000 nanómetros. Un nanómetro es la millonésima parte de un milímetro; como referencia tenemos que un virus mide entre 20 y 300 nanómetros, y un cabello humano aproximadamente 80,000 nanómetros (Bhushan, 2003; Rao *et al.*, 2004; Foladori e Ivernizzi, 2008; Kenneth, 2008; Pichot, 2008; De Azeredo, 2009). Es una tecnología fusionada y altamente multidisciplinaria que se ha convertido en un área de investigación vital y activa y que se está desarrollando rápidamente y se extiende a casi todos los campos de la tecnología (Islam y Miyazaki, 2009).

El tamaño que maneja la nanotecnología permiten tener una gran área superficial por unidad de volumen y masa dando como resultado una mayor actividad (Mamalis, 2007; Nagarajan, 2008).

La materia a escala tan pequeña manifiesta propiedades diferentes a como se conoce en mayores tamaños (Nagarajan, 2008), por ejemplo la reactividad química y la conductividad eléctrica con las que se pueden hacer productos que cumplan múltiples funciones, que sean más eficientes y que interactúen de manera inteligente con el medio (Foladori e Ivernizzi, 2008).

Existen dos técnicas de consolidación que se usan actualmente en la nanotecnología: *top-down*, de arriba hacia abajo, en la que las estructuras nanométricas se obtienen por la

reducción de tamaño de materiales a granel; y el *bottom-up*, de abajo hacia arriba, la cual permite la construcción de nanoestructuras a partir de átomos individuales o moléculas capaces de conectarse, este proceso se basa en el equilibrio de las fuerzas de atracción y repulsión entre un par de moléculas como elementos básicos para formar estructuras supramoleculares más funcionales (De Azeredo, 2009).

En la naturaleza se pueden encontrar sistemas nanométricos contruidos de arriba hacia abajo aprovechando reacciones químicas y construyendo bloques moleculares con un alto grado de control en una variedad de materiales en nanoescala con formas, propiedades y funciones bien definidas (Bhushan, 2003).

Actualmente la nanotecnología ya se emplea en áreas como robótica, biología, medicina, farmacia, genética, computación, comunicaciones, tecnología aeroespacial, tecnología de materiales, ingeniería química (Klabunde, 2001; Mamalis, 2007) y por supuesto en la industria alimentaria, donde se encuentran en numerosas aplicaciones de envasado y almacenamiento principalmente así como en algunos plaguicidas y fertilizantes (Miller y Senjen, 2008).

1.5.1 Nanotecnología en alimentos

La nanotecnología tiene el gran potencial de generar nuevos productos y procesos en el campo de los alimentos con numerosos beneficios, por ejemplo, el aseguramiento de la calidad y seguridad alimentaria, análisis de la composición, detección y neutralización de microorganismos y contaminantes abióticos detección de factores anti nutricionales y alérgenos y el control de procesos. En la Tabla 2 se muestra un resumen propuesto por Bouwmeester et al. (2009) acerca de los usos de la nanotecnología en alimentos.

Mediante la adición de nanopartículas pueden desarrollarse nuevos envases con mejores propiedades mecánicas y térmicas, también es posible incluir nanosensores para alertar a los consumidores cuando la vida útil de un producto ha terminado. La nanotecnología puede también emplearse para producir alimentos más saludables por ejemplo alimentos funcionales con sistemas de liberación de manera que los ingredientes alimenticios se

Tabla 2. Resumen de las aplicaciones de la nanotecnología en la cadena de producción de alimentos. (Adaptado de Bouwmeester et al., 2009)

Etapa en la cadena	Aplicación	Nanotecnología	Función	Contacto NP/ consumidor
Producción agrícola	Nanosensores	<i>Nanospray</i> en productos alimenticios	Detecta y colorea microorganismos	+
		Dispositivos	Detecta contaminantes, micotoxinas y microorganismos	--
	Pesticidas	Nanoemulsiones, encapsulados	Aumento en la eficacia y solubilidad en agua	++
		Activa la liberación de sust. nanoencapsuladas	Activa la liberación local de las sustancias	++
Purificación de agua y limpieza de lodos	Filtros con nanoporos	Remoción de patógenos y contaminantes.	-	
	Nanopartículas	Remoción, catálisis u oxidación de contaminantes	-/+	
Producción y procesamiento de alimentos	Producción de alimentos Refrigeradores, contenedores para almacenamiento, equipo de preparación de alimentos	Dispositivos de nanocerámicos	Gran área superficial reactiva	-/+
		Incorporación de nanopartículas (plata y óxido de zinc)	Recubrimientos antibacteriales	-/+
Conservación	Productos alimenticios Materiales de envase	<i>Sprays</i> de plata nanométrica	Detección de deterioro del alimento	-/+
		Incorporación de sensores, acción antibacterial	Monitoreo de las condiciones de almacenamiento	++
		Incorporación de NP	Aumento de las propiedades de barrera y resistencia de los materiales	-/+
		Incorporación de NP activas	Eliminación del oxígeno, prevención del crecimiento de patógenos	-/+
Alimentos funcionales	Suplementos/aditivos	NP de metales coloidales	Mayor captación del metal deseado	++
		Sistemas de liberación	Protección liberación del contenido sólo en ciertos puntos a ciertas condiciones	++
		Nutrientes agrupados en formas nanométrica	Mayor absorción de los nutrientes	++

“-”, no hay contacto de la nanotecnología con el alimento; “-/+”, contacto con el alimento durante la producción pero no hay exposición directa de nanopartículas al consumidor; “+/+”, nanopartículas directamente agregadas en productos para el consumidor.

liberen en sitios de acción específicos para mejorar la salud humana (Chi-Fai *et al.*, 2007; Siegrist *et al.*, 2008).

Cuando se usan como aditivo o suplementos alimenticios, los sistemas de liberación son comúnmente elaborados a partir de péptidos, carbohidratos o lípidos (Bouwmeester *et al.*, 2009).

1.6 Nanopartículas

Nanopartícula es un nombre genérico que se usa para describir a las diferentes estructuras coloidales sólidas de tamaño nanométrico. Una de sus características fundamentales es su tamaño, que va generalmente de 5 a 1000 nm, el rango más común con el que se trabaja es de 100-500nm (Mora-Huertas *et al.*, 2010). La diferencia entre éstas radica en la morfología de cada una de acuerdo al proceso usado para su preparación dando como resultado nanoesferas o nanocápsulas (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998; Abdelwahed *et al.*, 2006; Stella *et al.*, 2007; Mora-Huertas *et al.*, 2010).

La ventaja que presentan las nanopartículas poliméricas es que permiten la liberación de sustancias por diferentes rutas de administración (Schaffazick *et al.*, 2003). Además tienen propiedades de bloqueo UV atribuidas a su tamaño particularmente en rangos de 200 a 400 nm (Villalobos-Hernández y Müller-Gotmann, 2006).

1.6.1 Nanoesferas

Las nanoesferas están formadas por una matriz polimérica densa (Quintanar-Guerrero *et al.*; 1998), las cuales pueden ser o no huecas.

Las nanoesferas huecas tienen un gran potencial para diversas aplicaciones debido a su baja densidad efectiva y alta área superficial específica (Wang *et al.*, 2010).

1.6.2 Nanocápsulas

Vistas desde un nivel general se definen como sistemas nano-vesiculares en las que una sustancia activa está confinada en una cavidad rodeada por una membrana polimérica o recubrimiento. La cavidad puede contener la sustancia en fase líquida o sólida, o como una

dispersión molecular. Igualmente, este reservorio puede ser lipofílico o hidrofóbico de acuerdo al método de preparación y materia prima utilizada (Mora-Huertas *et al.*, 2010).

El tipo de estructura de las nanocápsulas permite la encapsulación de sustancias como colores, olores, sabores, conservadores y nutrientes con el fin de desarrollar alimentos más saludables, nutritivos y/o con mejores características organolépticas. Además tienen propiedades de bloqueo UV atribuidas a su tamaño particularmente en rangos de 200 a 400 nm (Villalobos-Hernández y Müller-Gotmann, 2006).

Su tamaño subcelular permite una mayor penetración en las superficies, son capaces de mejorar la estabilidad de las sustancias activas y pueden ser biocompatible con tejidos y células cuando se sintetizan con materiales que son biodegradables (Mora-Huertas *et al.*, 2010).

La membrana polimérica permite una mayor encapsulación de sustancias lipofílicas y por lo tanto una mayor liberación. De esta manera se puede evitar la precipitación de la sustancia durante la preparación y los problemas de estabilidad causados por la presencia de sustancia en la superficie de las nanocápsulas (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998).

En la Fig. 1 Se representan las diferencias más importantes entre las nanoesferas y las nanocápsulas, esto con la finalidad de resaltar la forma en que se encuentra disponible el agente activo.

1.7 Métodos de preparación de nanocápsulas

Los métodos de preparación tienen en común la formación de una pared polimérica que contiene el agente activo, dependiendo del método de preparación será también la estabilidad del sistema, capacidad de encapsulación y aplicación, a continuación se explica el fundamento de los métodos más utilizados en la preparación de sistemas nanocapsulares con potencial uso en alimentos.

- a) **Nanoprecipitación.** También conocido como desplazamiento del disolvente o deposición interfacial, patentado por Fessi *et al.*, 1992 y descrito recientemente por Piñón-Segundo *et al.*, 2006. En este método se disuelve un polímero en un disolvente o mezcla de disolventes miscibles en agua. Después se añaden a la

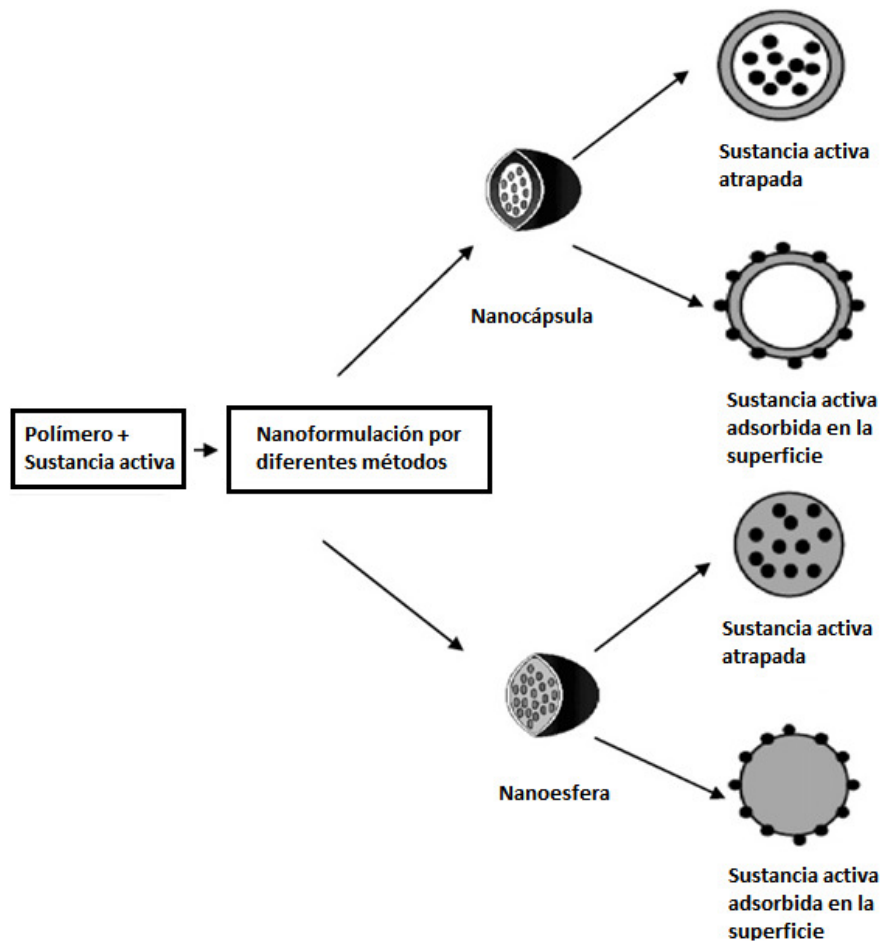


Fig. 1 Nanopartículas biodegradables: nanocápsulas y nanoesferas.
(Adaptado de Kumari *et al.*, 2010).

solución la sustancia activa y un estabilizante. Esta solución es vertida o inyectada en una solución acuosa que puede o no contener un estabilizante y se agitan moderadamente en un agitador magnético. El disolvente se difunde inmediatamente en el agua permitiendo la agregación del polímero en forma de nanocápsulas. Si se desea se puede remover todo o parte del disolvente mediante evaporación por reducción de presión.

En este caso la formación de nanopartículas es un proceso que se debe a las diferencias de tensión superficial, un líquido con una alta tensión superficial (fase acuosa) “empuja” con más fuerza al líquido que lo rodea que uno con menos tensión superficial (fase orgánica).

Las variables importantes del proceso son aquellas asociadas con las condiciones en las que se añade la fase orgánica a la acuosa como la velocidad de inyección, la velocidad de agitación de la fase acuosa, el método de adición de la fase orgánica y la proporción fase orgánica/fase acuosa. De igual manera las características de las nanocápsulas dependen de la naturaleza y concentración de los componentes (Mora-Huertas *et al.*, 2010).

- b) Emulsificación-difusión.** Éste método presenta avances claros comparados con otras técnicas existentes como el uso de disolventes orgánicos aceptables farmacéuticamente, altos niveles de encapsulación, alta reproducibilidad, mayor control sobre el tamaño de partícula y un escalamiento más fácil. Fue propuesto por Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998 y consiste en la formación de una emulsión convencional aceite en agua entre un disolvente parcialmente miscible en agua que contiene el polímero y la sustancia activa, esto con el fin de hacer posible la difusión; y una fase acuosa que contiene un estabilizante. La subsecuente adición de agua al sistema causa que el solvente se difunda desde las gotas de la emulsión resultando en la formación de nanocápsulas (Moinard-Chécot *et al.*, 2007). El mecanismo de formación se propone como medio para inducir una inestabilidad química similar a la que se observa en el proceso de emulsificación espontánea (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998).
- c) Emulsión- evaporación.** Este método consiste en la emulsificación de las fases orgánica y acuosa donde la fase orgánica contiene el polímero y la sustancia activa mientras que la fase acuosa contiene un estabilizante. En el método de emulsión difusión la difusión se hace al agregar agua mientras que mediante la emulsión- evaporación la difusión se hace mediante la evaporación del solvente provocando la solidificación de las gotas de la emulsión (Babak *et al.*, 2007).

1.8 Caracterización de nanocápsulas

Puesto que es necesario establecer la existencia de entidades de talla nanométrica, es necesario llevar a cabo la caracterización de los sistemas coloidales determinando el tamaño de la partícula formada, potencial zeta para inferir sobre la estabilidad, así como en

el caso de entidades capsulares la eficiencia de encapsulación y la identificación de los sistemas.

1.8.1 Tamaño de partícula

Es uno de los parámetros más importantes ya que asegura que durante la preparación de nanopartículas se alcanzó el tamaño requerido. Existen dos métodos principales para la determinación del tamaño de partícula; el más empleado es la espectroscopía de determinación de fotones el cual analiza el movimiento Browniano de las partículas en una suspensión, la practicidad de éste método se debe a la poca muestra requerida y a la rapidez de las determinaciones; el segundo método es la dispersión de luz el cual se emplea para distribuciones de tamaño más amplia, en éste, un difractómetro láser determina la distribución angular de la luz dispersa desde un irradiador hasta un conjunto de detectores (Brunjes, 2005). Generalmente el tamaño de las nanocápsulas coloidales va de los 250 a los 500 nm y puede variar de acuerdo al método de preparación así como de la naturaleza y concentración de los componentes, especialmente del polímero del solvente y del surfactante (Mora-Huertas *et al.*, 2010).

El control del tamaño de partícula y la distribución de tamaños (índice de polidispersión) dentro de ciertos límites prácticos es una precondition para el uso de las nanopartículas en general. Además algunos métodos para la síntesis de nanopartículas ofrece buena monodispersión, otros métodos pueden dar un rango de distribución más amplio (Holzer *et al.*, 2009).

Con respecto al método de emulsificación-difusión, parámetros como la naturaleza y el volumen de las fases orgánicas y acuosas, la naturaleza y concentración de los surfactantes y polímeros así como la intensidad y duración de la homogeneización tienen implicaciones importantes en la distribución de tamaños de partícula (Mora-Huertas *et al.*, 2010).

1.8.2 Potencial zeta (ζ)

La estabilidad de partículas inorgánicas en fase acuosa es de suma importancia en el proceso y aplicaciones de las partículas (Liao *et al.*, 2009). La mayoría de las membranas

adquieren carga en la superficie cuando entran en contacto con una solución acuosa (Fig. 2). Se sabe que la carga o potencial eléctrico de la membrana tiene una gran influencia en el comportamiento de las partículas (Fievet *et al.*, 2003). Como se mencionó anteriormente las nanocápsulas son sistemas compuestos por membranas por lo tanto tienen un potencial eléctrico.

La mayoría de los líquidos contienen iones que pueden estar cargados positiva y/o negativamente. Cuando una partícula cargada se suspende en un líquido los iones de cargas opuestas son atraídos hacia la superficie de la partícula suspendida. Los iones cercanos a la superficie de las partículas están fuertemente unidos mientras que los iones que están a mayor distancia tienen uniones débiles y forman lo que se conoce como capa difusa. Dentro de la capa difusa existe un límite imaginario; los iones que se encuentran dentro de este límite se mueven junto con la partícula cuando ésta se mueve en el líquido, pero los iones que están fuera del límite permanecen en su lugar; este límite se llama plano de corte (Malvern Instruments©, 2004).

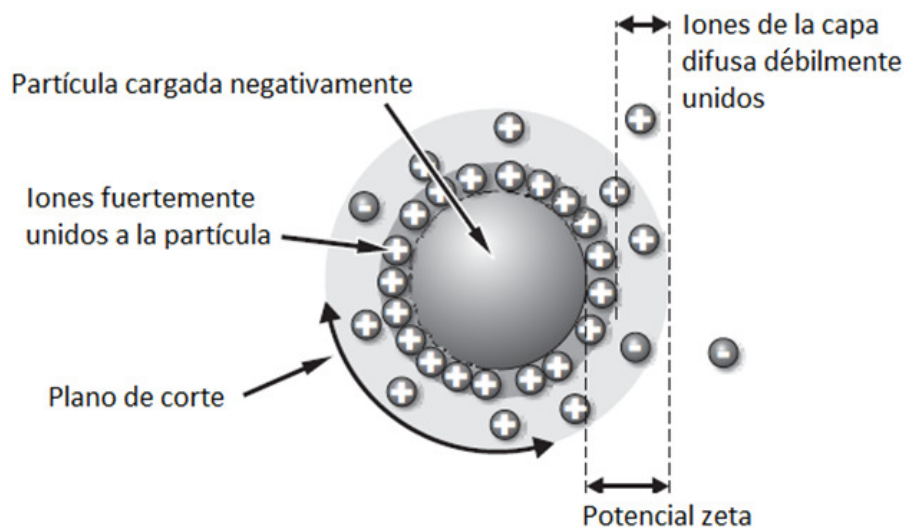


Fig. 2 Potencial zeta. (Adaptado de Malvern Instruments ©, 2004)

ζ es un indicador importante y confiable de la carga en la superficie de la membrana que interactúa con su entorno. Las partículas con un alto ζ son “autoestabilizables” ya que su carga inhibe la coalescencia y mejora la estabilidad ya que a mayor valor de ζ mayor es la

magnitud de la fuerza repulsiva entre las partículas y por lo tanto hay mayor estabilidad en el sistema (Fievet *et al.*, 2003; Tholstrup *et al.*, 2007).

ζ puede ser calculado a partir del potencial de flujo el cual se basa en la medida del potencial eléctrico inducido cuando se aplica una presión hidrostática sobre una membrana cargada (Huisman y Trägårdh, 1999; Fievet *et al.*, 2003). También puede determinarse por electroforesis, en soluciones electrolítica, las interacciones electrostáticas entre las partículas cargadas y la doble capa que las rodea determinan la cinética de agregación, floculación, coalescencia, coagulación, así como las interacciones con la superficie que pueden dar lugar a deposición o adsorción (English y Long, 2009).

1.8.3 Eficiencia de Encapsulación (EE)

Margalit y Yerushalmi (2006) mencionan diferentes definiciones, una de ellas es la fracción sustancia activa encapsulada con respecto al total del sistema. En la Fig. 3 se muestra que la eficiencia de encapsulación esta influenciada por diferentes parámetros siendo los más importantes el método de preparación y la naturaleza química de los materiales que las constituyen (Mora-Huertas *et al.*, 2010; Xiang *et al.*, 2010). La eficiencia de encapsulación se mide para conocer la concentración de sustancia activa que realmente fue nanoencapsulada. Se puede observar que los métodos de nanoprecipitación y emulsificación-difusión dan mejores resultados de encapsulación (80% o más) que otros métodos (Mora-Huertas *et al.*, 2010).

1.1.1 Eficiencia de Liberación

Es una prueba necesaria para conocer la cantidad de sustancia activa que se libera una vez que fue encapsulada, generalmente se realiza por métodos espectrofotométricos. Hay pocos estudios acerca de la dependencia de la liberación de la sustancia activa en función del método de preparación; en los casos estudiados se ha observado que la liberación es más rápida en nanocápsulas preparadas por el método de emulsificación-difusión. El tiempo que tarda el polímero en liberar la sustancia activa puede deberse a la capacidad de éste de retenerla así como a su naturaleza (Mora-Huertas *et al.*, 2010).

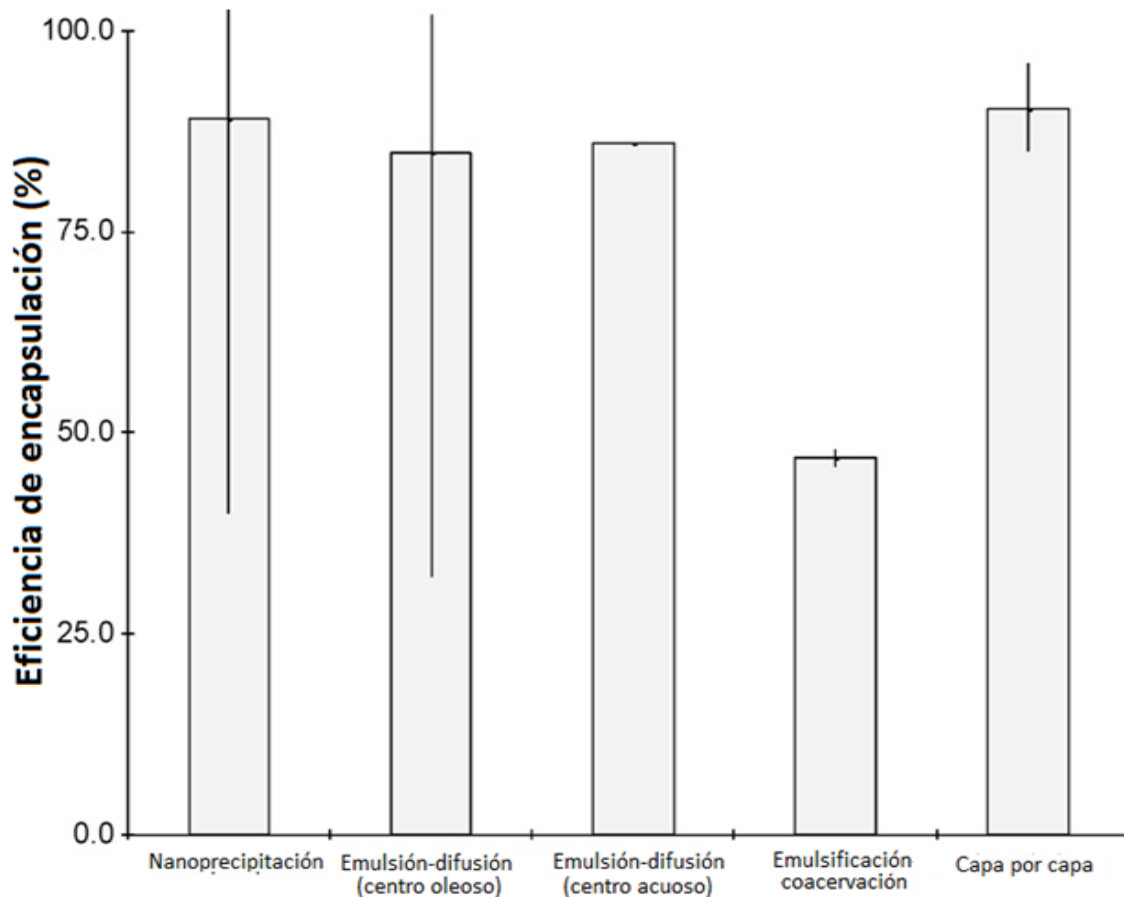


Fig. 3 Eficiencia de encapsulación de nanocápsulas en función del método de preparación empleado. (Adaptado de Mora-Huertas *et al.*, 2010)

1.9 Mecanismos de liberación controlada

La liberación controlada se define como un método por el cual uno o más agentes activos se vuelven disponibles en el sitio y tiempo deseado a una velocidad específica; tiene varias ventajas: a) los ingredientes activos son liberados a velocidades controladas por largos periodos de tiempo, b) puede evitarse o reducirse la pérdida de ingredientes como vitaminas y minerales durante el proceso, c) pueden separarse los componentes reactivos o incompatibles (Pothakamury y Barbosa-Cánovas, 1995). En la Fig. 4 se muestra un modelo del comportamiento de la velocidad de liberación de las sustancias activas donde ese indican diferentes etapas:

- 1) Se presenta una alta velocidad de liberación de la sustancia activa que ha migrado dentro dentro de la barrera durante el almacenamiento.

- 2) La velocidad se vuelve constante, siempre y cuando se mantenga una concentración constante dentro de los depósitos.
- 3) La velocidad disminuye rápidamente cuando la sustancia dentro de los depósitos está a punto de agotarse.

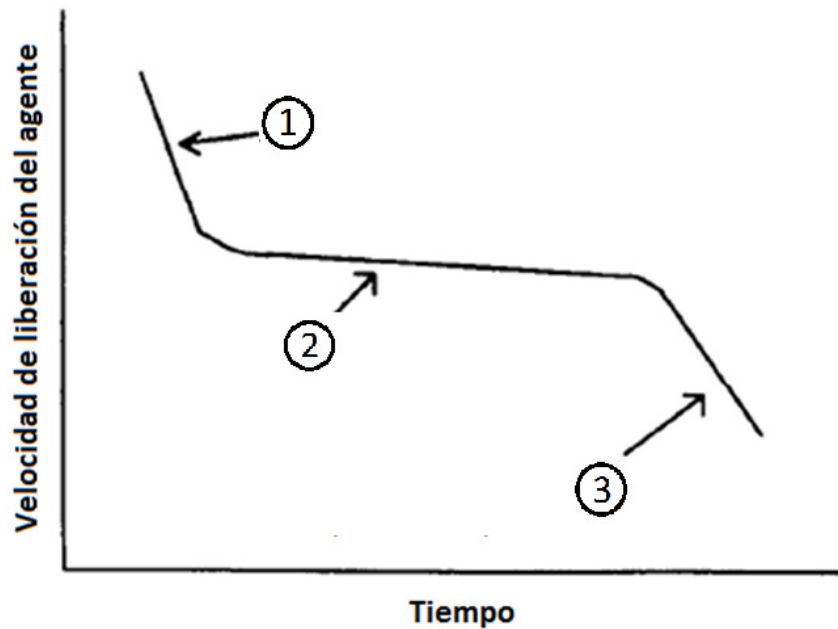


Fig.4 Esquema del comportamiento de la velocidad de liberación de sustancias activas. (Adaptado de Pothakamury y Barbosa-Cánovas, 1995)

La liberación se manifiesta por diferentes fenómenos

- Difusión
- Biodegradación
- Hinchamiento
- Presión osmótica

Cuatro mecanismos generales de liberación controlada mencionados por Sáez *et al.* (2004) son: (a) sistemas controlados por difusión, (b) sistemas controlados químicamente, (c) sistemas activados por un disolvente y (d) sistemas controlados magnéticamente. La difusión se presenta en todos los casos.

Los dos modelos principales de liberación controlada son la retrasada y la sostenida; la liberación retrasada es un mecanismo en el que la liberación de una sustancia activa es retrasada desde un tiempo infinito (*lag time*) hasta un punto en el que la liberación favorece y no es obstaculizada por más tiempo. Por ejemplo la encapsulación de probióticos para la protección de la acidez gástrica y su liberación en la parte baja del intestino, liberación de sabores mientras se calienta en microondas. La liberación sostenida es un mecanismo designado para mantener constante la concentración de una sustancia activa en un sitio determinado. Ejemplos de esta liberación son encapsulación de sabores y dulce de la goma de mascar de manera que la velocidad de liberación se reduce para mantener el sabor deseado a través del tiempo de masticado (Lakkis, 2007).

1.10 Métodos de evaluación de la liberación

Los mecanismos de liberación son comúnmente deducidos de la medición cinética de sistemas de liberación de sustancias microencapsuladas por métodos indirectos que se basan en efectos del solvente, buffer, velocidad de agitación u otras variables. Los datos de liberación tienen un número de potenciales aplicaciones. En el nivel más simple estos datos de pueden utilizar como parámetros de control de calidad para asegurar que el comportamiento de un producto manufacturado sea constante. También puede ser utilizado para tratar de entender el comportamiento fisicoquímico de una estructura y su mecanismo de liberación; no obstante, esto normalmente requiere la aplicación de los datos a un modelo computarizado del sistema de liberación. Finalmente estos datos pueden ser utilizados con la para predecir el comportamiento de un sistema *in vivo*. La prueba de liberación es un requerimiento esencial para el desarrollo, establecimiento de disoluciones *in vitro* y correlaciones *in vivo* así como el registro y control de calidad de formulas dosificadas. Bajo ciertas condiciones la liberación *in vitro* puede ser usada como sustituto de la evaluación de bioequivalencia.

La determinación de liberación de sistemas micro y nanoencapsulados tiene muchas dificultades que no se encuentran en sistemas con tamaños de partículas mayores. La principal dificultad surge cuando se hace el intento de separar la droga liberada en la fase continua de las partículas transportadoras suspendidas. Esto se vuelve cada vez más difícil

y lento a medida que disminuye el tamaño de las partículas; sin embargo, la velocidad de liberación se vuelve más rápida para partículas más pequeñas, cuando se alcanza el menor tamaño en el cual la separación ya no se puede realizar.

II. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL

2.1 Objetivo General

Evaluar la velocidad de liberación de dl- α -tocoferol de nanocápsulas preparadas por el método de emulsificación-difusión como parámetro de estabilidad, efecto en la dispersión de la luz e influencia sobre la vida útil de manzana *Red Delicious* fresca- cortada y refrigerada.

2.2 Objetivos Particulares

Objetivo Particular 1: Evaluar la cinética de liberación instantánea de dl- α -tocoferol de nanocápsulas por métodos espectrofotométricos comparando los coeficientes de difusión obtenidos con respecto a una nanoemulsión de dl- α -tocoferol, aplicadas como recubrimientos en manzana *Red Delicious* fresca-cortada y refrigerada.

Objetivo Particular 2: Evaluar la eficiencia de recubrimientos de nanocápsulas y nanoemulsión sobre la dispersión de luz en la superficie de manzana *Red Delicious* fresca-cortada utilizando como indicador una solución de dióxido de titanio (TiO₂).

2.3 Materiales y reactivos

Poly- ϵ -caprolactona (PCL) con peso molecular $\approx 80,000$ ($\rho=1.147$ g/cm³ a 25°C) de Sigma-Aldrich®. Poloxámero-407 (F-127) de BASF (México) utilizados en la formulación de las nanocápsulas como estabilizante no iónico. Span 80 y Tween 80 grado alimenticio, marca ICI Surfactants con la finalidad de obtener un balance hidrofílico lipofílico > 6 en la preparación de la emulsión y nanoemulsión. Acetato de dl- α -tocoferol (98%) de reactivos Alfa Delta S.A. de C.V. (México). Acetato de etilo grado analítico de Fermont (México) como disolvente parcialmente miscible en agua seleccionado debido a su baja toxicidad para la preparación de las nanocápsulas. Agua destilada calidad Milli-Q (Millipore®, USA-Bedford, MD). Goma xantana de Sigma-Aldrich® como matriz continua del recubrimiento

y propilenglicol (99 %) marca Sigma como plastificante. Cloruro de calcio marca J. T. Baker. Cloroformo grado HPLC (Tecsiquim S.A. de C.V., México) y Etanol grado analítico (Fermont, México) para la extracción de dl- α -tocoferol.

2.4 Materia prima

Un lote de 60 Kg de manzanas de la variedad *Red Delicious* se adquirió en un mercado local. La selección de los frutos se realizó en base a su estado de madurez (contenido de sólidos solubles de 12 a 14°Brix y fuerza de ruptura por punción de 7N), la similitud de su forma, tamaño y ausencia de lesiones externas. Los frutos seleccionados se dividieron de manera aleatoria en tres lotes de 20 Kg. Previo a su preparación se mantuvieron refrigerados a 4°C.

2.5 Actividades preliminares

2.5.1 Barridos espectrales

Se realizaron barridos espectrales de soluciones de dl- α -tocoferol en EtOH y CHCl₃ en un espectrofotómetro Varian Cary-50 Conc UV-Vis, USA para determinar la $\lambda_{\text{máx}}$ a la que se mide la absorbancia (A) para las distintas soluciones.

2.5.2 Curvas de calibración

Con la finalidad de correlacionar la concentración de dl- α -tocoferol presente en los sistemas coloidales desarrollados con su respectiva A, se realizaron las curvas de calibración correspondientes a las dos soluciones. Las curvas y las determinaciones de dl- α -tocoferol se realizaron por método espectrofotométrico y se realizaron a partir de disoluciones de una solución base de 0.019 g de dl- α -tocoferol en 50 mL de CHCl₃ y para el caso del EtOH de 0.025 g de dl- α -tocoferol en 50 mL de EtOH con nueve y ocho diluciones respectivamente.

2.6 Preparación de nanocápsulas de dl- α -tocoferol

Se prepararon mediante el método de emulsificación-difusión propuesto por Quintanar-Guerrero *et al.* (1998). Se saturó acetato de etilo y agua; en el acetato de etilo se disolvieron

400 mg de PCL y 1 mL de dl- α -tocoferol (fase orgánica) mientras que en el agua saturada se disolvieron 4 g de P-127 (fase acuosa). Se añadió la fase orgánica a la fase acuosa y se emulsificaron con un agitador de alta energía (Ultra-Turrax® T50 Basic, IKA, USA) a 4000 RPM por 10 minutos. Finalmente se añadió agua y el disolvente se eliminó mediante evaporación a 30°C y vacío de 70 cm de Hg con un evaporador rotatorio (Laborota 4000 Eco Rotary Evaporator, Heidolph®, Schwabach, Alemania). Es importante mencionar que de acuerdo a Witschy y Doelker (1997) el acetato de etilo es considerado como disolvente de clase 1 en una escala de toxicidad que va de 1 a 3 donde 1 es el menos tóxico y 3 el más tóxico.

2.7 Preparación de nanoesferas

Las nanoesferas se prepararon de la misma manera que las nanocápsulas con la única diferencia de que estas no contenían dl- α -tocoferol.

2.8 Preparación de nanoemulsión

La nanoemulsión se preparó por el método de emulsificación convencional a alta velocidad (Solans *et al.*, 2005) para lo que se empleó una fase oleosa que consistió en la mezcla de 42 g de Span®-80 y 2 ml de d- α -tocoferol y una fase acuosa de 8 g de Tween ®-80 y agua. Ambas fases se mezclaron en el agitador de velocidad variable R1R2 (Heidolph® Instruments, Alemania) a 2,500 RPM durante 10 minutos para emulsificar y posteriormente se dieron cinco ciclos de homogeneización en un sistema Ultra-Turrax ® (Ultra-Turrax® T50 Basic, IKA, USA) a 10000 RPM.

2.9 Preparación de solución de dióxido de titanio

Se preparó la solución de TiO₂ al 1% y se mezcló en un agitador de alta energía (Ultra-Turrax® T50 Basic, IKA, USA) a 4000 RPM por 10 minutos.

2.10 Preparación de recubrimientos

A partir de los sistemas de nanocápsulas, nanoemulsión y la solución de TiO₂ preparados se llevó a cabo la formulación de diferentes recubrimientos con un contenido de goma xantana de 0.3% y 0.5% de propilenglicol como plastificante. En la Tabla 3 se muestran las variables a comparar en el diseño respecto a su efectividad en la inhibición del oscurecimiento enzimático en relación a la difusión de dl- α -tocoferol como agente antioxidante en el sistema y liberación del mismo. Cabe mencionar que todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Tabla 3. Diseño experimental para la comparación de la efectividad de los tratamientos

Tratamiento	Variables dependientes	Variables de respuesta	Método de medición	Análisis
Nanocápsulas	L*, a*, b*	°HUE	Colorímetro MINOLTA CR-300	ANOVA ($\alpha= 0.05$) Prueba de Tuckey de diferenciación de medias
Nanocápsulas + goma xantana		Índice de Oscurecimiento		
Nanoemulsión + goma xantana		Velocidad de oscurecimiento		
Nanoesferas	Variación en la concentración de dl- α -tocoferol	Coeficientes de difusión efectiva de dl- α -tocoferol	Espectrofotometría	Ley de Fick Cinética de liberación de 1er orden
Goma xantana		Liberación de dl- α -tocoferol		
Control				

Previo a la aplicación de los recubrimientos se llevó a cabo la preparación de la dispersión goma xantana, utilizando para su preparación agua MilliQ[®], la disolución se llevó a cabo utilizando un sistema de velocidad variable R1R2 (Heidolph[®] Instruments, Alemania) a 2,500 RPM, incorporando el sistema correspondiente de tal manera que en aquellas que contienen dl- α -tocoferol la concentración final fuera de 2 g/L de este componente.

Una vez preparados los sistemas se llevó a cabo su caracterización mediante mediciones de tamaño de partícula, ζ y microscopía electrónica de barrido. Posteriormente se almacenó en refrigeración a 4°C en frascos de vidrio perfectamente limpios hasta el momento de uso.

a) Justificación de variables

La manzana es un fruto que al ser mínimamente procesado se deteriora rápidamente debido al daño mecánico que sufre; parte de este deterioro es el oscurecimiento debido a la liberación de la polifenoloxidasas. Este cambio de color, representado por los parámetros °HUE, Cromaticidad e Índice de oscurecimiento, se ha utilizado en diferentes estudios como referencia para medir la velocidad de deterioro de manzanas y frutas en general (Palou *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2003; Albanese *et al.*, 2007; Rojas-Graü *et al.*, 2009).

La liberación de sustancias depende en gran medida del tipo de sistema que se utilice así como de la aplicación que se les da. El coeficiente de difusión indica la velocidad a la que la sustancia activa es liberada y por lo tanto el tiempo en el cual se encuentra disponible.

2.11 Caracterización de los sistemas de talla submicrónica

2.11.1 Tamaño de partícula e índice de polidispersión

Con la finalidad de corroborar la dispersión de tallas de partícula se llevó a cabo la determinación del tamaño de partícula utilizando para ello un sistema de dispersión láser Z-sizer® (Zetasizer Nano Series, Malvern Ltd, France), previo a la medición se llevó a cabo la preparación de las muestras de acuerdo con lo descrito para la obtención de nanocápsulas por Zambrano-Zaragoza *et al.*, (2011). Todas las mediciones se llevaron a cabo por triplicado.

2.11.2 Determinación de ζ

Se llevó a cabo utilizando un Z-sizer 4, con dispositivo de dispersión láser a un ángulo de 273° (Zetasizer Nano Series Malvern Ltd Francia), las pruebas fueron normalizadas con dispersiones de poliestireno estándar ($\zeta = -55$ mV). Cada suspensión se diluyó en agua, y las mediciones se realizaron por triplicado.

2.11.3 Microscopía electrónica de barrido

Se utilizó como método alternativo para observar la estructura de la superficie de la manzana con diferentes recubrimientos empleando un microscopio electrónico de barrido (SEM por sus siglas en inglés) JEOL JSM 5600 LV SEM, JEOL LTd., Tokio, Japon.

2.11.4 Determinación de la Eficiencia de Encapsulación

Esta propiedad se determinó mediante la preparación de un lote de nanocápsulas con una cantidad conocida de dl- α -tocoferol. A partir de esta concentración y mediante la curva de calibración de CHCl₃ se determinó la cantidad de vitamina encapsulada y posteriormente la eficiencia de encapsulación (EE). Las nanocápsulas se lavaron dos veces por centrifugación/redispersión en una Ultracentrífuga (Optima™ LE-80K Beckman, USA) a 30,000 RPM por 40 min. El sobrenadante recuperado del último lavado se secó a vacío en una liofilizadora (FreeZone® 6, Labconco, USA) durante 48 horas. Un volumen conocido de sedimento seco se disolvió en CHCl₃ y se determinó su absorbancia en un espectrofotómetro (Cary-50 Conc UV-Vis, Varian, USA) a 285nm

La EE expresada en porcentaje fue calculada mediante la Ec. 1 (Byun *etl al.*, 2010) donde C_r es la concentración real de dl- α -tocoferol obtenida mediante la curva de calibración en EtOH y C_t es la concentración teórica de dl- α -tocoferol, es decir, la concentración máxima de dl- α -tocoferol que se puede encapsular; ésta se obtiene de la relación entre el total de la suma de la cantidad de polímero más la cantidad de dl- α -tocoferol en la formulación (Ec. 2)

$$EE (\%) = \frac{C_r}{C_t} \times 100 \quad \text{Ec. 1}$$

$$C_t = \frac{C_{\alpha-toc} \times V_{ss}}{C_p + C_{\alpha-toc}} \quad \text{Ec. 2}$$

donde V_{ss} es el volumen de sedimento seco mientras que $C_{\alpha-toc}$ y C_p son las concentraciones de dl- α -tocoferol y de polímero en la formulación de nanocápsulas respectivamente.

2.12 Recubrimiento de manzanas para pruebas de dispersión de luz y liberación *in vivo*

Para las pruebas de dispersión de luz las manzanas se decorazonaron y se cortaron en forma axial (Fig. 5a) mientras que para las pruebas de liberación *in vivo* se cortaron en rodajas de área superficial equivalente a los “gajos” formados para la evaluación del IO (Fig. 5b). En ambos casos los cortes se sometieron a los diferentes tratamientos y se colocaron en vasos cristal de poliestireno rígido de 8 onzas con tapa debidamente sanitizados con una solución de cloruro de benzalconio [150ppm] y etiquetados, los cuales se llenaron hasta aproximadamente el 70% de su capacidad.

En la Fig. 6 se muestra el procedimiento que se siguió para la preparación de lotes para las diferentes pruebas; en color verde se muestran las etapas del proceso de preparación de lotes para dispersión de luz mientras que en morado se observan las etapas de preparación de lotes para las liberaciones de dl- α -tocoferol. Además se prepararon lotes sólo con cloruro de calcio para ambas pruebas, es decir, después del escurrido 1 se pasó directamente al envasado.

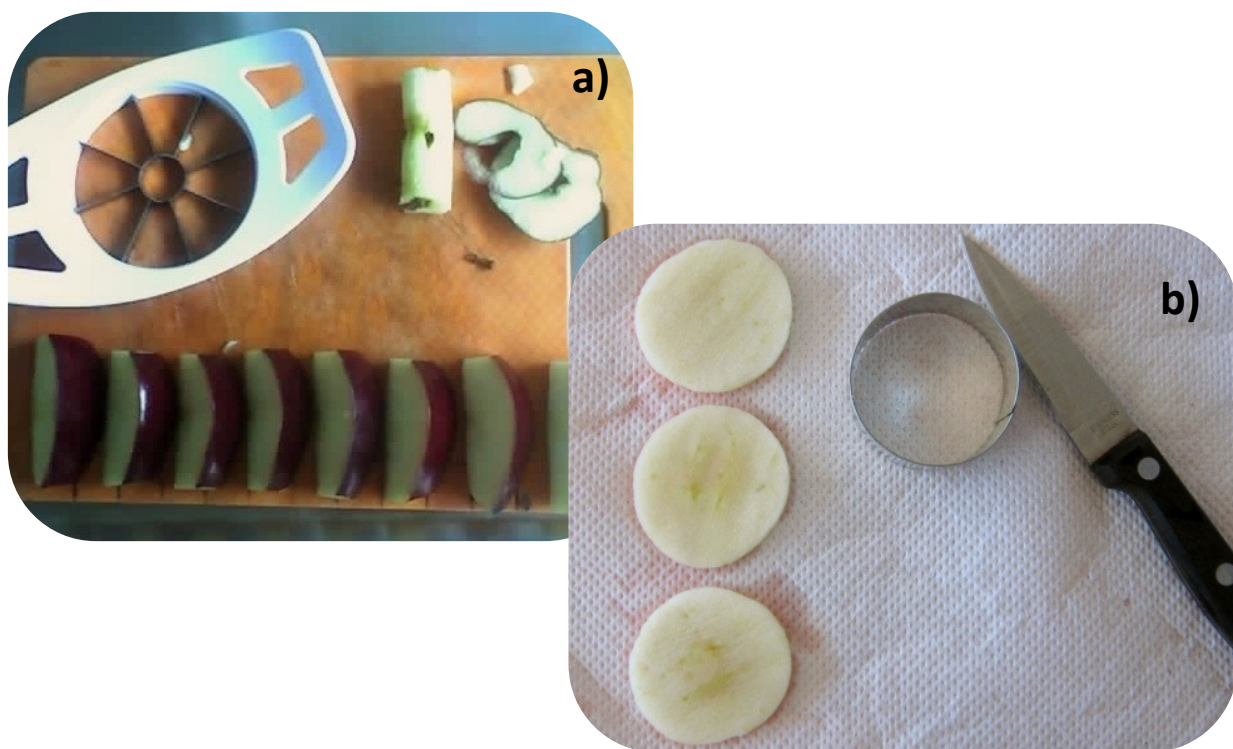


Fig. 5 (a) Corte de manzana en “gajos” para evaluación de IO, (b) Corte en rodajas para pruebas de liberación.

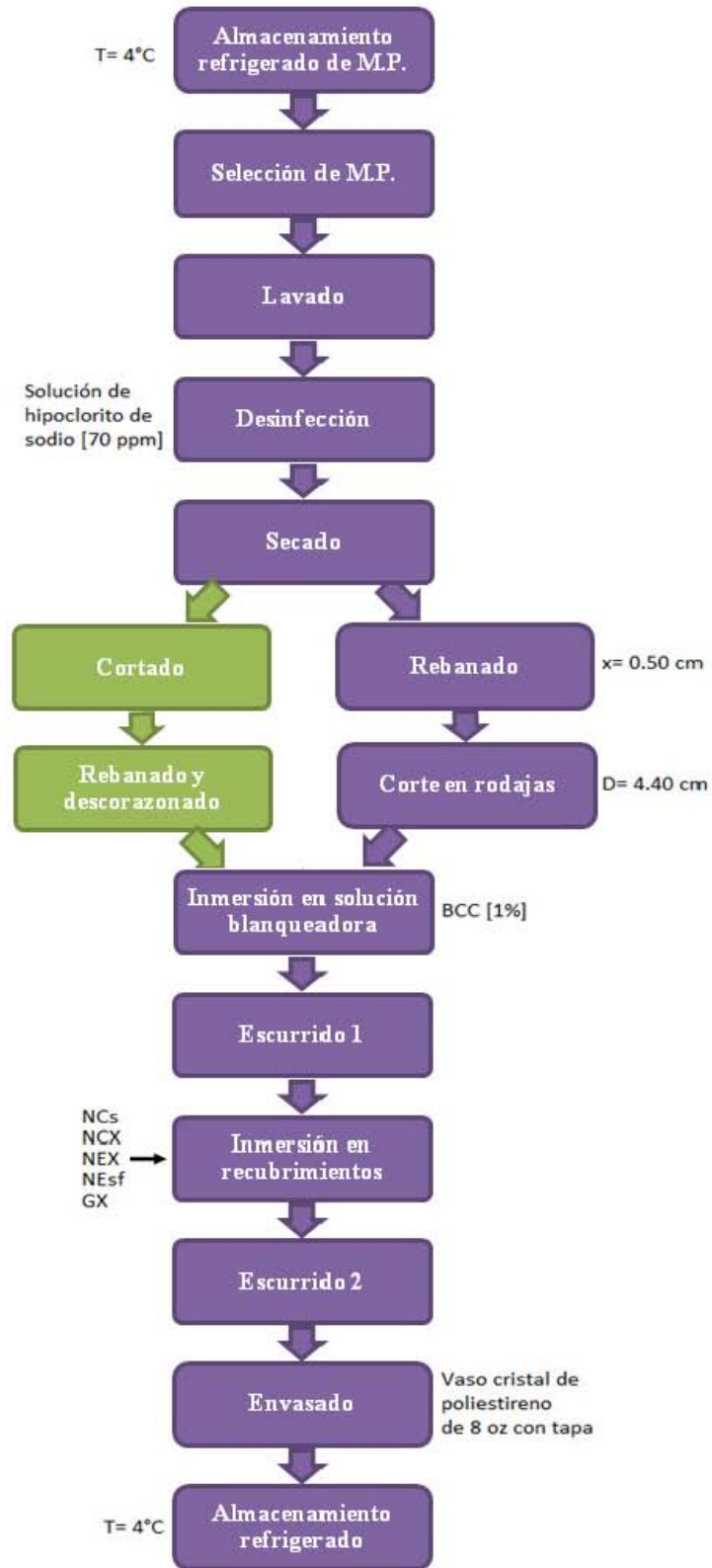


Fig. 6 Diagrama de bloques de la preparación de muestras para las distintas pruebas.

En los incisos siguientes se describe la manera en que se realizaron las diferentes mediciones:

a) Pruebas de dispersión de luz

La determinación de los cambios de color se hizo de acuerdo a la escala CIELab, para lo que se utilizó un colorímetro (CR-300, Minolta, USA) calibrado con una placa de cerámica blanca de valores $L^*= 97.02$, $a^*=+0.13$ y $b^*=+1.77$. Las determinaciones se realizaron por triplicado durante 14 días de almacenamiento, registrándose los parámetros L^* , a^* , b^* , X , Y , Z , x y y para obtener el °HUE, cromaticidad (Croma) y la velocidad de oscurecimiento (VO) mediante las Ec. 3-5 (Palou *et al.*, 1999). El °HUE representa el tono, tinte o color y es lo que hace diferente a un color de otro, Croma define la intensidad o pureza espectral del color que va de los tonos grises, pálidos y apagados a los más fuertes y vivos (Manresa y Vicente, 2007), VO se reporta como un parámetro importante en los procesos donde tiene lugar el oscurecimiento enzimático y no enzimático (Palou *et al.*, 1999).

$$^{\circ}HUE = \tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad \text{Ec. 3}$$

$$Croma = \sqrt{a^2 + b^2} \quad \text{Ec. 4}$$

$$VO = \frac{\Delta IO}{tiempo} \quad \text{Ec. 5}$$

donde IO es el índice de oscurecimiento y se calcula mediante la Ec. 6

$$IO = \frac{[100(x-0.31)]}{0.172} \quad \text{Ec. 6}$$

b) Pruebas de liberación in vivo

Al igual que la prueba anterior, ésta se realizó por triplicado a diferentes tiempos durante 14 días de almacenamiento. Se realizó para determinar el coeficiente de difusión de la

vitamina cuantificando el dl- α -tocoferol liberado por inmersión de las rodajas de manzana en 10 ml de EtOH durante 10 minutos en frascos cerrados empleando agitación mecánica en un agitador con baño (American Optical Corporation, USA); pasado este tiempo se retiraron las rodajas y el EtOH se filtró con membranas Millipore TM para eliminar los residuos de manzana en la solución la cual se evaluó posteriormente en el espectrofotómetro (Cary 50 UV-Vis, Varian, USA) a $\lambda_{\text{max}}= 285$ nm obteniéndose un valor de A que se analizó contra la curva de calibración de dl- α -tocoferol/EtOH.

2.13 Análisis estadístico

Las pruebas se realizaron por triplicado y se obtuvo la media, desviación estándar y coeficiente de variación. Se establecieron las diferencias entre los distintos tratamientos mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) de dos factores utilizando MINITAB 16.

III. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 Actividades preliminares

3.1.1 Barrido espectral

Se realizaron los barridos espectrales de soluciones de dl- α -tocoferol en EtOH y CHCl₃ obteniéndose que $\lambda_{\text{máx}}$ para ambos casos es de 285 nm (Fig. 7); Eitenmiller y Lee (2004) mencionan que la espectroscopía UV para tocoferoles y tocotrienoles en etanol muestran una máxima absorción entre 292 y 298 nm mientras que para el acetato de α -tocoferol la longitud de onda máxima es de 286 nm lo cual puede variar debido al equipo utilizado para su medición.

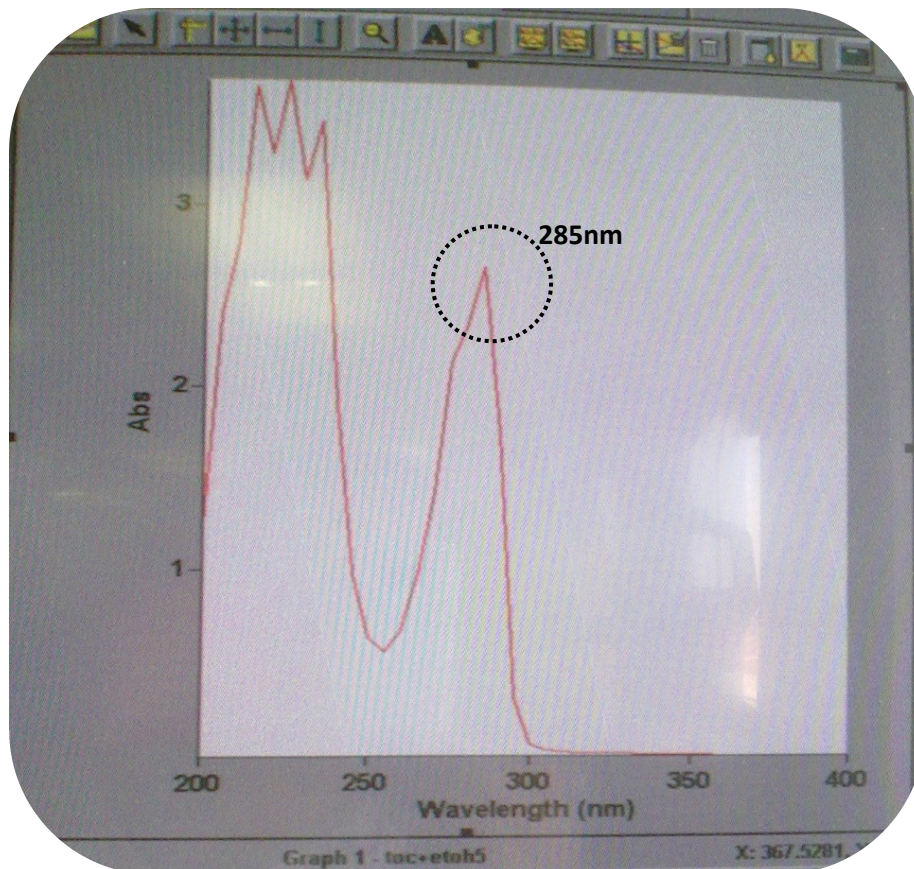


Fig. 7 Curva de barrido espectrofotométrico de dl- α -tocoferol en EtOH.

3.1.2 Curvas de calibración

a) Curva de calibración de dl- α -tocoferol/ CHCl_3

Se realizó con el propósito de cuantificar la cantidad de dl- α -tocoferol encapsulado. La curva de calibración obtenida se muestra en la Fig. 8 de la que se definen dos cuestiones; la primera es que por medio de la ecuación de la línea de tendencia se obtuvo una nueva ecuación (Ec. 7) que sirvió para conocer la concentración de dl- α -tocoferol correspondiente a una determinada absorbancia (A) y posteriormente la eficiencia de encapsulación (EE) de las nanocápsulas.

En segundo lugar se obtuvo un coeficiente de determinación (R^2) igual a 0.9973 lo que indica que la correlación entre los datos es muy buena y por lo tanto se tiene la certeza de que la ecuación fue correcta y los resultados de EE confiables.

$$C_{\alpha\text{-toc}/\text{CHCl}_3} = \frac{A}{0.0049} = \left[\frac{\mu\text{g DL-}\alpha\text{-tocoferol}}{\text{ml CHCl}_3} \right] \quad \text{Ec. 7}$$

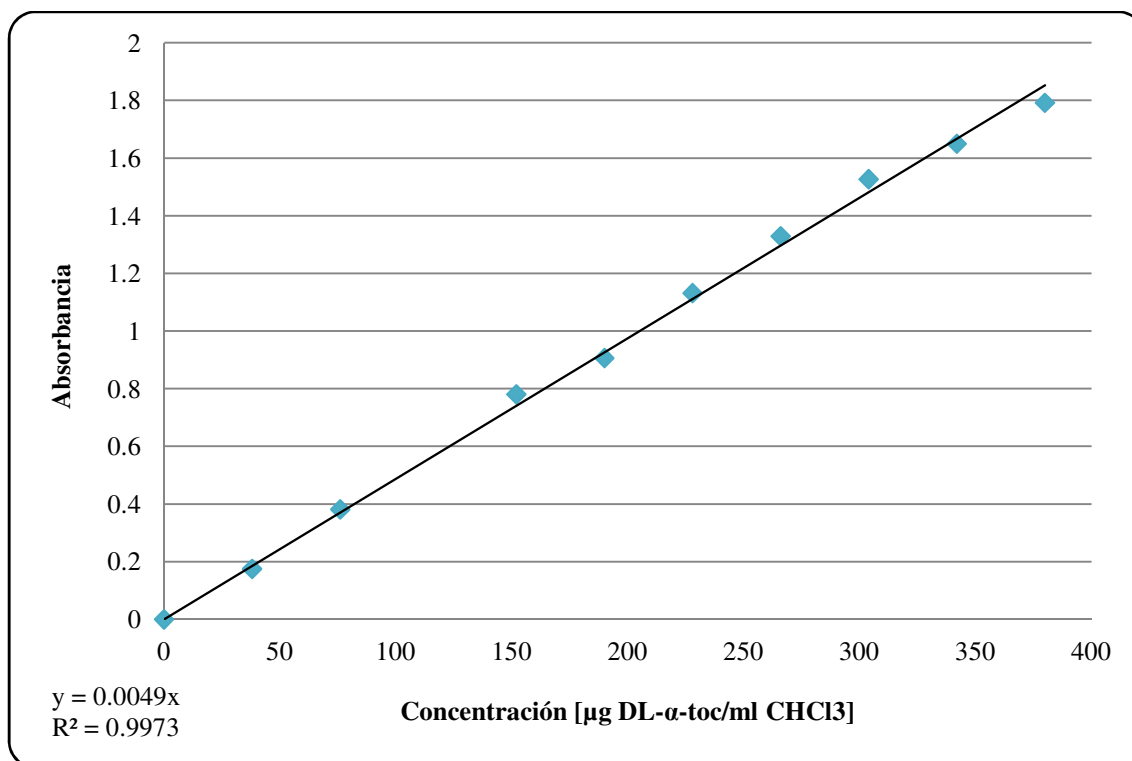


Fig.8 Curva de calibración de dl- α -tocoferol en CHCl_3 evaluada a 285nm.

b) Curva de calibración de dl- α -tocoferol/EtOH

El objetivo de esta curva como se describió anteriormente fue la cuantificación de dl- α -tocoferol liberado a diferentes tiempos durante el periodo de almacenamiento. La curva de calibración obtenida se muestra en la Fig. 9 de la cual se obtuvo la ecuación para la determinación de la concentración de dl- α -tocoferol a diferentes valores de A mediante la ecuación de la línea de tendencia (Ec. 8), además, con el valor de $R^2 = 0.9987$ se sabe que los resultados son confiables.

$$C_{\alpha\text{-toc}/\text{EtOH}} = \frac{A}{0.0041} = \left[\frac{\mu\text{g DL-}\alpha\text{-tocoferol}}{\text{ml EtOH}} \right] \quad \text{Ec. 8}$$

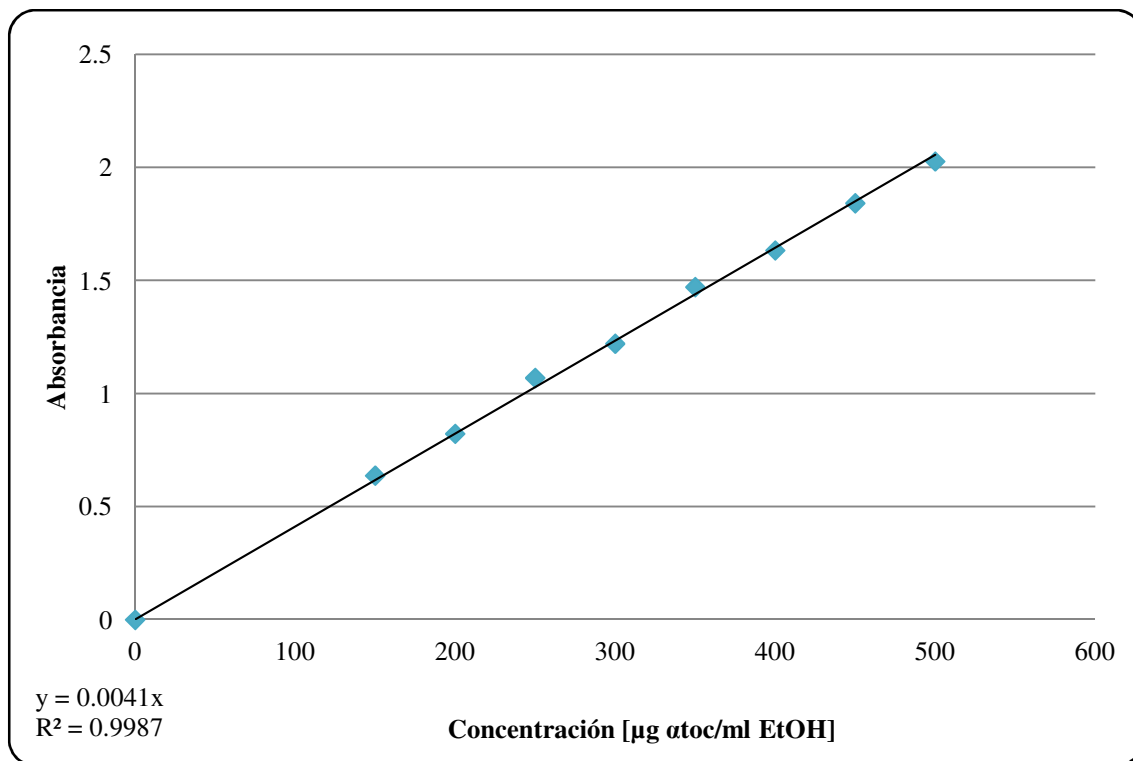


Fig. 9 Curva de calibración de dl- α -tocoferol en EtOH evaluada a 285nm.

3.1.3 Determinación de Eficiencia de Encapsulación

La eficiencia de encapsulación se determinó para conocer la cantidad de dl- α -tocoferol de la cual se partió. Se obtuvo un valor de absorbancia el cual se sustituyó en la Ec. 7 y de acuerdo las diluciones hechas se llegó a una concentración de 39.37 mg de dl- α -tocoferol. Sustituyendo este dato en las Ec. 1 y 2 se obtuvo que:

$$EE (\%) = 56.130\%$$

Mora-Huertas *et al.* (2010) mencionaron que los métodos que dan mejores resultados de EE son nanoprecipitación, emulsificación-difusión y capa por capa con eficiencias de encapsulación mayores al 80%; sin embargo, esto puede variar para nanoprecipitación y emulsificación-difusión ya que los resultados dependen de la naturaleza química y polaridad de la sustancia activa, en éste sentido las sustancias hidrofílicas pueden alcanzar valores máximos de EE= 10% y en casos de compuestos lipofílicos llega a ser mayor a 70%.

Por otro lado Somchue *et al.* (2009) evaluaron la eficiencia de encapsulación de α -tocoferol con β -lactoglobulina como matriz notando que ésta disminuye al aumentar la concentración α -tocoferol en una concentración fija de β -lactoglobulina. Byun *et al.* (2010) evaluaron la eficiencia de encapsulación de nanocápsulas de α -tocoferol en diferentes concentraciones de PCL empleando cloruro de metileno (DCM) y acetonitrilo (ACN) como solventes teniendo como resultado que EE aumentó cuando se usó DCM y 5g de PCL en 100 ml de solvente.

3.2 Caracterización de recubrimientos

Después de preparar los recubrimientos se determinó su tamaño y ζ obteniéndose los datos de la Tabla 4.

El tamaño medio de las nanocápsulas preparadas por diferentes métodos generalmente va de 250 a 500 nm (Mora-Huertas *et al.*, 2010). En cuanto a la nanoemulsión, generalmente se considera que el tamaño de partícula esté por debajo o alrededor de los 100 nm de diámetro (Sarker, 2005).

ζ es un parámetro importante para un gran número de aplicaciones; valores menores a -10mV determinan una buena estabilidad coloidal (Mora-Huertas *et al.*, 2010).

Con estas referencias se puede decir conforme a los datos mostrados en la Tabla 4 que las nanopartículas se encuentran dentro de los rangos requeridos para cada caso por lo que la experimentación continuó.

Tabla 4. Datos de tamaño de partícula y ζ de diferentes recubrimientos.

Recubrimiento	Tamaño (nm)	Potencial ζ (mV)
NCS	363.37 \pm 11.63	-33.90 \pm 0.96
NCSX	296.90 \pm 3.71	-42.33 \pm 1.74
NEX	116.00 \pm 1.92	-61.87 \pm 2.95
NEsf	272.73 \pm 2.71	-28.77 \pm 1.67

3.2.1 Microscopía electrónica de barrido

En la figura 10, 11 y 12 se presentan las micrografías obtenidas de la superficie de manzana recubierta con nanocápsulas con goma xantana, nanoemulsión con goma xantana y nanocápsulas sin goma.

Se puede observar que en NCSX (Fig. 10) y en NEX (Fig. 11) se forman vesículas de tamaño menor a 10 μm en ambos casos lo que se atribuye a una aglomeración de las nanopartículas debida a la goma xantana.

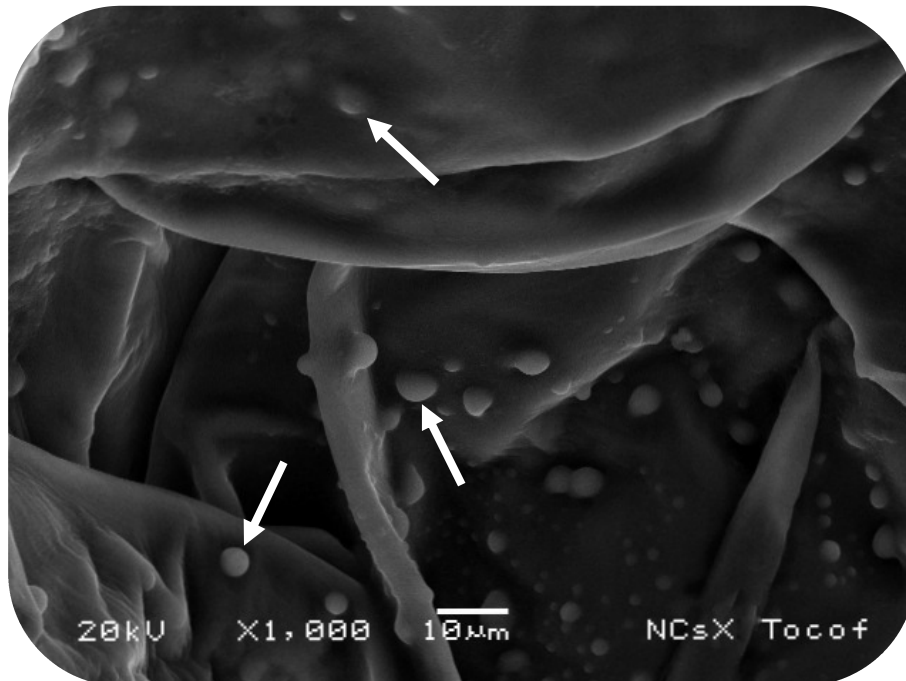


Fig. 10 Superficie de manzana recubierta con NCSX. Las flechas indican las vesículas formadas por la goma xantana y las nanopartículas

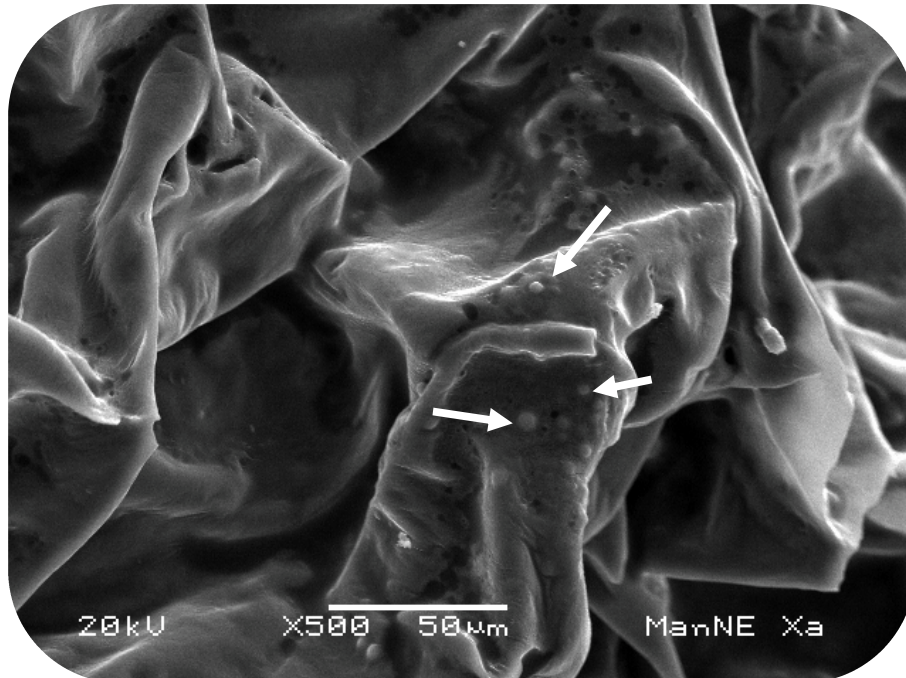


Fig. 11 Superficie de manzana recubierta con NEX. Las flechas indican las vesículas formadas por la goma xantana y las nanopartículas

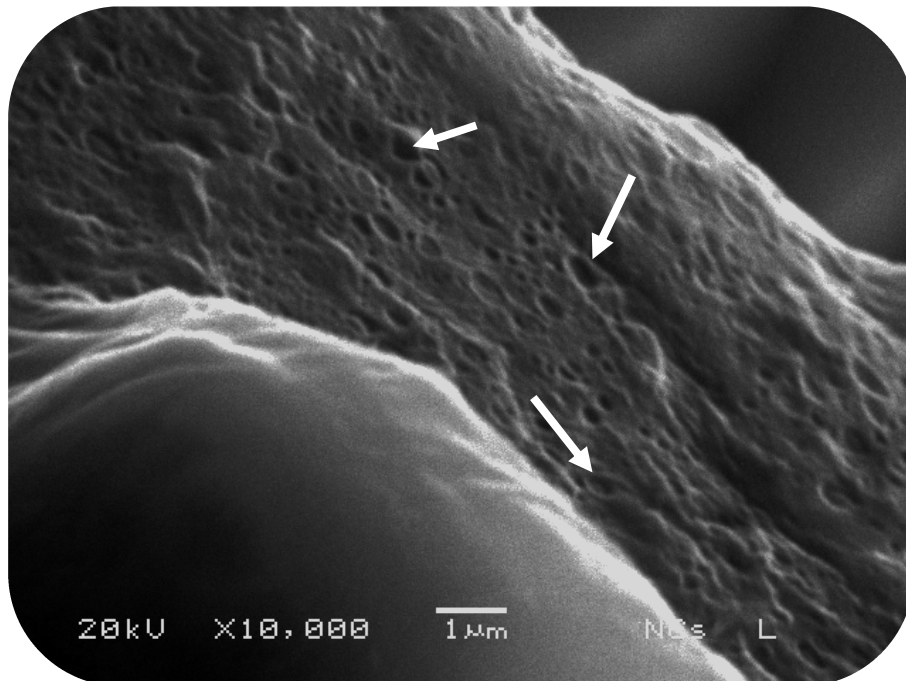


Fig. 12 Superficie de manzana recubierta con NCSX las flechas indican algunas de las marcas dejadas por las nanocápsulas en el tejido de la manzana

En la micrografía de NCS (Fig. 12) se aprecian pequeños cráteres en la superficie de la manzana de tamaño menor a $0.5 \mu\text{m}$, éstos indican los lugares donde se encontraban las

nanocápsulas las cuales fueron destruidas debido al tratamiento que se le da a la muestra para obtener la micrografía.

3.3 Pruebas de dispersión de luz

Para las pruebas de dispersión de luz se realizaron mediciones sobre manzanas con recubrimiento de dióxido de titanio con y sin goma xantana (TiO_2X y TiO_2 respectivamente) con el objetivo de comprobar las propiedades de bloqueo UV de las nanocápsulas es similar a la capacidad de absorción UV del TiO_2 (Villalobos-Hernández y Müller-Gotmann, 2006); sin embargo, el recubrimiento provocó la acumulación de partículas blancas sobre la superficie de los gajos de manzana (Fig. 13a y 13b) así como la resequedad de los tejidos por lo que las lecturas que se realizaron en el colorímetro no son confiables. Es por ésto que en los resultados y discusión siguientes no se tomaron en cuenta estos dos recubrimientos.

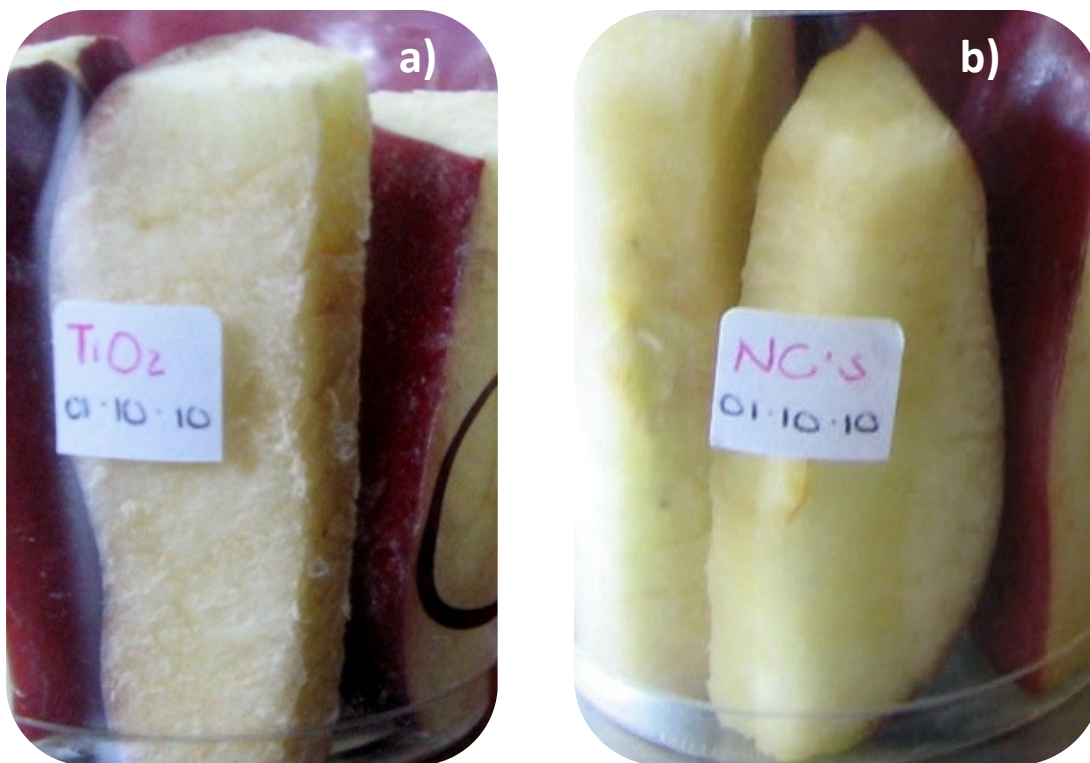


Fig. 13 (a) Lote de manzanas tratadas con un recubrimiento de TiO_2 en el que se aprecian las partículas blancas en la superficie de los 'gajos', (b) recubrimiento de NCS.

3.3.1 Cambios en °HUE

En la Fig. 14 se muestran los cambios en el °HUE para las manzanas sometidas a diferentes tratamientos, resaltando que valores de 90° representan un color amarillo y una disminución de este ángulo representará para el caso de las manzana un desarrollo de oscurecimiento (Albanese *et al.*, 2007).

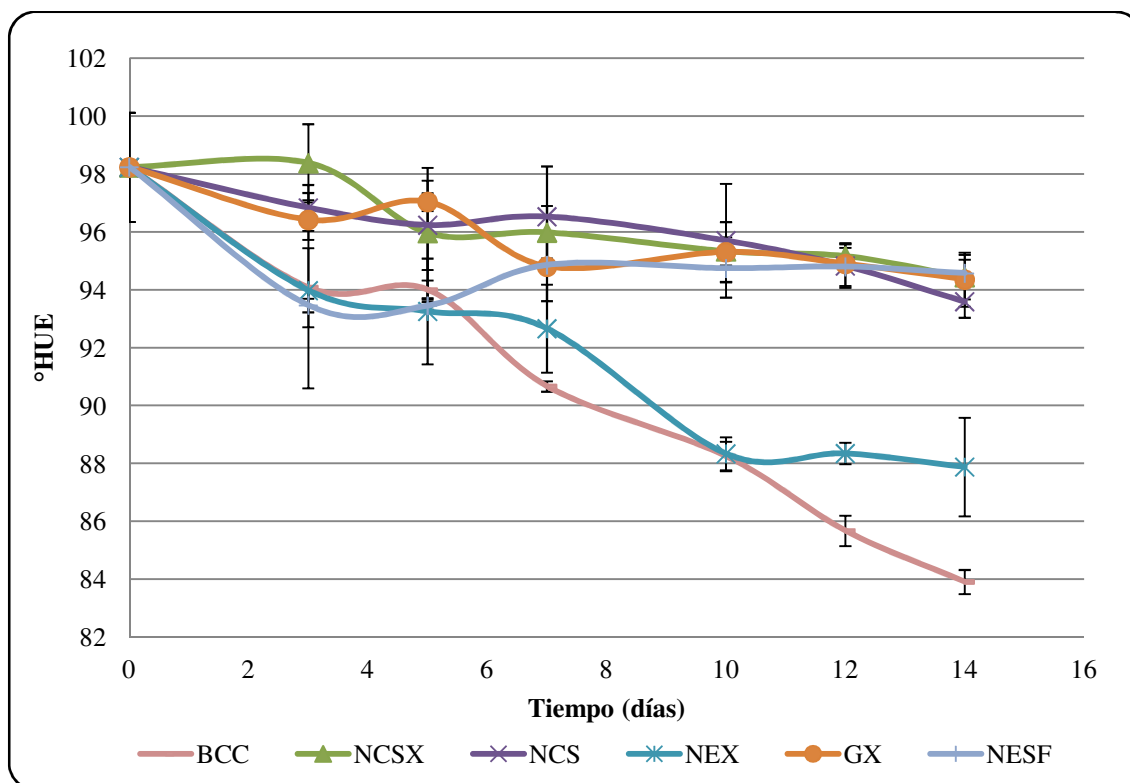


Fig. 14 Evaluación del cambio de °HUE de manzana empleando diferentes recubrimientos.

Se observa que GX, NCS y NCSX presentan una menor disminución en °HUE y por lo tanto un menor oscurecimiento. En la Tabla 5 se muestran los resultados de las regresiones lineales que expresan la velocidad de cambio de °HUE/día, la ordenada al origen y el coeficiente de determinación. Es posible deducir que se partió de muestras de color homogéneo como lo indica la ordenada al origen, la mayor velocidad de oscurecimiento fue para BCC mientras que GX, NCS y NCSX presentan la más baja; es importante resaltar que aunque las NESf presenta una menor velocidad no es representativa del proceso de oscurecimiento ya que la mayor velocidad de oscurecimiento se presentó durante los 6 primeros días a una velocidad superior a los 0.25 días^{-1} , para posteriormente permanecer sin

cambio aparente durante los siguientes días de almacenamiento lo que es indicativo de la efectividad del α -tocoferol cargado en las NCS. Por otro lado, comparando los coeficientes de determinación (R^2) entre los tres recubrimientos con menor velocidad de oscurecimiento y observando la gráfica se puede decir que NCS muestran un comportamiento homogéneo mientras que NCSX presenta un mayor oscurecimiento entre los días 3 y 5 aunque posteriormente mantiene un comportamiento homogéneo; en GX las variaciones de observan a partir del día 3 hasta el día 10.

Tabla 5. Datos obtenidos mediante una regresión lineal de la Fig. 14.

Recubrimiento	Velocidad de cambio de °HUE/día	Ordenada al origen	R²
BCC	-1.01 ^a	98.04 ^a	0.99
NCSX	-0.28 ^b	98.26 ^a	0.86
NCS	-0.28 ^b	98.26 ^a	0.92
NEX	-0.74 ^c	97.19 ^a	0.93
GX	-0.25 ^b	97.70 ^a	0.81
NESF	-0.12 ^d	95.73 ^b	0.14

Letras iguales indican que no existió diferencia estadísticamente significativa ($\alpha = 0.05$)

Es necesario mencionar que el menor ajuste mostrado por las manzanas tratadas con NCSX y GX representa en gran medida la diferencia existente con respecto al comportamiento visual observado en las muestras ya que se observó claramente que las NCS presentaron un oscurecimiento mucho menor después de 14 días de almacenamiento (Fig. 15).

Mediante el análisis de varianza realizado con un nivel de significancia de 0.05 se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos.

3.3.2 Cambios de cromaticidad (C)

En la Fig. 16 se muestran los cambios en cromaticidad que representan la saturación del color de un objeto evaluada en comparación con la brillantez de un objeto blanco bajo las mismas condiciones de iluminación (Ohta & Robertson, 2005). Las muestras con mayor

saturación y brillantez en el color fueron las muestras control (BCC), explicando esto en función a los cambios en el °HUE de la Fig. 14. La cromaticidad de las muestras con GX y NEX mostraron mayor intensidad de color oscuro después del periodo de almacenamiento lo que se puede contrastar con el comportamiento mostrado en las fotografías de la Fig. 15.



Fig. 15 Efectos sobre el color de diferentes recubrimientos después de 14 días de almacenamiento (a) NCSX; (b) NCS; (c) NEX; (d) GX; (e) NESf; (*f) BCC. *sólo dos días de almacenamiento debido a la rápida descomposición que presenta sin otro recubrimiento.

La saturación del color permaneció prácticamente sin variación y con un valor promedio de 23 a partir de los 4 días de almacenamiento en los sistemas con NCS atribuido esto a que debido al tamaño de partícula y al encapsulamiento de dl- α -tocoferol fue posible que las NCS se infiltraran en la superficie del tejido de la manzana contribuyendo a eficientemente a disminuir la velocidad de oscurecimiento.

De acuerdo al análisis de varianza realizado con un nivel de significancia de 0.05 se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos, sin embargo es importante resaltar que de acuerdo a la prueba de diferenciación de medias (Tuckey), las muestras de GX y NEX no mostraron diferencias en cuanto el valor del cromata.

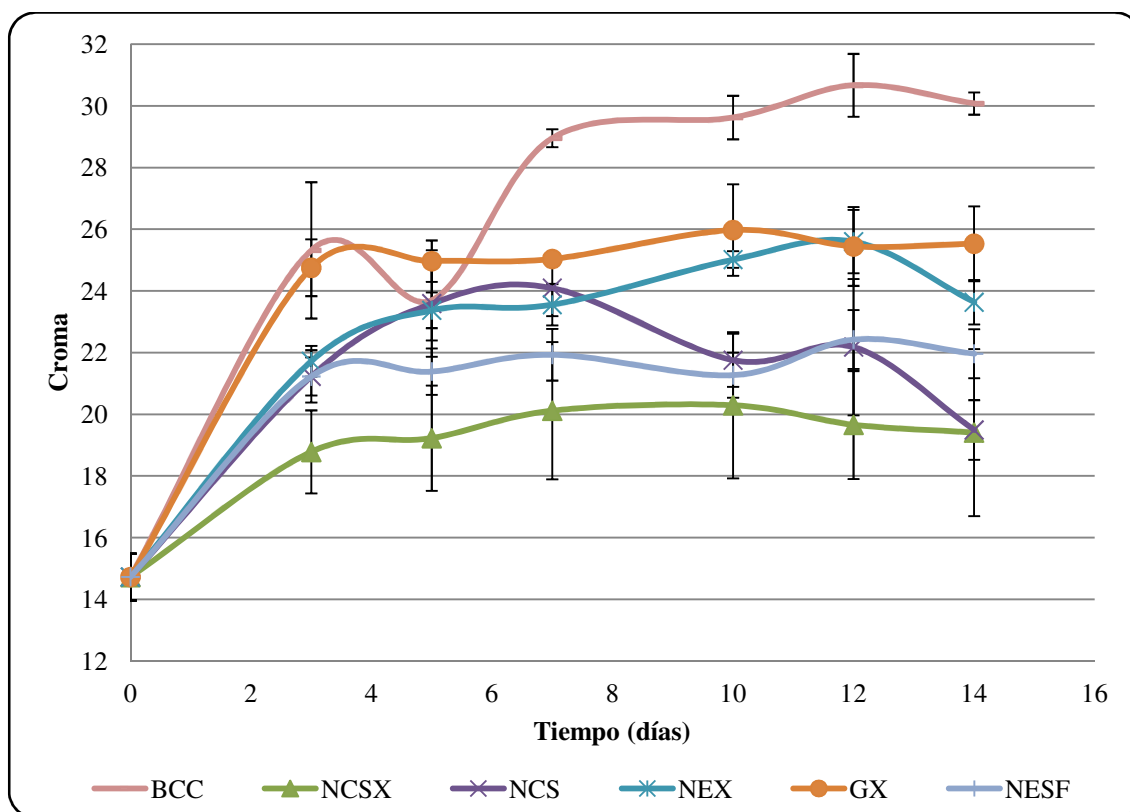


Fig.16 Evaluación del cambio de cromaticidad de manzana empleando diferentes recubrimientos.

3.3.3 Velocidad de oscurecimiento

Mediante la obtención de la velocidad de oscurecimiento ($\Delta IO / tiempo$) y graficando como se muestra en la Fig.17 se observa que el recubrimiento BCC presenta una velocidad de oscurecimiento mucho mayor que cualquiera de los otros recubrimientos seguido por GX. En todos los casos excepto en NCS se observa que hay un rápido aumento en la VO del día 0 al 3 y posteriormente se mantiene prácticamente constante en el caso de GX y NESf, mientras que aumenta de manera homogénea para NCSX y NEX. En el recubrimiento de NCS se aprecia que el oscurecimiento se dio desde el día 0 hasta el 5 permaneciendo después constante.

Estadísticamente se encontró una diferencia significativa entre los tratamientos de acuerdo al análisis de varianza realizado con un nivel de significancia de 0.05

De acuerdo al análisis de varianza realizado con un nivel de significancia de 0.05 se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos, sin embargo es importante resaltar que de acuerdo a la prueba de diferenciación de medias (Tuckey), las muestras con goma xantana y nonoemulsión con goma xantana no mostraron diferencias en cuanto el valor del croma.

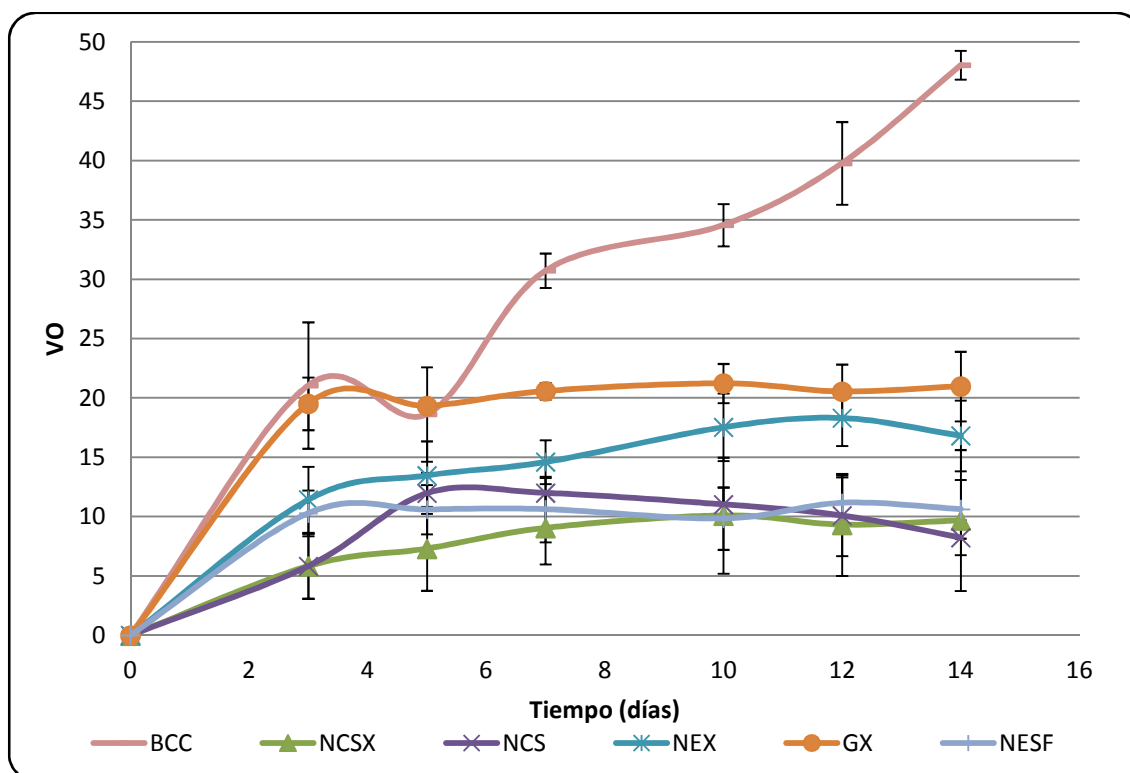


Fig. 17 Velocidad de oscurecimiento de manzanas con diferentes recubrimientos a través de 14 días de almacenamiento.

Obteniendo la pendiente de la VO del primer periodo del recubrimiento de NCS se puede observar mediante una regresión lineal (Tabla 6) que ésta aumenta de manera homogénea mientras que en el periodo posterior permanece prácticamente constante. Este comportamiento puede deberse a la distribución de las nanocápsulas sobre el tejido de la manzana lo cual se explicará a detalle más adelante.

Tabla 6. Determinación de la VO de las manzanas con recubrimiento de NCS dividido en dos periodos.

Recubrimiento NCS	Pendiente	R²
1er periodo (ascenso)	2.36	0.98
2do periodo (constante)	-0.52	0.93

3.4 Liberación in vivo de dl- α -tocoferol

En la Fig. 18 se muestran los gráficos de dispersión obtenidos en función al tiempo y que corresponden a la liberación de dl- α -tocoferol. Se puede ver que en las manzanas con recubrimientos que no contenían dl- α -tocoferol los valores de concentración/mg de fruta permanecen cercanos a cero debido a que el contenido natural de vitamina E de la manzana es de sólo 0.002 $\mu\text{g} / \text{g}$ de porción comestible (Moreiras *et al.*, 2005), además la manzana contiene otros compuestos solubles en EtOH cuya longitud de onda es cercana a los 285 nm; por ejemplo Honda *et al.* (1981) estudiaron acerca de la determinación de azúcares reductores como la D-glucosa mediante métodos espectrofotométricos UV en donde la determinación se realiza a 276 nm. Las manzanas con recubrimientos que contenían dl- α -tocoferol obviamente presentaron una mayor liberación.

También se puede observar que el comportamiento de NCSX y NEX es similar lo cual puede atribuirse a que la goma xantana funciona como una barrera que impide la entrada y salida de vitamina. Las Fig. 10 y 11 muestran que en las manzanas con recubrimientos que contienen GX se forman pequeñas vesículas; cuando el sistema va perdiendo humedad la goma xantana se va deshidratando y arrastra consigo a las nanopartículas de manera que éstas se juntan y forman estas aglomeraciones; en cambio, el recubrimiento de NCS se distribuye de manera más uniforme en los tejidos de la manzana lo que se observa en la Fig. 12 como pequeños cráteres en los sitios donde se alojaron las nanocápsulas.

Además, el aumento rápido en la concentración que se observa en NCSX y NEX para el día 3 y el posterior decremento indica que la liberación se da de manera instantánea; en las manzanas con recubrimiento de NCS el aumento se da de forma progresiva hasta el día 10 que es cuando alcanza el punto máximo y después decrece.

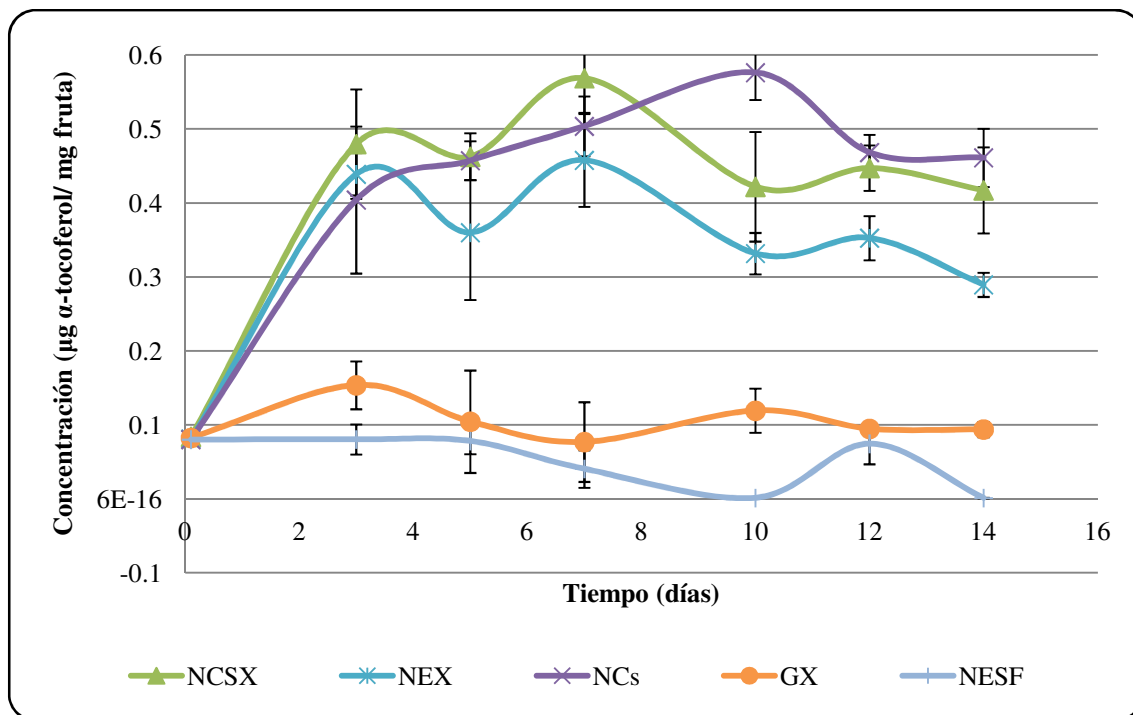


Fig. 18 Liberación de dl- α -tocoferol por mg de manzana con diferentes recubrimientos durante 14 días de almacenamiento.

El análisis estadístico prueba que si hubo diferencia significativa entre los recubrimientos siendo $p < 0.05$.

3.4.1 Determinación del coeficiente de difusión de NCS

Debido a que las NCS fueron el único recubrimiento que presentó una liberación controlada se puede determinar su coeficiente de difusión de acuerdo al modelo propuesto por Crank (1975) para placas en una solución de volumen definido en agitación (Ec. 9) la cual muestra la relación de la cantidad total de sustancia activa (M_t) liberada a un tiempo t , respecto a la cantidad liberada en condiciones de equilibrio (M_∞).

Las rodajas de manzana de espesor L con recubrimiento de NCS se colocaron en un volumen definido de EtOH en agitación. Se consideró que no hay reacción química entre el dl- α -tocoferol y el PCL por lo que la transferencia de masa en el recubrimiento se lleva a cabo por difusión y por lo tanto el coeficiente de difusión efectivo del dl- α -tocoferol (D) es constante.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2\alpha(1 + \alpha)}{1 + \alpha + \alpha^2 q_n^2} \exp(-Dq_n^2 t/L^2) \quad \text{Ec. 9}$$

donde q_n^2 son las raíces positivas de $\tan q_n = -\alpha q_n$, α es la relación del volumen de la solución y la placa ($\alpha=a/L$), D es el coeficiente de difusión efectivo del dl- α -tocoferol (cm^2/s), L es el espesor del recubrimiento (cm), $M_t = m_t - m_\infty$ es la cantidad total de sustancia activa liberada del recubrimiento al tiempo t (g) y $M_\infty = m_0 - m_\infty$ es la cantidad total de la sustancia activa liberada del recubrimiento en condiciones de equilibrio (g).

De acuerdo a los datos de las raíces de $\tan q_n = -\alpha q_n$ proporcionados por Crank (1975) se obtuvo la Ec. 10 a partir de la Ec. 9 (ver apéndice A) donde m_∞ se consideró igual a cero porque la concentración de dl- α -tocoferol en el medio llegó a ser constante y por lo tanto se ha liberado completamente. Los datos de m_0 se tomaron de la Fig. 17 cuando la gráfica presentó un comportamiento constante.

$$\ln \frac{m_t - m_\infty}{m_0 - m_\infty} = \ln 0.0672 + \left(-717.2096 \frac{D}{L^2} \right) t \quad \text{Ec. 10}$$

Entonces, los datos utilizados para obtener el coeficiente de difusión del recubrimiento de NCS fueron

$$m_\infty = 0 \mu\text{g}$$

$$m_0 = 4270.57 \mu\text{g}$$

$$L = 7.4 \mu\text{m}$$

Es importante resaltar que L es una consideración teórica obtenida de una experimentación paralela donde se aplicó un recubrimiento *in vitro* y que se utilizó en este caso debido a que la aplicación del recubrimiento *in vivo* presentaría diversas variaciones como la cantidad de recubrimiento absorbido por el tejido de la manzana y la humedad en la superficie de las rodajas entre otros.

Los resultados del coeficiente de difusión en función del tiempo obtenidos mediante la Ec. 10 se presentan en la Fig. 17 donde se observa que éste disminuye con respecto al tiempo de almacenamiento.

3.4.2 Velocidad de liberación de dl- α -tocoferol

Por otro lado se obtuvo la velocidad de liberación de dl- α -tocoferol mediante la relación de la concentración de dl- α -tocoferol por mg de fruta por tiempo. Como se mencionó antes, las curvas de GX y NESf muestran que la concentración de dl- α -tocoferol es prácticamente igual a cero por lo tanto para la determinación de la velocidad de liberación únicamente se tomaron en cuenta los recubrimientos NCSX, NCS y NEX.

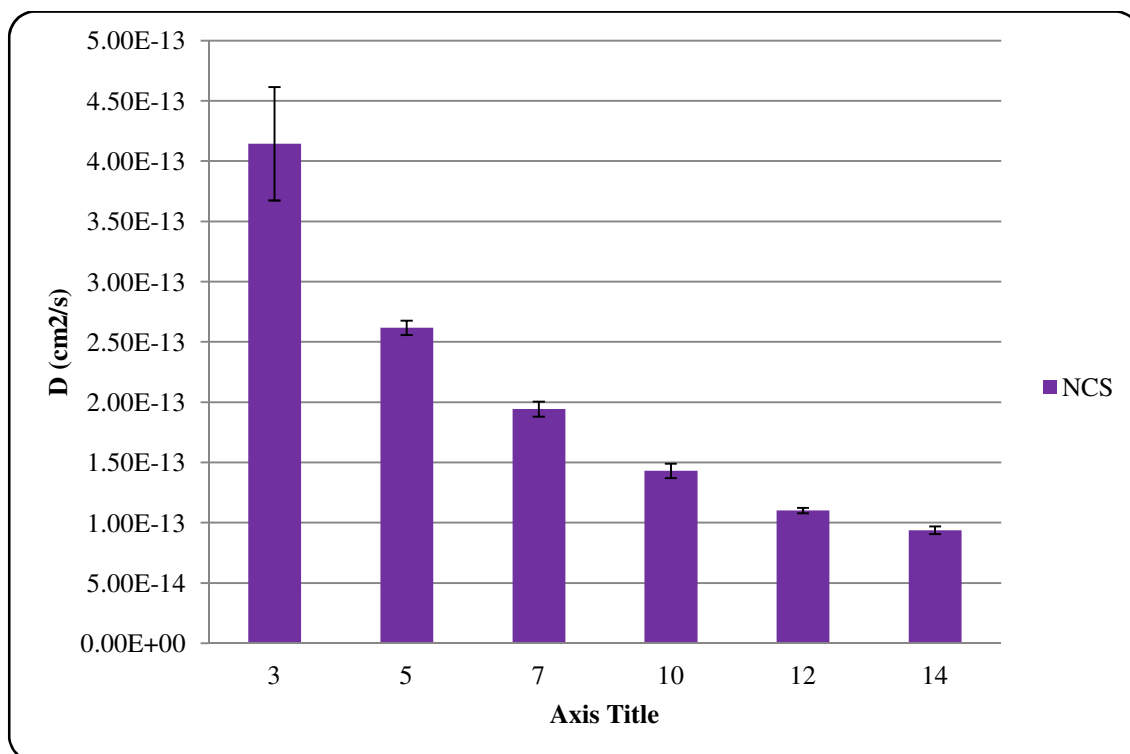


Fig. 19 Coeficiente de difusión efectiva de un recubrimiento de NCS en función del tiempo de almacenamiento

Haciendo una regresión lineal de las curvas de velocidad de liberación (Fig. 20) de dl- α -tocoferol se observa por la ordenada al origen que se partió de muestras homogéneas (Tabla 7). Las pendientes indican que la velocidad de liberación más alta es la del recubrimiento de NCSX seguida de NEX; sin embargo, R^2 en ambos casos es menor que para NCS.

También puede verse en la Fig. 18 que los recubrimientos con goma xantana comienzan con una liberación rápida en los días 3 a 5 y posteriormente la liberación se vuelve más lenta en ambos casos. A pesar de que al inicio la velocidad de liberación del recubrimiento de NCS es más lenta su comportamiento homogéneo hace que al final la velocidad sea mayor que en los otros dos recubrimientos.

La distribución de las nanopartículas que muestran las micrografías de las Figs. 10, 11 y 12 indica que al existir una aglomeración en los recubrimientos con goma xantana el dl- α -tocoferol liberado de las partículas de la superficie de la vesícula es el que se cuantifica en un inicio lo que explicaría que la velocidad de liberación en los primeros días sea mayor que en el recubrimiento de NCS aunque esta misma distribución es la que impide la completa liberación del dl- α -tocoferol de las nanopartículas que se encuentran más hacia el centro de la vesícula ya que tarda más tiempo en llegar a la superficie de la misma; en cambio las NCS no presentan esta barrera y por lo tanto la liberación se presenta de forma homogénea ya sea por difusión o por biodegradación.

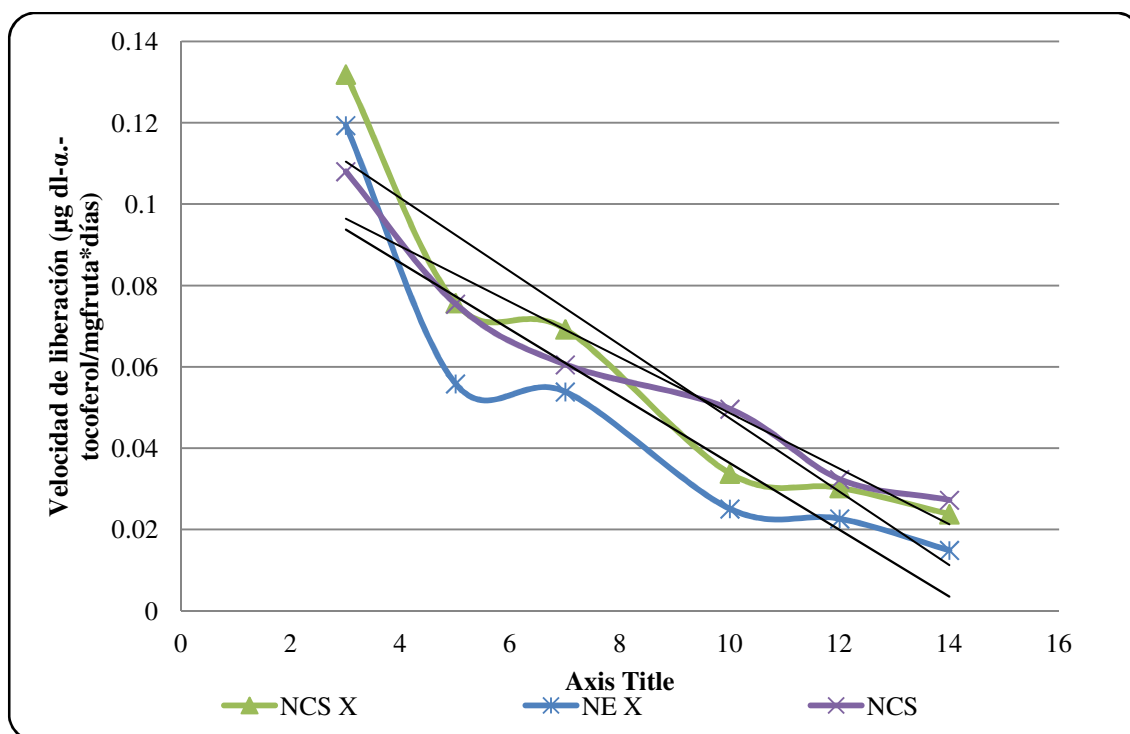


Fig. 20 Curvas de velocidad de liberación de los recubrimientos que contenían dl- α -tocoferol.

Tabla 7. Determinación de la velocidad de liberación de dl- α -tocoferol.

Recubrimiento	Velocidad de liberación (mg de dl-α-tocoferol /mg fruta*día)	Ordenada al origen	R²
NCSX	0.0090	0.1374	0.8679
NEX	0.0082	0.1183	0.8077
NCS	0.0068	0.1170	0.9320

CONCLUSIONES

- La utilización de sistemas de talla nanométrica permitió la liberación de dl- α -tocoferol contribuyendo a un incremento visible sobre la vida útil de manzana fresca-cortada y refrigerada.
- El dl- α -tocoferol liberado de los sistemas con nanocápsulas disminuyó el índice de oscurecimiento en manzana fresca-cortada y refrigerada permitiendo conservar su apariencia por más tiempo.
- Los recubrimientos de NCSX y NEX muestran que la adición de goma xantana se presenta como una barrera para la liberación controlada del dl- α -tocoferol.
- La aplicación directa de las NCS cargadas de dl- α -tocoferol es más efectiva ya que presenta coeficientes de difusión bajos y por lo tanto tiempos de liberación más largos lo que resulta en una mejor conservación de la manzana comparando con el recubrimiento de nanocápsulas con goma xantana.
- El uso de la nanotecnología como método de conservación de alimentos permite el uso de frutas frescas-cortadas y refrigeradas como posibles alimentos funcionales de larga vida útil mediante la nanoencapsulación de nutraceuticos, como el dl- α -tocoferol que cuenta con propiedades antioxidantes benéficas para la salud.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdelwahed, W.; Degobert, G.; Stainmesse, S.; Fessi, H. (2006). *Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations*. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 58, 1688-1713
- Ahvenainen, R. (1996). *New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetables*. *Trends in Food Science & Technology*. 71, 179-187
- Albanese, D.; Cinquanta, L.; Di Matteo, M. (2007). *Effects of an innovative dipping treatment on the cold storage of minimally processed Annurca apples*. *Food Chemistry*. 105, 1054–1060
- Allende, A.; Tomás-Barberán, F.; Gil, M. I. (2006). *Minimal processing for healthy traditional foods*. *Trends in Food Science & Technology*. 17, 513–519
- Almengor, L. (2009). *Nanotecnología en la industria alimentaria*. *Revista Electrónica de la Universidad Rafael Landívar*. 13, 35-52
- Babak, V.G.; Baros, F.; Boulanouar, O.; Boury, F.; Fromm, M.; Kildeeva, N. R.; Ubrich, N.; Maincent, P. (2007). *Impact of bulk and surface properties of some biocompatible hydrophobic polymers on the stability of methylene chloride-in-water mini-emulsions used to prepare nanoparticles by emulsification–solvent evaporation*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 59, 194–207
- Balla, C.; Farkas, J. (2006). *Minimally processed fruits and fruit products and their microbiological safety*, en *Handbook of fruits and fruit processing*, editado por Hui, Y. U.S.A. Blackwell Publishing.
- Bhushan, B. (2003). *Springer handbook of nanotechnology*. U.S.A. Springer.
- Bouwmeester, H.; Dekkers, S.; Noordam, M.Y.; Hagens, W.I.; Bulder, A.S.; de Heer, C.; ten Voorde, S.E.C.G.; Wijnhoven, S.W.P.; Marvin, H.J.P. Sips, A.J.A.M. (2009). *Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 53, 52–62

- Brody, A. L.; Strupinsky, E. R.; Kline, L. R. (2001). *Active packaging for food applications*. U.S.A. CRC Press.
- Brunjes, H. (2005). *Characterization of solid lipid nano- and microparticles*. En *Lipospheres in drug targets and delivery: approaches, methods and applications*, editado por Nastruzzi, C. U.S.A. CRC Press.
- Brunner, T.A.; van der Horst, K.; Siegrist, M. (2010). *Convenience food products. Drivers for consumption*. *Appetite*. 55, 498–506
- Byun, Y.; Hwang, J.B.; Bang, S.H.; Darby, D.; Cooksey, K.; Dawson, P.L.; Park, H.J.; Whiteside, S. (2010). *Formulation and characterization of α -tocopherol loaded poly ϵ -caprolactone (PCL) nanoparticles*. *LWT - Food Science and Technology*, doi: 10.1016/j.lwt.2010.06.032
- Carballo, B. (1991). *Conservación de productos agrícolas. Primera, segunda, tercera y cuarta gama*. *Agricultura: Revista agropecuaria*. 708, 626-629
- Chen, C.-C.; Wagner, G. (2004). *Vitamin E nanoparticle for beverage applications*. *Chemical Engineering Research and Design*. 82, 1432–1437
- Chi-Fai, C.; Shiu-Huei, W.; Gow-Chin, Y. (2007). *The development of regulations for food nanotechnology*. *Trends in Food Science & Technology*. 18, 269-280
- Crank, J. (1975). *Mathematics of diffusion*. Segunda edición. U.S.A. Clarendon Press.
- Dainelli, D.; Gontard, N.; Spyropoulos, D.; Zondervan-van den Beuken, E.; Tobback, P. (2008). *Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns*. *Trends in Food Science & Technology*. 19, S103-S112
- De Azeredo, H.M.C. (2009). *Nanocomposites for food packaging applications*. *Food Research International*. 42, 1240-1253
- De Boer, M.; McCarthy, M.; Cowan, C.; Ryan, I. (2004). *The influence of lifestyle characteristics and beliefs about convenience food on the demand for convenience foods in the Irish market*. *Food Quality and Preference*. 15, 155–165

- Eitenmiller, R.; Lee, J. (2004). *Vitamin E. Food chemistry, composition and analysis*. U.S.A. Marcel Dekker Inc.
- English, N.J.; Long, W.F. (2009). *Estimation of zeta potentials of titania nanoparticles by molecular simulation*. *Physica A*. 388, 4091-4096.
- Fessi, H.C.; Devissaguet, J.-P.; Puisieux, F.; Thies, C. (1992). *Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanoparticles*. U.S.A. Patente. 5,118,528
- Fievet, P.; Sbaï, M.; Szymczyk, A.; Vidonne, A. (2003). *Determining the ζ -potential of plane membranes from tangential streaming potential measurements: effect of the membrane body conductance*. *Journal of Membrane Science*. 226, 227-236
- Foladori, G.; Ivernizzi, N. (2008). *Nanotecnologías en la alimentación y agricultura*. Uruguay. Universidad de la República.
- Hampson, C.R. y Kemp, H. (2003). *Characteristics of important commercial apple cultivars*, en *Apples: Botany, production and uses*, editado por Ferree, D.C. y Warrington, I.J. CABI Publishing. U.S.A.
- Holzer, M.; Vogel, V., Mäntele, W.; Schwartz, D.; Haase, W.; Langer, K. (2009). *Physico-chemical characterization of PLGA nanoparticles after freeze-drying and storage*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 72, 428-437
- Honda, S.; Nishimura, Y.; Takahashi, M.; Chiba, H.; Kakehi, K. (1981). *Manual method for the spectrophotometric determination of reducing carbohydrates with 2-cyanoacetamide*. *Analytical Biochemistry*. 119, 194-199
- Huisman, I.H.; Trägårdh, G. (1999). *Determining the zeta potential of ultrafiltration membranes using their salt retention*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 157, 261-268
- Islam, N.; Miyazaki, K. (2009). *Nanotechnology innovation system: Understanding hidden dynamics of nanoscience fusion trajectories*. *Technological Forecasting & Social Change*. 76, 128-140

- Jiménez-Colmenero, F.; Carballo, J.; Cofrades, S. (2001). *Healthier meat and meat products: their role as functional foods*. *Meat Science*. 59, 5-13
- Kenneth, D. (2008). *Socio-technical analysis of those concerned with emerging technology, engagement and governance*, en *What can nanotechnology learn from biotechnology*, editado por Kenneth, D. y Thompson, P. U.S.A. Elsevier.
- Klabunde, K. (2001). *Introduction to nanotechnology*, en *Nanoscale materials in chemistry*, editado por Klabunde, K.J. U.S.A. Wiley-Interscience.
- Kumari, A.; Yadav, S.; Yadav, S.C. (2010). *Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 75, 1-18
- Lakkis, J. (2007). *Introduction*, en *Encapsulation and Controlled Release: Technologies in Food Systems*, editado por Lakkis, J. U.S.A. Blackwell Publishing.
- Lamikanra, O. (2002). *Enzymatic effects on flavor and texture of fresh-cut fruits and vegetables*, en *Fresh-cut fruits and vegetables. Science, technology, and market*, editado por Lamikanra, O. U.S.A. CRC Press.
- Lee, J.Y.; Park, H.J.; Lee, C.Y.; Choi, W.Y. (2003). *Extending shelf-life of minimally processed apples with edible coatings and antibrowning agents*. *LWT*. 36, 323–329
- Liao, D.L.; Wu, G.S.; Liao, B.Q. (2009). *Zeta potential of shape controlled TiO₂ nanoparticles with surfactants*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 348, 270-275.
- Lozano, J.E. (2006). *Fruit Manufacturing. Scientific Basis, Engineering Properties, and Deteriorative Reactions of Technological Importance*. Argentina. Springer.
- Luby, J.J. (2003). *Taxonomic Classification and Brief History*, en: *Apples: botany, production and uses*, editado por Ferree, D.C. y Warrington, I.J. U.S.A. CABI Publishing.
- Malvern Instruments©. (2004). *Zetasizer nano series user manual*. Inglaterra.

- Mamalis, A.G. (2007). *Recent advances in nanotechnology*. Journal of Materials Processing Technology. 181, 52–58
- Manresa, A.; Vicente, I. (2007). *El color en la industria de los alimentos*. Cuba. Editorial Universitaria.
- Margalit, R. y Yureshalmi, N. (2006). *Pharmaceutical Aspects of Liposomes: Academic and Industrial research and Development*, en *Microencapsulation. Methods and industrial applications*, editado por Benita, S. 2a edición. U.S.A. CRC Press.
- Martín-Belloso, O.; Soliva-Fortuny, R.; Oms-Oliu, G. (2006). *Fresh-Cut Fruits*, en *Handbook of fruits and fruit processing*, editado por Hui, Y. U.S.A. Blackwell Publishing.
- Menrad, K. (2003). *Market and marketing of functional food in Europe*. Journal of Food Engineering. 56, 181–188
- Miller, G.; Senjen, R. (2008). *Del laboratorio a la cadena alimenticia: La nanotecnología en los alimentos y la agricultura*, en *Nanotecnologías en la Alimentación y Agricultura*, editado por Foladori, G.; Ivernizzi, N. Uruguay. Universidad de la República.
- Moinard-Chécot, D.; Chevalier, Y.; Briançon, S.; Beney, L.; Fessi, H. (2007). *Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion–diffusion process*. Journal of Colloid and Interface Science. 317, 458–468
- Mora-Huertas, C.E.; Fessi, H.; Elaissari, A. (2010). *Polymer based nanocapsules for drug delivery*. International Journal of Pharmaceutics. 385, 113-142
- Moreiras, O.; Carbajal, A.; Cabrera, L.; Cuadrado, C. (2005). *Tablas de composición de Alimentos*. Madrid. Pirámide.
- Muñoz, M.E.; Galan, A.I.; Palacios, E.; Diez, M.A.; Muguerza, B.; Cobaleda, C.; Calvo, J.I.; Aruoma, O.I.; Sanchez-García, I.; Jimenez, R. (2010). *Effect of an antioxidant functional food beverage on exercise-induced oxidativestress: A long-term and large-scale clinical intervention study*. Toxicology. 278, 101–111

- Nagarajan, R. (2008). *Nanoparticles: Building blocks for nanotechnology*, en *Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation and Functionalization*, editado por Nagarajan, R. y Hatton, A. U.S.A. American Chemical Society.
- NMX-FF-061-SCFI-2003. *Productos agrícolas no industrializados para consumo humano - Fruta fresca - Manzana (Malus pumila Mill) - (Malus domestica Borkh) – Especificaciones.*
- O'Connor, E.L.; White, K.M. (2010). *Willingness to trial functional foods and vitamin supplements: The role of attitudes, subjective norms, and dread of risks.* Food Quality and Preference. 21, 75–81
- Ohta, N.; Robertson, A. (2007). *Colorimetry. Fundamentals and applications.* Inglaterra. John Wiley & Sons Ltd
- Oms-Oliu, G.; Soliva-Fortuny, R.; Martín-Belloso. O. (2008). *Using polysaccharide-based edible coatings to enhance quality and antioxidant properties of fresh-cut melon.* LWT - Food Science and Technology. 41, 1862-1870
- Palou, E.; López-Malo, A.; Barbosa-Cánovas, G.V.; Welti-Chanes, J.; Swanson, B.G. (1999). *Polyphenoloxidase activity and color of blanched and high hydrostatic pressure treated banana puree.* Journal of Food Science. 64, 42-45
- Pavlath, A.E. y Orts, W. (2009). *Edible films and coatings: why, what and how?*, en *Edible Films and Coatings for Food Applications*, editado por Embuscado, M.E. y Huber, K.C. U.S.A. Springer.
- Pichot, C. (2008). *Reactive Nanocolloids for Nanotechnologies and Microsystems*, en *Colloidal Nanoparticles in Biotechnology*, editado por Elaissari, A. U.S.A. Wiley-Interscience.
- Piñón-Segundo, E.; Ganem-Quintanar, A.; Garibay-Bermúdez, J.; Escobar-Chávez, J.; López-Cervantes, M.; Quintanar-Guerrero, D. (2006). *Preparation of nanoparticles by solvent displacement using a novel recirculation system.* Pharmaceutical Development and Technology. 11, 493-501

- Pothakamury, U.; Barbosa- Cánovas, G. (1995). *Fundamental aspects of controlled release in foods*. Trends in Food Science & Technology. 61, 397-406
- Quintanar-Guerrero, D.; Alléman, E.; Doelker, E.; Fessi, H. (1998). *Preparation and Characterization of Nanocapsules from Preformed Polymers by a New Process Based on Emulsification-Diffusion Technique*. Pharmaceutical Research. 15, 1056-1062.
- Ramírez, S.; Martín, A.; Rojas, S.; Cañestro, F.; Díaz, M.; Martínez, J.; Calceda, I.; Lorenzo, F.; Aguilar, M.; Benavente, J. (2008). *Restauración en servicios hospitalarios*. España. Editorial Vértice.
- Rao, C.N.R.; Müller, A.; Cheetham, A.K. (2004). *The Chemistry of Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications*. Vol. 1. Alemania. Wiley-VCH
- Raybaudi-Massilia, R.M.; Mosqueda-Melgar, J.; Martín-Belloso, O. (2008). *Edible alginate-based coating as carrier of antimicrobials to improve shelf-life and safety of fresh-cut melon*. International Journal of Food Microbiology. 121, 313–327
- Rico, D.; Martín-Diana, A.B.; Barat, J.M.; Barry-Ryan, C. (2007). *Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review*. Trends in Food Science & Technology. 18, 373-386
- Rojas-Graü, M.A.; Tapia, M.S.; Martín-Belloso, O. (2008). *Using polysaccharide-based edible coatings to maintain quality of fresh-cut Fuji apples*. LWT. 41, 139–147
- Rojas-Graü, M.A.; Soliva-Fortuny, R.; Martín-Belloso, O. (2009). *Edible coatings to incorporate active ingredients to freshcut fruits: a review*. Trends in Food Science & Technology. 20, 438-447
- Salas-Salvadó, J.; Bonada, A.; Trallero, R.; Saló, M.; Burgos, R. (2008). *Nutrición y dietética clínica*. 2ª edición. España. Elsevier Masson.

- Sánchez-Reyes, V. (2011). *Efecto del recubrimiento a base de nanocápsulas de vitamina E, sobre el índice de oscurecimiento de rebanadas de manzana variedad Red Delicious*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Sarker, D. (2005). *Engineering of nanoemulsions for drug delivery*. *Current Drug Delivery*. 2, 297-310
- Schaffazick, S.R.; Pohlmann, A.R.; Dalla-Costa, T.; Gutierrez, S.S. (2003). *Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersions. A comparative study*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 56, 501-505
- SIAP. (2010). *Base de datos de la producción agrícola del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera*. <http://www.siap.gob.mx> visitada el 15 de noviembre de 2010.
- Siegrist, M.; Stampfli, N.; Kastenholz, H.; Keller, C. (2008). *Perceived risks and perceived benefits of different nanotechnology foods and nanotechnology food packaging*. *Appetite*. 51, 283–290
- Sinha, N. (2006). *Apples*, en *Handbook of fruits and fruit processing*, editado por Hui, Y. U.S.A. Blackwell Publishing.
- Siró, I.; Kápolna, E.; Kápolna, B.; Lugasi, A. (2008). *Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-Areview*. *Appetite*. 51, 456–467
- Solans, C.; Izquierdo, P.; Nolla, J.; Azemar, N.; Garcia-Celma, M.J. (2005). *Nanoemulsions*. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 10, 102 – 110
- Soliva-Fortuny, R.C.; Martín-Belloso, O. (2003). *New advances in extending the shelf-life of fresh-cut fruits: a review*. *Trends in Food Science & Technology*. 14, 341–353
- Somchue, W.; Sermsri, W.; Shiowatana, J.; Siripinyanond, A. (2009). *Encapsulation of α -tocopherol in protein-based delivery particles*. *Food Research International*. 42, 909–914

- Stella, B.; Arpicco, S.; Rocco, F.; Marsaud, V.; Renoir, J.-M.; Cattel, L.; Couvreur, P. (2007). *Encapsulation of gemcitabine lipophilic derivatives into polycyanoacrylate nanospheres and nanocápsulas*. International Journal of Pharmaceutics. 344, 71–77
- Tholstrup, M.; Salomonsen, T.; Ipsen, R.; Clark, R.; Rolin, C.; Balling, S. (2007). *Zeta potential of pectin-stabilised casein aggregates in acidified milk drink*. International Dairy Journal. 17, 302-307
- Urala, N.; Lähteenmäki, L. (2004). *Attitudes behind consumers' willingness to use functional foods*. Food Quality and Preference. 15, 793–803
- Verbeke, W. (2005). *Consumer acceptance of functional foods: socio-demographic, cognitive and attitudinal determinants*. Food Quality and Preference. 16, 45–57
- Villalobos-Hernández, J.R. y Müller-Goymann, C.C. (2006). *Sun protection enhancement of titanium dioxide crystals by the use of carnauba wax nanoparticles: The synergistic interaction between organic and inorganic sunscreens at nanoscale*. International Journal of Pharmaceutics. 322, 161–170
- Villegas-Ochoa, M.; Ayala-Zavala, F.; Cruz, R.; Hernández, J.; González-Aguilar, G. (2006). *Efecto antioxidante de extractos naturales en manzana 'Red Delicious'*. Mundo Alimentario. Mayo-Junio, 24-30
- Wang, W.; Luo, C.; Shao, S.; Zhou. (2010). *Chitosan hollow nanospheres fabricated from biodegradable poly-D,L-lactide-poly(ethylene glycol) nanoparticle templates*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. Article in Press.
- Xiang, C.; Ruilan, L.; Yinghe, H. (2010). *A simple method for the preparation of monodisperse protein-loaded microspheres with high encapsulation efficiencies*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. Article in Press
- Yam, K.; Takhistov, P.T.; Miltz, J. (2005). *Intelligent Packaging: Concepts and Applications*. Journal of Food Science. 70, R1-R10

APÉNDICES

APÉNDICE A

SECUENCIA DE CÁLCULO PARA LA DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE DIFUSIÓN EFECTIVO

De la ecuación de Crank (1975) para placas en una solución de volumen definido en agitación

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2\alpha(1+\alpha)}{1+\alpha+\alpha^2 q_n^2} \exp(-Dq_n^2 t/L^2) \quad \text{Ec. A1}$$

donde

- q_n = Raíces positivas de $\tan q_n = -\alpha q_n$
 α = a/L
 D = Coeficiente de difusión efectivo del colorante en el recubrimiento (cm^2/s).
 L = Espesor del recubrimiento (cm)
 $M_t = m_t - m_\infty$ = Cantidad total de colorante liberado al tiempo t (g)
 $M_\infty = m_0 - m_\infty$ = Cantidad total de colorante liberado en condiciones de equilibrio (g)
 t = Tiempo (s)

De igual manera las raíces de $\tan q_n = -\alpha q_n$ se obtuvieron de la Tabla A1 (Crank, 1975) en la que se tomó el dato de 0.5 ya que se realizaron 5 muestreos en 10 días de liberación recordando que después del día 10 la liberación permaneció constante.

$$\frac{5 \text{ muestreos}}{10 \text{ días}} = 0.5$$

Después se realizaron las sumatorias requeridas en la Ec. A1 cuyos resultados se muestran en la Tabla A2. Aplicando logaritmos para eliminar el exponente se obtuvo la ecuación de una recta (Ec. A2) y con ésta se determinó mediante un despeje el coeficiente de difusión efectiva (Ec A3).

Tabla A1. Raíces positivas de $\tan q_n = -\alpha q_n$ (Crank, 1975)

Fractional uptake	α	q_1	q_2	q_3	q_4	q_5	q_6
0	∞	1.5708	4.7124	7.8540	10.9956	14.1372	17.2788
0.1	9.0000	1.6385	4.7359	7.8681	11.0057	14.1451	17.2852
0.2	4.0000	1.7155	4.7648	7.8857	11.0183	14.1549	17.2933
0.3	2.3333	1.8040	4.8014	7.9081	11.0344	14.1674	17.3036
0.4	1.5000	1.9071	4.8490	7.9378	11.0558	14.1841	17.3173
0.5	1.0000	2.0288	4.9132	7.9787	11.0856	14.2075	17.3364
0.6	0.6667	2.1746	5.0037	8.0385	11.1296	14.2421	17.3649
0.7	0.4286	2.3521	5.1386	8.1334	11.2010	14.2990	17.4119
0.8	0.2500	2.5704	5.3540	8.3029	11.3349	14.4080	17.5034
0.9	0.1111	2.8363	5.7172	8.6587	11.6532	14.6870	17.7481
1.0	0	3.1416	6.2832	9.4248	12.5664	15.7080	18.8496

Tabla A2. Sumatorias requeridas para la resolución de la Ec. A1

Raíces positivas	q_1	q_2	q_3	q_4	q_5	q_6	Σ
$\Sigma \frac{2\alpha(1+\alpha)}{(1+\alpha+\alpha^2 q_n^2)}$	0.6540	0.1530	0.0609	0.0320	0.0196	0.0132	0.9328
Σq_n^2	4.1160	24.1395	63.6597	122.8905	201.8531	300.5508	717.2096

$$\ln \frac{m_t - m_\infty}{m_0 - m_\infty} = \ln 0.0672 + \left(-717.2096 \frac{D}{L^2} \right) t \quad \text{Ec. A2}$$

$$D = \frac{\ln \frac{m_t}{m_0} - \ln 0.0672 (L^2)}{-717.2096} \quad \text{Ec. A3}$$