



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

ESTABILIDAD DE β -CAROTENO
NANOENCAPSULADO COMO INGREDIENTE
FUNCIONAL PARA APLICACIÓN EN JUGOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERA EN ALIMENTOS

PRESENTA:

MARÍA DEL CARMEN BADILLO ARENAS

ASESORES:

I.A. RICARDO MOISÉS GONZÁLEZ REZA

DRA. MARÍA DE LA LUZ ZAMBRANO ZARAGOZA

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEXICO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



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**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Estabilidad de β -caroteno nanoencapsulado como ingrediente funcional para aplicación en jugos

Que presenta la pasante: María del Carmen Badillo Arenas
Con número de cuenta: 408021700 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 Izcalli, Méx. a 26 de febrero de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	IQ. Guadalupe Franco Rodríguez	
VOCAL	IA. Francisco Javier López Martínez	
SECRETARIO	IA. Ricardo Moisés González Reza	
1er. SUPLENTE	IA. María Guadalupe López Franco	
2do. SUPLENTE	IA. Zaira Berenice Guadarrama Álvarez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HHA/iac

El presente trabajo fue financiado por el proyecto PAPIIT IT200814: Desarrollo de sistemas nanopartículados alimenticios para incrementar la vida útil y nutracéutica de frutas frescas cortadas y bebidas de frutas, de la Dirección de Asuntos del Personal académico de la UNAM.

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada quiero agradecer a Dios y la virgencita por brindarme una familia que siempre me apoyo en las buenas y las malas, porque gracias a ellos y su apoyo logre concluir con esta etapa de mi vida. Familia los amo (mamá, papá, y Jessy)

Gracias a mi mamá en especial porque se todo el esfuerzo que tuvo que hacer para que esto pudiera hacerse realidad, el cual agradeceré toda mi vida ya que es una mujer que siempre confió en mí y me brindó su apoyo pese a todo. De igual manera agradezco todo lo que me has enseñado durante todo este tiempo, porque todo eso que algún día me lo dijo en manera de consejo o regaño me sirvió para ser la persona que soy ahora, ya que eres ejemplo de una mujer fuerte, guerrera y la mejor mamá del mundo.

Agradezco el apoyo incondicional de mi hermana que siempre confió en mí y siempre estuvo ahí para hacerme reír en todo momento, quiero que sepa que yo estoy muy orgullosa de ella por todo lo que ha logrado, ya que forma parte de la máxima casa de estudios y espero pronto verla toda una Ingeniera Química. Te adoro Jessy.

Quiero agradecer la paciencia infinita que tuvieron mi mamá, hermana y papá, por todas esas veces que no me vieron en mi mejor etapa cuando las cosas a veces no salían como debían de salir en la escuela, por todas las noches que no los dejaba dormir con el teclado de la computadora, la luz prendida a altas horas de la madrugada, etc.

A mi abuelita y mi tía Margarita que siempre estuvieron al pendiente y confiaron en mí desde que tengo memoria, les agradezco su apoyo, las quiero mucho.

A la máxima casa de estudios UNAM por abrirme la puerta y poder concluir la carrera dentro de esta institución, en especial a la FES-CUAUTITLÁN que se convirtió en mi segundo hogar durante muchos años, me ofreció la mejor etapa de mi vida, ya que dentro de la FESC encontré muy buenos profesores y personas que ayudaron en mi formación académica y personal; quiero expresar que estoy muy orgullosa de pertenecer y ser egresada de esta facultad.

De igual manera dentro de la FESC encontré personas a las cuales a la fecha adoro y agradezco su amistad y todo el apoyo brindado, sin ustedes nada hubiera sido igual. Todas esas horas de risas, de pláticas, fiestas, comidas, reportes, LEM e inclusive las peleas que me aventaba a veces con algunos de ellos (Mariana jaja), bueno pues esas personas que formaron y forman parte importante son mis amigos Mariana, Wicho, Pambo, Ebrika Lu, Ricardo y Memo, espero de todo corazón que esta relación de amistad nunca termine los amo mucho mucho.

Julio muchas gracias por todo el apoyo que me has brindado incondicional, creo que eres de las pocas personas que sabe todo lo que le he batallado para que esto sea un hecho, pero siempre has estado ahí para consolarme, echarme porras y nunca dejas de confiar en mí (aunque no lo creas siempre lo tengo presente), te amo mucho y que sea la primera de muchas metas cumplidas que compartiremos. Gracias por la paciencia que has tenido y vaya que fue mucha, de igual manera quiero agradecer por el apoyo de tus papás que con sus consejos o palabras que a veces dicen me han ayudado de mucho. Gracias por nunca soltarme la mano!!

A mis asesores el I.A Ricardo Moisés González Reza, que me dio su apoyo cuando más lo necesitaba, agradezco la confianza, paciencia y todo lo enseñado durante esta etapa en la cual aprendí mucho no solo profesionalmente si no también personalmente, eres una súper persona: inteligente, fuerte y eres un gran ejemplo, llegaras muy lejos te quiero mucho. A la Dra. María de la Luz Zambrano Zaragoza de igual manera gracias por el tiempo, esfuerzo y dedicación en este trabajo, me llevo un buen recuerdo de usted ya que es una muy buena investigadora, profesora, mamá, profesional, persona y es todo un ejemplo de mujer exitosa a la cual admiro y respeto. Gracias por la confianza que depositaron en mí y por los momentos compartidos durante este tiempo.

ÍNDICE

Resumen	1
Capítulo I Antecedentes.....	4
1.1 Nanotecnología	4
1.1.1 Definición.....	4
1.1.2 Aplicaciones	5
1.1.3 Nanopartículas.....	5
1.1.4 Nanocápsulas.....	7
1.1.5 Formación de Nanocápsulas.....	7
1.1.6 Emulsificación-Difusión.	9
1.1.7 Biopolímeros en la Preparación De Nanocapsulas.	11
1.2 Estabilidad de Nanocápsulas.....	13
1.2.1 Fuerzas de van der Waals.....	15
1.2.2 Interacción Electrostática de Doble Capa.	15
1.2.3 Parámetros de Estabilidad Coloidal.	18
1.3 Aplicación de la Nanotecnología en la Ciencia de los Alimentos.....	20
1.3.1 Nanotecnología en la Ciencia de los Alimentos.	21
1.3.2 Aplicación en Jugos.	23
1.3.3 Normatividad y Legislación.	26
Capítulo II Metodología Experimental.....	27
2.1 Objetivo General.....	27
2.1.1 Objetivo Particular 1	27
2.1.2 Objetivo Particular 2.	27
2.1.3 Objetivo Particular 3.	28
2.1.4 Objetivo Particular 4.	28
2.1.5 Objetivo Particular 5.	28
2.2 Materiales y Métodos.....	29
2.2.1 Actividades Preliminares.....	29
2.2.3 Estabilidad de Nanocápsulas de β -Caroteno.	30

2.2.4 Aplicación en Jugos.	33
2.3 Análisis Estadístico.....	33
Capítulo III Resultados.....	35
3.1 Actividades Preliminares.	35
3.1.1 Caracterización de Jugos Comerciales.....	35
3.1.1 Curva Patrón de nanocápsulas de β -caroteno.....	36
3.2 Caracterización de Nanocápsulas Elaboradas por el Método Emulsificación – Difusión.	37
3.2.1 Análisis Morfológico.....	37
3.2.2 Tamaño de Partícula e índice de polidispersión (IPD).....	37
3.2.3 Potencial Zeta (ζ).....	38
3.3 Estabilidad de las Soluciones Modelo.	39
3.3.1 Tamaño de Partícula e Índice de Polidispersión en las Soluciones Modelo.	40
3.3.2 Potencia Zeta (ζ).....	45
3.3.3 Turbidez.	50
3.3.3 Color.....	53
3.3.5 β -caroteno encapsulado residual.	63
3.3.6 Contraste del comportamiento de β -caroteno nanoencapsulado en jugo natural.	66
Conclusiones y Recomendaciones	77
Bibliografía.....	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 .Esquema del Método de Emulsificación- Difusión (Mora-Huertas, 2010)	10
Figura 2. Factores que afectan en la selección de un polímero (Dash y col., 2012).	12
Figura 3. Polimerización de apertura de anillo de ϵ -caprolactona a policaprolactona (Elzein y col., 2004).	13
Figura 4. Energía de Interacción de partículas coloidales en función de la distancia de separación (Castellan, 1987).	15
Figura 5. Ilustración de la teoría clásica de DLVO (Wu y col.2011).	16
Figura 6. Doble Capa entre dos Partículas (Castellan, 1987).	17
Figura 7. Aplicaciones de Nanotecnología en Alimentos (Duncan, 2011).	22
Figura 8. Estructura química de β -caroteno (Ribeiro, 2008).	25
Figura 9. Curva Patrón de nanocápsulas de β -caroteno.	36
Figura 10. Morfología de Nanocápsulas de β -caroteno.	37
Figura 11. a) Grafica de caja de las soluciones almacenadas a temperatura ambiente (Semana 2). b) Grafica de caja de las soluciones almacenadas a temperatura de refrigeración (semana 4)	41
Figura 12. a) Pareto de las soluciones almacenadas a temperatura ambiente (Semana 2). b) Pareto de las soluciones almacenadas a temperatura de refrigeración (semana 4).	42
Figura 13. a) IPD de las soluciones almacenadas a temperatura ambiente. b) IPD de las soluciones almacenadas a temperatura de refrigeración.	43
Figura 14. Distribución de tamaño de partícula de las soluciones almacenadas a temperatura ambiente y de refrigeración en la semana cuatro.	45
Figura 15. a) Pareto de ζ para las soluciones almacenadas a temperatura ambiente. b) Gráfica de caja de ζ para las soluciones almacenadas a temperatura ambiente.	46
Figura 16. a) Pareto de ζ para las soluciones almacenadas a temperatura de refrigeración. b) Gráfica de caja de ζ para las soluciones almacenadas a temperatura de refrigeración.	48
Figura 17. Distribución de potencial zeta (ζ) en la semana cuatro de almacenamiento.	49
Figura 18. a) Pareto de turbidez para las para las soluciones a) segunda semana de almacenamiento temperatura ambiente. b) Cuarta semana temperatura de refrigeración.	51

Figura 19. Turbidez de soluciones almacenadas a a) temperatura ambiente y b) refrigeración.....	52
Figura 20. Luminosidad L^* de soluciones almacenadas a temperatura ambiente y refrigeración.....	54
Figura 21. Coordenadas a^* de soluciones almacenadas a temperatura ambiente y refrigeración.....	54
Figura 22. Coordenadas b^* de soluciones almacenadas a temperatura ambiente y refrigeración.....	55
Figura 23. Espacio de color CIELAB*de soluciones iniciales y finales	57
Figura 24. ΔE para las soluciones almacenadas a temperatura ambiente y refrigeración. ...	58
Figura 25. a) Pareto de ΔE para las soluciones almacenadas a temperatura ambiente segunda semana. b) Pareto de ΔE para las soluciones almacenadas en temperatura de refrigeración primer semana.	58
Figura 26 . $^{\circ}Hue$ para las soluciones almacenadas a temperatura ambiente y de refrigeración.....	61
Figura 27. Croma para las soluciones almacenadas a temperatura ambiente y de refrigeración.....	62
Figura 28. a) Pareto de las soluciones en la primer semana almacenadas a temperatura ambiente) Pareto de las soluciones en la primer semana almacenadas en temperatura de refrigeración.....	64
Figura 29. Eficiencia para las soluciones almacenadas a temperatura ambiente y de refrigeración.....	66
Figura 30. Tamaño de partícula en jugos de naranja almacenados a temperatura ambiente y refrigeración.....	68
Figura 31. Índice de polidispersión en jugos de naranja almacenados a temperatura ambiente y de refrigeración.	69
Figura 32. Potencial zeta en jugos de naranja almacenadas a temperatura ambiente y de refrigeración.....	71
Figura 33. Turbidez en jugos de naranja almacenadas a temperatura ambiente y de refrigeración.....	73
Figura 34. Cambio total de color en jugos de naranja almacenados a temperatura ambiente y de refrigeración.....	74

Figura 35. Croma y °Hue en jugos de naranja almacenados a temperatura ambiente y de refrigeración.....	75
--	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Formas y características de materiales nanoestructurados (Maynard y col., (2007); Letchford y Burt (2007)).	6
Tabla 2. Inestabilidad físico-química de suspensiones coloidales (Heurtault y col. 2013)..	19
Tabla 3. Tipos de Antioxidantes.....	24
Tabla 4. Formas de adición de β -caroteno en los Jugos Naturales.....	33
Tabla 5. Diseño de Experimentos Factorial Completo.....	34
Tabla 6. Parámetros físicos determinados en jugos comerciales.	35

RESUMEN

El presente estudio sobre de la estabilidad de β -caroteno nanoencapsulado elaborado mediante la metodología de Emulsificación – Difusión (MED) propuesta por Quintanar-Guerrero y col., 1998 e implementado por Zambrano-Zaragoza y col., 2013 para su aplicación en alimentos. Las nanocápsulas de β -caroteno fueron adicionadas a soluciones con diferentes pH's y °Brix para establecer la influencia de estos factores en la estabilidad y potencial de aplicación de la tecnología en jugos y bebidas de frutas. Se realizó el seguimiento de las soluciones en almacenamiento a temperatura ambiente y temperatura de refrigeración (4°C) durante un periodo de cuatro semanas, evaluando las propiedades físicas y fisicoquímicas de las soluciones: potencial zeta (ζ), tamaño de partícula, índice de polidispersión, turbidez, color y liberación del ingrediente activo, pH y °Brix para ver la variación de estos parámetros. Durante el periodo de almacenamiento se observaron cambios significativos sobre la estabilidad, siendo en las muestras almacenadas a temperatura ambiente y con pH de 6, donde el cambio fue mayor que las muestras almacenadas a temperatura de refrigeración, teniendo efecto en variables como el potencial zeta (ζ), tamaño de partícula e índice de polidispersión con la cual indico la estabilidad del sistema con una relación directamente proporcional a la turbidez. Se observó un cambio significativo en el β -caroteno ya que de acuerdo a los datos obtenidos en color y liberación de β -caroteno indica que la eficiencia de encapsulación en las condiciones de almacenamiento ambientales y pH de 6 no tiene un efecto benéfico sobre el polímero encapsulante debido a la degradación con valores cercanos a 30% durante la última semana de almacenamiento, mientras a pH de 3 y temperatura de 4°C se tienen eficiencias mayores a 80% durante las primeras tres semanas mientras que la última semana fue 60%.

Durante la aplicación en jugos naturales se contrasto el comportamiento con respecto a los otros vehículos de β -caroteno, ya que las nanocápsulas no tuvieron un efecto significante en la estabilidad y color de los jugos, mientras que la nanoemulsión y β -caroteno hidrosoluble si demostraron diferencias significativas en el tamaño de partícula y en color. Concluyéndose que las nanocápsulas pueden ser empleadas como sistemas de liberación de componentes activos liposolubles en condiciones normales para jugos comerciales.

INTRODUCCIÓN

Dado que el interés de los consumidores en el papel de mejora de la salud de determinados alimentos y componentes de alimentos fisiológicamente activos se ha incrementado. La industria de alimentos y bebidas ha incrementado la investigación en la encapsulación de ingredientes funcionales, tales como sabores, colores, antimicrobianos, micronutrientes y nutraceuticos (Hasler, 1998; McClements, 2010; McClements y col., 2007; Sagalowicz y Leser, 2010, Sanguansri y Augustin, 2006 y Velikov y Pelan, 2008). Los carotenoides y especialmente el β -caroteno (como carotenoides nutricionalmente más activos) se utilizan como ingrediente funcional en las investigaciones de la ciencia de los alimentos; debido a sus propiedades relacionadas con la salud (por ejemplo, la mejora de la respuesta inmune, la inhibición de mutagenesis, el bloqueo de las reacciones mediadas por radicales libres) y su carácter antioxidante así como las características colorantes son foco de interés para investigadores (Bendich & Olson, 1989; Britton 1995a, 1995b). Sin embargo debido a su carácter extremadamente hidrófobo, β -caroteno es insoluble en agua y muestra una pobre biodisponibilidad en forma cristalina el adicionarlo a un alimento se ha vuelto un reto (Ribeiro & Cruz 2004), por tal motivo el proceso de nanoencapsulación se vuelve una alternativa viable para elaborar alimentos acuosos con este ingrediente funcional lipofílico. Hoy en día, la nanotecnología se ha convertido rápidamente en uno de los campos de investigación más prometedores y atractivos en la industria alimentaria ya que ha abierto nuevas posibilidades en la conservación de alimentos esperando que tenga un impacto en la producción, procesamiento, almacenamiento y seguridad de los mismos. El uso de nanopartículas puede mejorar la funcionalidad de los alimentos y esto podría ser la introducción a un nuevo tipo de mercado-consumidor (Som y col., 2010; Zambrano-Zaragoza y col., 2013).

Una de las aplicaciones más estudiadas en sistemas coloidales de talla submicrónica son las nanopartículas que se definen como partículas sólidas coloidales que incluyen tanto nanoesferas y nanocápsulas. Las nanocápsulas consisten en un núcleo líquido lipídico rodeado por una membrana polimérica; su estructura interna es de la tipo "core-shell". El

principio activo se solubiliza en el núcleo de aceite. Se pueden preparar por métodos de polimerización y síntesis con polímeros preformados (Moinard-Chécot y col., 2008; Quintanar-Guerrero y col., 2012; Fattal y col., 2002). En general hay seis métodos clásicos para la preparación de nanocápsulas: nanoprecipitación, emulsificación-difusión, doble emulsión, emulsión-coacervación, recubrimiento con polímero y capa por capa (Mora-Huertas, 2010). De acuerdo con Quintanar-Guerrero y col., 1998 en la preparación de nanocápsulas por el método de Emulsificación-Difusión (MED) permite la nanoencapsulación de sustancias activas lipófila e hidrófila. Uno de los temas importantes en este proceso de nanoencapsulación de sistemas alimenticios es la estabilidad de la dispersión. Sobre este aspecto recientes investigaciones han demostrado que la adición de electrolitos o el cambio de pH afecta a la estabilidad de las dispersiones coloidales (Ishikawa y col., 2005).

Es muy común que para describir las interacciones interfaciales partícula – sustrato en medios acuosos a través de la teoría de la estabilidad coloidal Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) que representa las interacciones atractivas de van der Waals e interacciones de doble capa electrostática. Dependiendo del equilibrio de estas dos interacciones, la interacción neta puede ser repulsiva o atractiva (Hoek y col., 2006; Ishikawa y col., (2005).

El jugo de naranja adicionado con nanocápsulas de β -caroteno es modelado como una dispersión coloidal en una solución de azúcares, pectinas, ácidos orgánicos y sales, en la cual puede existir diferentes tipos de interacciones: nanocápsulas – nanocápsulas, nanocápsulas – agua y nanocápsulas – azúcar y estas están generalmente estabilizadas por medio de la repulsión electrostática entre nanocápsulas cargadas de manera similar como se predijo en la teoría (DLVO). Las interacciones electrostáticas repulsivas entre las nanocápsulas cargadas igualmente no les permiten llegar tan cerca como gotas sin carga y los contraiones que rodean una nanocápsula se mueve menos lenta que la propia nanocápsula. El potencial ζ -se puede utilizar como una medida de las fuerzas de repulsión electrostáticas, que pueden dar una indicación de la estabilidad potencial del sistema coloidal (Mirhosseini y col., 2008; Benitez y col., 2009;)

CAPÍTULO I ANTECEDENTES

1.1 NANOTECNOLOGÍA

La nanociencia y la tecnología han crecido rápidamente en los últimos años y ya están teniendo un gran impacto en el desarrollo de nuevos materiales y productos. La repercusiones tecnológicas y comerciales en todo el mundo, será un importante motor económico en el futuro previsible. La nanotecnología ha sido considerada como una tecnología emergente, la introducción de nuevas dimensiones a la ciencia y la tecnología con la posibilidad de manipular átomos y moléculas a nivel nanométrico ("nano" significa una mil millonésima parte de un metro). Esta nueva tecnología tiene múltiples aplicaciones y por tanto afecta a diversos ámbitos tecnológicos, incluidos los materiales avanzados, la biotecnología, farmacia, electrónica, instrumentos científicos y procesos industriales de fabricación incluidos los alimenticios. En la etapa inicial de desarrollo de la nanotecnología y la difusión, muchos beneficios esperados no han sido plenamente logrados (Miyazaki y col., 2007).

1.1.1 DEFINICIÓN

La nanotecnología es la ciencia, la ingeniería y la tecnología realizada en nanoescala, consiste en la caracterización, la fabricación y/o manipulación de estructuras, dispositivos o materiales que tienen al menos una dimensión (o contiene componentes con al menos una dimensión) nanométrica (Duncan, 2011). Se pueden utilizar en diversas ciencias, tales como química, biología, física, ciencia de los materiales e ingeniería. Las ideas y los conceptos detrás de la nanociencia y la nanotecnología comenzó con un discurso titulado "Hay mucho sitio al fondo" por el físico Richard Feynman en una reunión con la sociedad Americana en el Instituto de Tecnología de California el 29 de Diciembre de 1959, el término de nanotecnología fue utilizado mucho tiempo después. En el discurso, Feynman describió un proceso en que los científicos serían capaces de manipular y controlar los átomos y moléculas individualmente. Más de una década después, el profesor Norio

Taniguchi acuñó el término de nanotecnología, pero no fue hasta 1981, con el desarrollo del microscopio de barrido efecto túnel, que podía observar átomos individuales y fue así que empezó la era de la nanotecnología moderna (Motoyama y col.,2011).

1.1.2 APLICACIONES











De acuerdo con National Nanotechnology Initiative (2013) la mayoría de los beneficios de la nanotecnología dependen del hecho de que es posible adaptar las estructuras esenciales de los materiales a nanoescala para conseguir propiedades específicas, así en gran medida se extiende el conjunto de herramientas muy usadas de la ciencia de materiales. Utilizando la nanotecnología pueden tener diferentes propiedades como lo es mayor resistencia, más ligero, duradero, reactividad, conductores eléctricos, entre muchas otras características, ejemplo de lo siguientes son:

- ✓ Materiales y proceso (cerámica, alimentos, aditivos químicos, cosméticos, productos automotrices, etc.).
- ✓ Aplicaciones en tecnología informática y energía.
- ✓ Aplicaciones en energía sustentable.
- ✓ Aplicaciones en apoyo ambiental.
- ✓ Aplicaciones en medicina, salud y nanobiosistemas.
- ✓ Aplicaciones en el transporte del futuro.

1.1.3 NANOPARTÍCULAS

Los nanomateriales pueden incluir cualquier tamaño, forma, estructura y propiedades que dependen del proceso de formación, condición de elaboración, condiciones ambientales, propiedades de los componentes y cualquier pre-tratamiento realizado para modificar las propiedades de los componentes, ejemplo de ellos son: nanopartículas, nanotubos, nanopartículas lipídicas sólidas, nanoliposoma, nanoemulsión, nanoestructura emulsión múltiple, nanolaminados, nanocompuestos, nanoesferas, nanocápsulas y nanofibras (Som y col., 2010; Qinggrong-Huang, 2012).

Tabla 1. Formas y características de materiales nanoestructurados (Maynard y col., (2007); Letchford y Burt (2007)).

Nanopartículas	Descripción
<i>Nanopartículas Sólidas:</i>	
	Partículas esféricas o compactas de composición homogénea.
	Partículas tubulares de composición homogénea.
	Partículas complejas no esféricas de composición homogénea.
	Partículas de composición heterogénea con variación en la composición núcleo- superficie
	Partículas de composición heterogénea con variación en la distribución de sus componentes.
	Agregados/ aglomerados heterogéneos que consta en una clase de partículas individuales.
<i>Sistemas de Liberación Nano: Base Lipídica</i>	
	Nanoliposomas /archaeosomes, vesículas lipídicas de doble capa.
	Micela, vesículas lipídicas de una sola capa.
	Nanococleatos, hola lipídica enrollada en forma de espiral.
<i>Sistemas de Liberación Nano: Base Polimérica.</i>	
	Micelas, copolímeros agregados.
	Nanosferas, copolímeros agregados generando un núcleo central sólido.
	Nanocápsulas/ polymersoma, membrana polimérica que rodea una cavidad central líquida aceitosa o acuosa.

Las nanopartículas se definen como partículas sólidas coloidales que incluyen tanto nanoesferas y nanocápsulas. Las nanoesferas tienen una estructura de tipo matriz donde el ingrediente activo puede ser absorbido en la superficie de la esfera o encapsulado dentro de la partícula, mientras que las nanocápsulas consisten en un sistema vesicular coloidal-nanométrico en la cual se limita el ingrediente activo a una cavidad que consiste en un núcleo líquido rodeado por un biopolímero, membrana o revestimiento monocapa; su estructura interna es de la tipo "core-shell" (Couvreur y col., 1995; Mora-Huertas y col., 2010). En este caso, el principio activo se solubiliza en el núcleo interior líquido aceitoso, pero también puede ser absorbido a la superficie de la cápsula (Allémann y col., 1993; Moinard-Chécot y col., 2008). Se pueden preparar por métodos de polimerización y síntesis con polímeros preformados (Fattal, E. y Vauthier, C., 2002.). Una de las características fundamentales es su tamaño, que se torna generalmente alrededor de 5-10 nm con un límite superior de tamaño de aproximadamente 1000 nm, aunque generalmente se obtiene en un rango de 200-300 nm (Quintanar- Guerrero y col., 1998) y reportados para aditivos alimentarios por Zambrano-Zaragoza y col., (2011).

1.1.4 NANOCÁPSULAS

En primer lugar las nanocápsulas pueden ser comparadas con los sistemas vesiculares en la cual esta confinada el ingrediente activo, que puede estar en forma sólida o líquida y/o como dispersión molecular, y de la misma manera puede ser lipófila o hidrófoba (de acuerdo con el método de preparación y los materiales utilizados) en la cavidad (Quintanar-Guerrero y col., 1998). Además, teniendo en cuenta las limitaciones operativas de los métodos de preparación, las nanocápsulas también pueden llevar sustancias activas en la superficie o embebido en la membrana polimérica (Tabla 1), (Khoee y Yaghoobian, 2008).

1.1.5 FORMACIÓN DE NANOCÁPSULAS.

En general hay seis métodos clásicos para la preparación de nanocápsulas: nanoprecipitación, emulsificación-difusión, doble emulsión, emulsión-coacervación, recubrimiento con polímero y capa por capa. Sin embargo otros métodos se han utilizado,

como emulsión-evaporación y metodologías para la preparación de liposomas de polímero (Mora- Huertas y col., 2010). A continuación se describen:

a) Nanoprecipitación: El método de nanoprecipitación también se denomina desplazamiento del disolvente o deposición interfacial. De acuerdo con Fessi y col., (1988), la síntesis de nanocápsulas necesita fases tanto de disolvente y no disolvente. La fase de disolvente o una mezcla de disolventes (es decir, etanol, acetona, hexano, cloruro de metileno o dioxano), de un polímero (sintético, semi-sintético o de origen natural), la sustancia activa, el aceite y un tensoactivo lipófilico. Esta solución es invertida o inyectada en una solución acuosa que puede o no contener un estabilizante y se agita moderadamente con un agitador magnético. El disolvente se difunde inmediatamente en el agua permitiendo la agregación del polímero en forma de nanocápsulas.

b) Doble Emulsificación: Doble emulsificación es un sistema heterodisperso complejo llamado "emulsiones de emulsiones", que se pueden clasificar en dos tipos principales: la emulsión agua-aceite-agua (w / o / w) y aceite-agua-aceite (o / w / o) (Garti, 1997; Grigoriev y Miller, 2009). El principio de la formación de doble emulsión, específicamente del tipo (w / o / w), se asocia con los principios tanto de nanoprecipitación y emulsificación-difusión. En la emulsión primaria (w / o), el aceite se cambia por una fase orgánica que contiene un disolvente que es total o parcialmente miscible en agua, el polímero y el tensoactivo forman una película. A continuación, el agua que contiene un agente estabilizante se añade al sistema para obtener la emulsión orgánica con agua. Sin embargo, en este paso, el endurecimiento de las partículas se obtiene a través de la difusión de disolvente y precipitación del polímero (Bilati y col., 2005; Khoee y Yaghoobian, 2008).

c) Emulsificación-Coacervación: El procedimiento implica la emulsificación aceite-agua (o / w) de una fase orgánica (aceite, sustancia activa y disolvente si es necesario con sustancia activa) con una fase acuosa (agua, polímero, agente estabilizador) por agitación mecánica o ultrasonido, un proceso simple de coacervación se lleva a cabo mediante el uso de cualquiera de electrolitos como se ha hecho por Lertsutthiwong y col., 2008.

d) Recubrimiento con Polímero: Esto puede ser logrado mediante la adsorción del polímero sobre las nanocápsulas preformadas sin recubrimiento cuando este último se incuban en dispersión del polímero bajo agitación y las condiciones predeterminadas de tiempo (Calvo y col., 1997).

e) Capa por Capa: El proceso de elaboración capa por capa desarrollado por Sukhorukov y col., (1998) para la preparación de partículas coloidales permite obtener partículas vesiculares, llamadas cápsulas de poli electrolitos, bien definidas sus propiedades químicas y estructurales. Para resumir, el mecanismo de formación de nanocápsulas se basa en la atracción electrostática irreversible que conduce a la adsorción de poli electrolitos en hipersaturadas concentraciones de poli electrolitos a granel.

1.1.6 EMULSIFICACIÓN-DIFUSIÓN.

De acuerdo a Quintanar-Guerrero y col., (1998) la preparación de nanocápsulas por el método de emulsificación-difusión permite la nanoencapsulación de sustancias activas tanto lipofílicas e hidrófilas. El procedimiento experimental realizado para conseguir esto requiere de tres fases: orgánica, acuosa y dilución, es decir, el método consiste en dos fases empleando un disolvente parcialmente soluble en agua en el que se disuelve el agente activo generalmente oleoso y en la fase acuosa un surfactante. Específicamente, la fase orgánica se hace primero y el aceite se disuelve en el disolvente orgánico (previamente saturado con agua) y la fase acuosa (previamente saturado con disolvente orgánico que contiene el emulsionante (estabilizante) (Moinard-Chécot y col., 2008). El tamaño de las nanocápsulas preparadas por este método es de aproximadamente 150 – 200 nm (Quintanar-Guerrero y col., 2005).

Cuando el objetivo es la nanoencapsulación de una sustancia activa lipofílica, la fase orgánica contiene el polímero, la sustancia activa, el aceite y un disolvente orgánico parcialmente miscible en agua que debe estar saturado en agua. Este medio orgánico actúa como disolvente para los diferentes componentes de la fase orgánica. Si se requiere, la fase orgánica también puede incluir una sustancia activa disolvente o aceite disolvente. La fase

acuosa comprende la dispersión acuosa de un agente estabilizante que se prepara usando disolvente saturado con agua para asegurar el equilibrio termodinámico inicial de ambos líquidos mientras que la fase de dilución es normalmente agua (Pinto-Reis y col., 2006; Mora-Huertas y col., 2010).

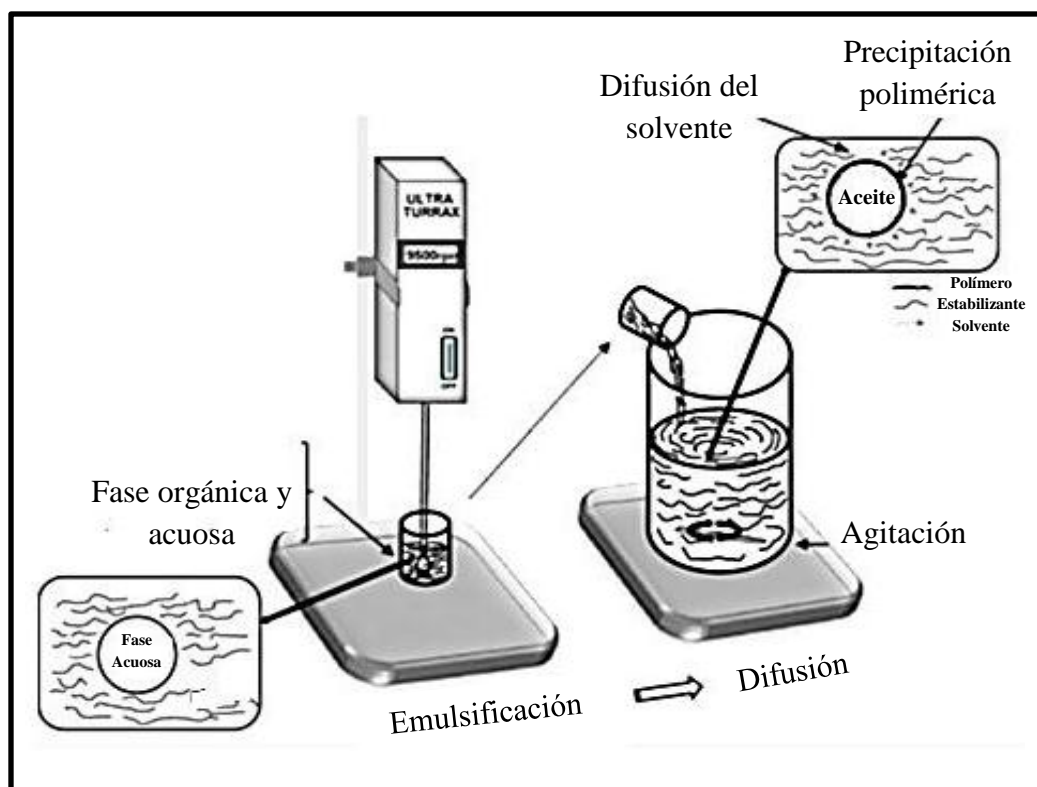


Figura 1 .Esquema del Método de Emulsificación- Difusión (Mora-Huertas, 2010)

Para la preparación de nanocápsulas utilizando el método de emulsificación-difusión, la fase orgánica se emulsiona con agitación vigorosa en la fase acuosa que contiene el estabilizador (Pinto-Reis y col., 2006; Mora-Huertas y col., 2010). La posterior adición de agua para el sistema que provoca la difusión del disolvente en la fase externa, resultando la formación de nanocápsulas. Esta puede ser eliminada por destilación o filtración de flujo transversal en función del punto de ebullición del disolvente. Se ha mostrado que el tamaño de nanocápsulas está relacionado con la velocidad de cizallamiento utilizada en el proceso de emulsificación, la composición química de la fase orgánica, la concentración de

polímero, la relación de polímero-aceite, y el tamaño de la emulsión primaria (Mora-Huertas y col., 2010)

Esta técnica presenta varias ventajas, tales como la eficiencia de encapsulación altas (generalmente mayores a 70%), sin necesidad de homogeneización, la reproducibilidad alta de lote a lote, facilidad de ampliación, la sencillez y la distribución de tamaño estrecha. Las desventajas son los altos volúmenes de agua a ser eliminados de la suspensión y la filtración de la sustancia activa soluble en agua en la fase externa acuosa saturada durante la emulsificación. Al igual que con algunas de las otras técnicas, este es eficiente en la encapsulación de ingredientes activos lipófilos (Quintanar- Guerrero y col., 1998).

1.1.7 BIOPOLÍMEROS EN LA PREPARACIÓN DE NANOCAPSULAS.

Anteriormente se mencionó que uno de los componentes principales en la formación de las nanocápsulas es el biopolímero que rodea al ingrediente activo, ya que de este depende la eficiencia en la encapsulación, así como al medio en el que se encuentre al ser aplicado. Por tal motivo es de suma importancia conocer las características de estos.

Los polímeros biodegradables tales como poli láctico (PLA), poli láctico glicólico (PGA) y poli- ϵ -caprolactona (PCL) muestran una buena biodegradabilidad y biocompatibilidad. Los materiales que se utilizan como material de la matriz de nanopartículas y micropartículas se pueden descomponer en especies no tóxicas y de bajo peso molecular con la liberación controlada del ingrediente activo que después se metaboliza o se absorbe por el organismo. Por tanto se han centrado en la aplicación de nanopartículas y micropartículas biodegradables, ejemplo de ellos es la poli- ϵ -caprolactona que es un polímero biodegradable ampliamente utilizado debido a su buena biocompatibilidad y la permeabilidad del ingrediente activo (Pitt y col., 1980; Jaffe y col., 1981).

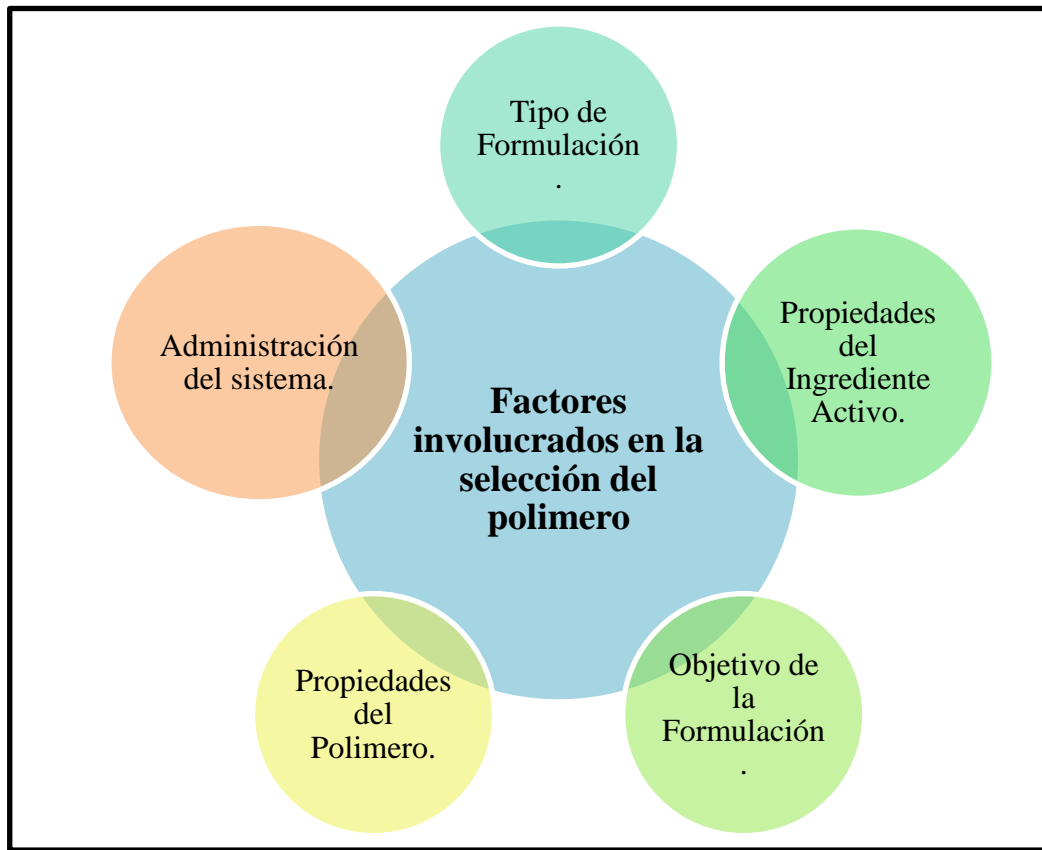


Figura 2. Factores que afectan en la selección de un polímero (Dash y col., 2012).

1.1.7.1 POLI- ϵ -CAPROLACTONA

Es uno de los poliésteres biodegradables hidrófobo (aunque el agua puede penetrar en las cadenas del polímero), semicristalino aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) que han atraído especial atención para ser utilizado en la liberación controlada de ingredientes activos debido a que no es tóxico, bajo costo en comparación con otros poliésteres biodegradables, lento para degradarse en medios acuosos, e inofensivo en el medio ambiente (Sahoo y col. 2010; Grillo y col., 2012).

Es obtenido a partir de la polimerización de la caprolactona. Su nombre según IUPAC es 1,7-polioxepan-2-ona. Otros nombres podrían ser homopolímero de 2-oxepanona o polímero de 6-caprolactona. Su fórmula molecular es $(C_6H_{10}O_2)_n$.

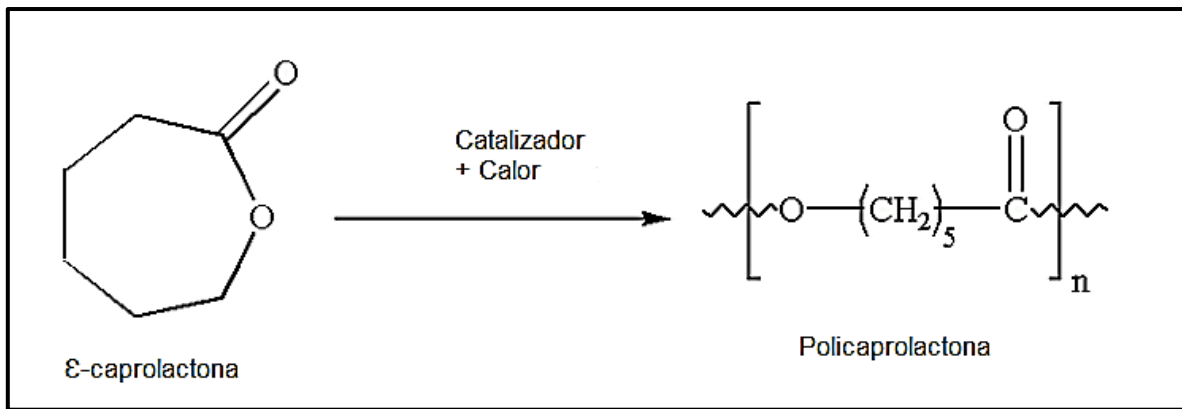


Figura 3. Polimerización de apertura de anillo de ϵ -caprolactona a policaprolactona (Elzein y col., 2004).

La degradación de poli- ϵ -caprolactona no da lugar a un entorno ácido y sus productos de degradación se pueden solubilizar por los fluidos (Elzein y col., 2004). Por lo tanto la poli- ϵ -caprolactona tiene grandes perspectivas de aplicación en la elaboración de nanocápsulas.

1.2 ESTABILIDAD DE NANOCÁPSULAS.

En estado coloidal las sustancias tienen propiedades que no existen en la misma sustancia cuando no se encuentra en ese estado. A diferencia de las disoluciones verdaderas las soluciones coloidales son sistemas heterogéneos en los que existe una separación nítida entre la superficie de la partícula coloidal y el medio dispersante. Las propiedades características de los coloides son las que existen en la interfase. Puesto que las propiedades de agregación y dispersión de las nanopartículas coloidales dependen de las fuerzas que rigen su estabilidad, el cómo controlarla son cuestiones importantes (Sanz-Pedrero, 1996; Zhou, 2009).

Los sistemas coloidales se clasifican en dos grupos: los termodinámicamente inestables: liófilos/ hidrófilos (dispersiones coloidales) y los termodinámicamente estables: liófilos / hidrófilos (micelas). Las partículas coloidales distribuidas en un medio de dispersión no constituyen en muchos casos un sistema estable desde el punto de vista energético (termodinámico), (Sanz- Pedrero, 1996).

La estabilidad de la suspensión coloidal se debe a la existencia de carga eléctrica del mismo signo en la superficie de las partículas coloidales; dicha carga produce repulsión entre ellas, lo que evita su asociación y la precipitación de la suspensión coloidal (Gutiérrez-Ríos, 1985)

Hay dos fuerzas principales que actúan entre pares de partículas coloidales en una solución electrolítica: interacción electrostática de doble capa y las interacciones de van der Waals. Dependiendo del equilibrio de estas dos interacciones, la interacción neta puede ser repulsiva o atractiva. En principio, la estabilidad sistemas coloidales se puede explicar por el equilibrio de dos fuerzas (Lyklema, 1995). Esta idea fue propuesta por Darjaguin y Laundau y Verway y Overbeek; y es por lo tanto se refiere como la teoría DLVO. La teoría DLVO tiene como concepto principal que la energía total de interacción de dos superficies o partículas en un sistema coloidal, está dada por la suma de las contribuciones de atracción y repulsión (Ishikawa y col., 2005; Liang y col., 2007). Esto se puede escribir como:

$$V_T = V_A + V_R \quad \text{Ec (1)}$$

Donde V_T es la interacción total de energía y se expresa en términos de repulsión por la interacción de doble capa V_R , y atractiva por las interacciones de van der Waals.

V_A se determina por la constante de Hamaker, tamaño de partícula y la distancia entre partículas, mientras que V_R depende del tamaño de partícula, la distancia entre las partículas, el potencial zeta, la concentración de iones y la constante dieléctrica del medio (Wu y col., 2011).

La Figura 4 muestra la energía de interacción de partículas donde la curva (a) muestra la energía potencial debida a la fuerza atractiva de van der Waals como una función de la distancia entre las dos partículas, la curva (b) muestra la energía de repulsión. La curva combinada para la repulsión de doble capa y la atracción de van der Waals se muestra en la curva (c), en tanto presente un máximo, el coloide tendrá cierta estabilidad (Castellan, 1987).

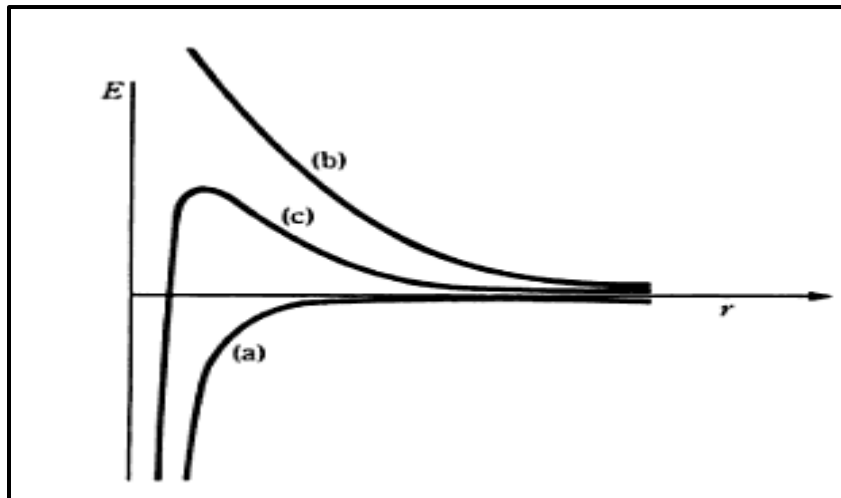


Figura 4. Energía de Interacción de partículas coloidales en función de la distancia de separación (Castellan, 1987).

1.2.1 FUERZAS DE VAN DER WAALS

La atracción de van der Waals entre los coloides es ciertamente el resultado de las fuerzas entre moléculas individuales de cada coloide. El efecto es aditivo; una molécula del primer coloide experimenta la atracción de van der Waals de cada molécula del segundo coloide. Esto se repite para cada molécula del primer coloide y la fuerza total corresponde a la suma de todas ellas. Se usa una curva de energía de atracción para indicar la variación en las fuerzas de van der Waals con la distribución entre las partículas (Wu y col., 2011).

1.2.2 INTERACCIÓN ELECTROSTÁTICA DE DOBLE CAPA.

Las fuerzas de repulsión se originan a partir de la superposición de doble capa eléctrica (SDCE) que rodea las partículas en el medio así evitando así la aglomeración coloidal. El SDCE consta de dos capas: (i) capa de Stern que es compuesta de contra-iones atraídos hacia la superficie de la partícula para mantener la neutralidad eléctrica del sistema y (ii) capa de Gouy que es esencialmente una capa de difusión de iones como se muestra en la figura 5 (Wu y col., 2011).

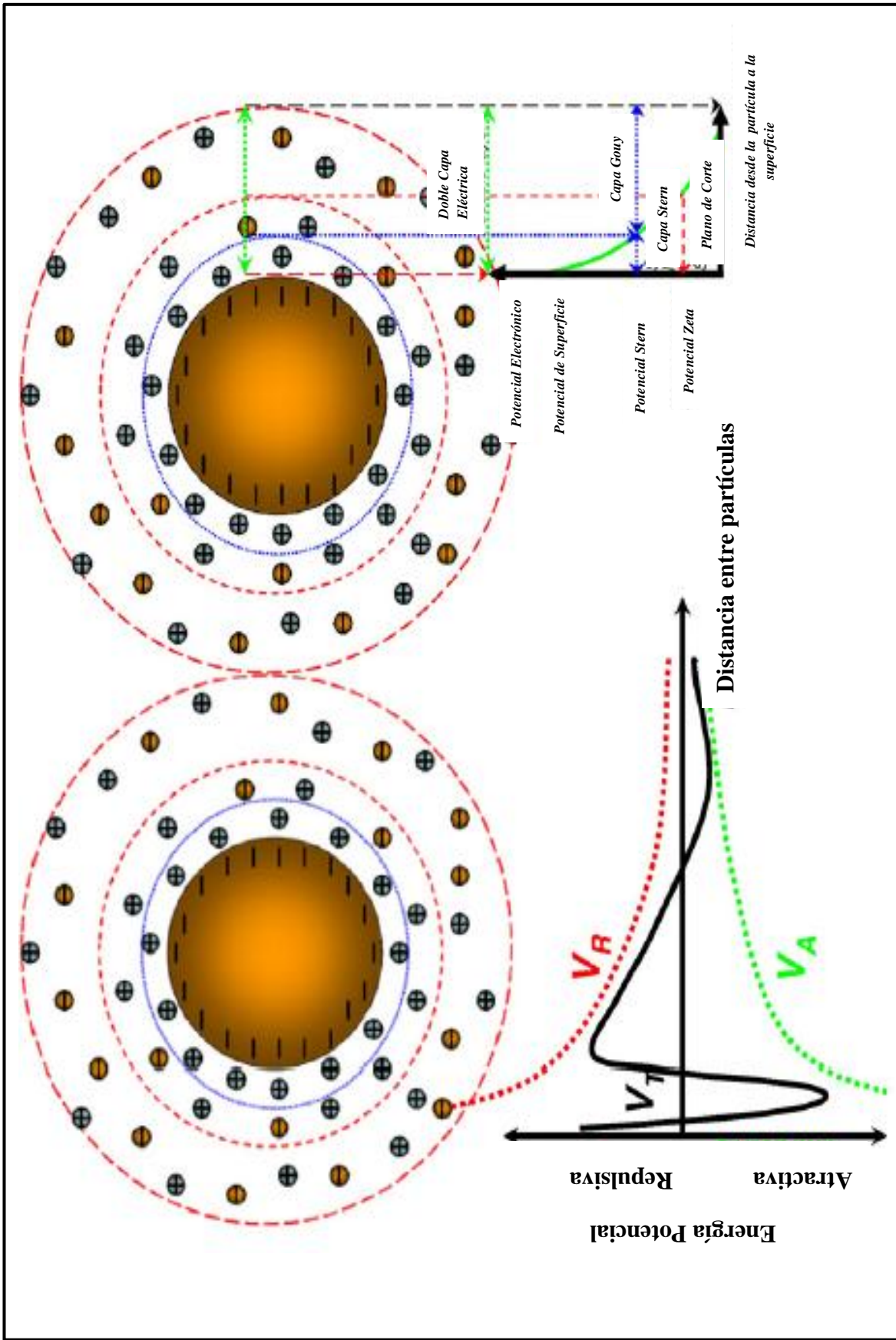


Figura 5. Ilustración de la teoría clásica de DLVO (Wu y col.2011).

La repulsión electrostática llega a ser importante cuando los coloides se aproximan y la doble capa comienza a interferir. Se requiere energía para sobrepasar esta repulsión y forzar la unión entre las partículas. Esta energía aumenta de manera considerable cuando las partículas se acercan. Se usa una curva de repulsión electrostática para indicar la cantidad de energía que hay que disminuir para que las partículas puedan ser forzadas a estabilizarse. Esta energía llega a un valor máximo cuando las partículas están casi juntas y disminuye a cero fuera de la doble capa. Su valor máximo está relacionado con el potencial de la superficie (potencial zeta) (Heurtault y col., 2003).

La estabilidad de un coloide liofóbico es una consecuencia de la doble capa eléctrica en la superficie de las partículas coloidales. Por ejemplo, si dos partículas de una material insoluble no presentan una doble capa pueden acercarse tanto que las fuerzas atractivas de van der Waals poder unirlas. Contrario a este comportamiento, supongamos que las partículas presentan doble capa, es decir, las partículas coloidales poseen un exceso de carga superficial adquirida por los grupos funcionales presentes o por los iones presentes en el medio de dispersión. Este exceso de carga afecta a la distribución de los iones del entorno, de modo que los iones de distinto signo (contra-iones) son atraídos hacia la superficie mientras que los de mismo signo (co-iones) son repelidos (Rodríguez, 2006), como se muestra en la Figura 6.

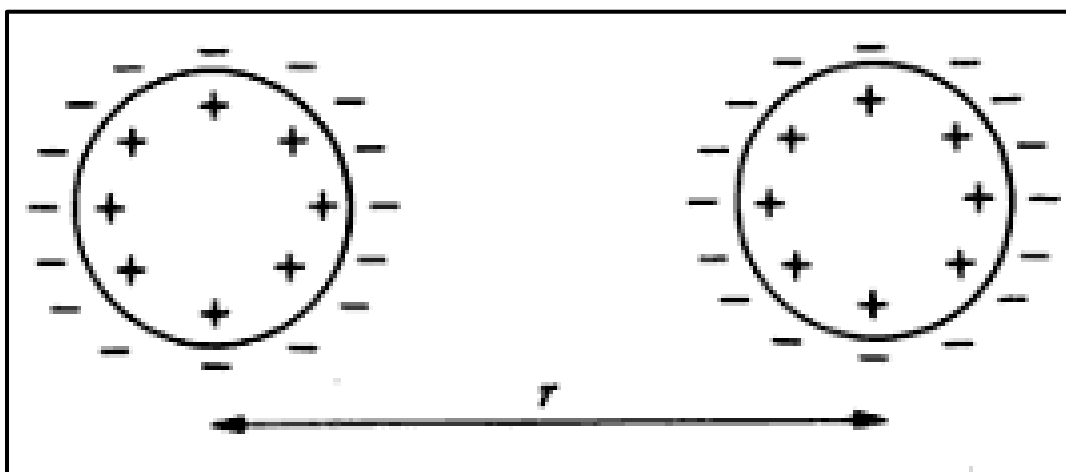


Figura 6. Doble Capa entre dos Partículas (Castellan, 1987).

El efecto global es que las partículas se repelen entre sí a grandes distancias de separación, ya que a medida que dos partículas se acercan, la distancia entre cargas similares (en promedio) es menor que la existente entre partículas de cargas diferentes. Esta repulsión evita el acercamiento de las partículas y estabiliza al coloide. Para mantener la neutralidad eléctrica debe disponerse en la proximidad de su superficie de un número de iones con carga positiva total (contra-iones) igual al número de cargas negativas presentes en la superficie de la partícula. Las dos ordenaciones de carga positiva y negativa así creadas se conocen colectivamente como doble capa eléctrica. Un punto de particular interés es el potencial donde se unen la capa Stern y la capa Gouy. Este potencial es conocido como el potencial zeta (ζ) el cual es de suma importancia ya puede ser medido de manera directa (Castellan, 1987).

1.2.3 PARÁMETROS DE ESTABILIDAD COLOIDAL.

Las suspensiones de partículas de tamaño submicrónico son una característica común de una amplia gama de situaciones de procesos de ingeniería. La estabilidad (en el sentido coloidal) en dichos sistemas sirve para controlar el comportamiento de flujo, la sedimentación y las características de filtración por medio del tamaño de partícula efectivo (estado de agregación) y/o el potencial zeta.

El régimen de medición debe ser capaz de hacer frente a un sistema que puede estar fluyendo en equilibrio y puede estar sujeto a las fluctuaciones en propiedades tales como la concentración de partículas, la temperatura, pH, la conductividad eléctrica, o alguna combinación de esos parámetros.

1.2.3.1 POTENCIAL ZETA (ζ).

Se define como una propiedad física de estabilidad, en cuanto a que ζ es una medida del grado de repulsión entre partículas cargadas de manera similar en la dispersión, coloides con un alto ζ (positivo o negativo) tienden a estabilizarse eléctricamente (Zambrano-

Zaragoza y col., 2011) donde la mayor parte de las partículas en contacto con un líquido adquieren una carga eléctrica en su superficie. El potencial eléctrico en el plano de corte se llama potencial zeta. El plano de corte es una superficie imaginaria que separa la capa fina del líquido (constituida de contra-iones) unido a la superficie sólida en movimiento. El potencial zeta es un indicador importante y útil de la carga de la superficie de la partícula (Heurtault y col., 2003).

Cuanto mayor es ζ aumenta la probabilidad de que la suspensión sea más estable debido a que las partículas se repelen entre si y por lo tanto superan la tendencia natural a agregarse. La medición del potencial zeta permite realizar predicciones acerca de la estabilidad de almacenamiento en una dispersión coloidal, como se mencionó anteriormente.

La probabilidad que ocurra agregación de partículas cargadas con alto ζ debido a la repulsión eléctrica. Sin embargo, esta regla no puede aplicarse estrictamente para sistemas que contienen estabilizadores estéricos, debido a la adsorción de los estabilizadores estéricos disminuirá el potencial zeta debido al cambio en el plano de corte de la partícula. Por otra parte, hay que tener cuidado con fuerte dependencia del potencial zeta con los iones presentes en el medio (Heurtault y col., 2003; Wu y col., 2011).

Tabla 2. Inestabilidad físico-química de suspensiones coloidales (Heurtault y col. 2013).

Inductores de Desestabilización	Efectos	Consecuencias
<p>pH Luz Radiación iónica Sonicación</p>	<p>Hidrolisis. Oxidación.</p>	<p>Permeabilidad de la membrana. Productos químicos. Liberación del ingrediente activo.</p>

<p>Surfactantes</p> <p>Electrolitos</p> <p>pH</p> <p>Ingrediente activo</p> <p>Temperatura</p> <p>Luz</p> <p>Polímero</p>	<p>Cambios en el</p> <p>Potencial Zeta (ζ).</p>	<p>Cremación.</p> <p>Gelificación.</p> <p>Aumento de tamaño.</p> <p>Liberación del ingrediente activo.</p>
<p>Matriz lipídica</p> <p>Surfactantes</p> <p>Proceso de elaboración</p> <p>Temperatura</p>	<p>Cristalización.</p> <p>Polimorfismo.</p>	<p>Liberación del ingrediente activo.</p> <p>Estructura cristalina del ingrediente activo.</p>
<p>Temperatura</p>	<p>Película rígida de surfactante.</p> <p>Organización.</p>	<p>Aumento del tamaño.</p> <p>Permeabilidad de la membrana.</p> <p>Agregación de partículas.</p>
<p>Surfactante</p> <p>Temperatura</p> <p>Polímero</p>	<p>Inversión de fases.</p>	<p>Modificación en la estructura.</p>
<p>Ingrediente activo.</p>	<p>Estabilidad interfacial.</p> <p>Movilidad.</p> <p>Localización del ingrediente activo.</p>	<p>Liberación del ingrediente activo.</p>

1.3 APLICACIÓN DE LA NANOTECNOLOGÍA EN LA CIENCIA DE LOS ALIMENTOS.

La aparición de la nanotecnología ha desencadenado enormes posibilidades para la obtención de productos y aplicaciones innovadores para una amplia gama de sectores de la industria y de consumo. Al igual que otros sectores, la nanotecnología promete revolucionar toda la cadena de producción de alimentos – desde la producción a la

elaboración, el almacenamiento, así como la obtención de materiales, productos y aplicaciones innovadores. Si bien la nanotecnología tiene muchas aplicaciones posibles, las que se utilizan actualmente en los sectores alimentario y agropecuario son relativamente pocas, dado que la ciencia sigue siendo muy reciente (FAO, 2011).

Componentes orgánicos que están presentes de forma natural en alimentos como las proteínas, carbohidratos y grasas puede variar con respecto a su tamaño, desde grandes polímeros de moléculas más simples en el rango nanométrico. Nanomateriales orgánicos se pueden sintetizar para fines específicos, tales como la encapsulación de nutrientes para aumentar la biodisponibilidad, mejorar el sabor, la textura y la consistencia de los productos alimenticios o enmascarar un sabor u olor indeseable. Las funcionalidades de los nanomateriales de este tipo por ejemplo el tamaño de partícula, distribución de tamaño, aglomeración potencial y la carga superficial pueden ser afectados por la matriz biológica en la que se llevan a cabo (Powers y col., 2006), tales como la composición de un alimento. La ciencia de la producción de ingredientes alimentarios derivados de nanotecnologías está todavía en desarrollo, sin embargo, muestra una gran promesa con la perspectiva de mejorar la funcionalidad del producto sin comprometer la calidad o la seguridad alimentaria (Cushen y col., 2012).

1.3.1 NANOTECNOLOGÍA EN LA CIENCIA DE LOS ALIMENTOS.

La nanotecnología, ha abierto nuevas posibilidades en la conservación de alimentos, se espera que tenga un impacto en la producción, el procesamiento, el almacenamiento y la seguridad de los alimentos. En la actualidad, los estudios de la nanotecnología en los alimentos se centran en el desarrollo de nuevos materiales de envasado, nutracéuticos, y agentes antimicrobianos, y hay muy poca información sobre la conservación y almacenamiento de los alimentos y proporciona la funcionalidad del producto y estabilidad, incluyendo la liberación controlada del núcleo durante el almacenamiento (Chang y col., 2010; Chaudhry y col., 2008; Rhim y col., 2009; McClements y col., 2009).

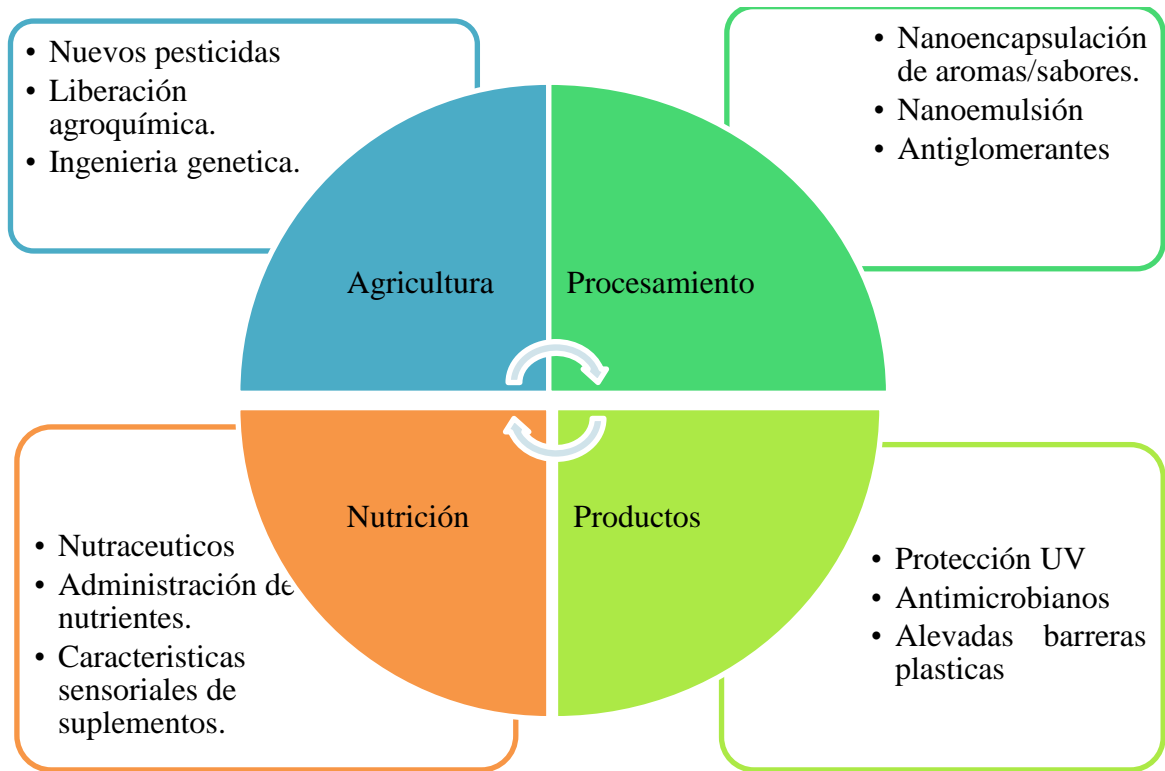


Figura 7. Aplicaciones de Nanotecnología en Alimentos (Duncan, 2011).

La estructura de las nanocápsulas es muy atractivo para el desarrollo de alimentos ya que el núcleo oleoso, puede ser un aceite activo que puede servir como un vehículo para contener diferentes sustancias, en particular de aditivos de alimentos y suplementos dietéticos tales como sabores, edulcorantes, probióticos, nutraceuticos, pigmentos, agentes antimicrobianos, antioxidantes, o cualquier otro material que requieren encapsulación. Este enfoque puede tener importantes implicaciones en los alimentos teniendo en cuenta el tamaño submicrónico (Bouchemal y col., 2004).

De acuerdo a Weiss y col. (2006) la nanotecnología tiene el potencial de afectar muchos aspectos de los alimentos del mundo y de los sistemas agrícolas. Algunos ejemplos de los importantes vínculos que la nanotecnología tiene a la ciencia e ingeniería de los sistemas agrícolas y alimentarios son:

- Seguridad alimentaria
- Enfermedad de métodos de tratamiento de entrega

- Nuevas herramientas para la biología molecular y celular
- Nuevos materiales para la detección de patógenos
- Protección del medio ambiente.

La nanotecnología en la industria alimentaria, además de la seguridad alimentaria, incluye el diseño de nuevos productos alimenticios, nutrientes y sabores encapsulados, la seguridad microbiológica de los alimentos, la biotecnología de alimentos, nano-biosensores, entre otras aplicaciones, han dado un giro a esta tecnología en la industria de los alimentos.

1.3.2 APLICACIÓN EN JUGOS.

Actualmente los consumidores están informados sobre el papel positivo que tienen ciertos ingredientes alimentarios en la salud, así como las fuentes alimentarias disponibles. Esto se traduce en un mayor interés por informarse y adquirir productos con determinadas características. El consumidor busca buena presentación, características sensoriales atractivas y propiedades benéficas. Para la industria alimentaria esta situación representa una gran oportunidad de abrir nuevas líneas de productos con un valor agregado de gran aceptación por consumidores meta. Ejemplo de estos son los antioxidantes como ya se ha mencionado con anterioridad, entre ellos se encuentra el β -caroteno del cual existe evidencia de que tiene efectos positivos en enfermedades cardiovasculares, prevención de cáncer, el sistema inmune y ralentizar el envejecimiento. El uso de las bebidas funcionales ha crecido rápidamente en la última década y hay una creciente demanda de un producto con antioxidantes adecuado para aplicaciones de bebidas.

Halliwel y Gutteridge (1999) definieron como antioxidante a toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones, con respecto a las de un sustrato oxidable (biomolécula) retarda o previene la oxidación de dicho sustrato.

Los antioxidantes se clasifican en endógenos que son los fabricados por la propia célula y los exógenos que son los que ingresan en el organismo a través de la dieta o de suplementos con formulaciones antioxidantes.

Tabla 3. Tipos de Antioxidantes (Onate-jaén y col, 2006).

Exógenos	Endógenos
Vitamina E	Glutación
Vitamina C	Coenzima Q
β - caroteno	Ácido tióctico
Flavonoides	Enzimas: Catalasa Glutación peroxidasa Superóxidodismutasa (SOD)

Los antioxidantes procedentes de los alimentos de la dieta disminuyen significativamente los efectos negativos que producen especies reactivas, como el nitrógeno o el oxígeno, sobre diversas funciones normales fisiológicas en los seres humanos. Se incluyen en esta categoría las vitaminas E, C y el Selenio. Los carotenos, aunque no cumplen estrictamente la definición de antioxidantes, influyen también las reacciones bioquímicas que intervienen en el proceso de oxidación (Onate-jaén y col., 2006).

1.3.2.1 β – CAROTENO.

Los carotenoides son pigmentos que se encuentran en algunas frutas, hortalizas y algunos productos del mar. El β -caroteno se produce principalmente en las zanahorias. Tiene una estructura molecular básica consta de ocho unidades de isopreno, que contiene 40 átomos de carbono, y dos anillos en el extremo de su cadena de doble enlace conjugado. La cadena larga conjugada es el responsable del color naranja de β -caroteno (Figura 8).

El patrón de dobles enlaces conjugados en la cadena principal de polieno en carotenoides determina sus propiedades de absorción de luz e influye en la actividad antioxidante. De

acuerdo con el número de dobles enlaces varias configuraciones cis/ trans (E / Z) son posibles para una molécula (Stahl, 2003).

El β -caroteno es uno de los carotenoides que ha recibido una atención especial por su alta provitamina A y poseer capacidad antioxidante. Es insoluble en agua y solo ligeramente soluble en aceite a temperatura ambiente, esto hace que sea difícil de ser incorporado en las formulaciones de alimentos, además el beta caroteno es sensible al oxígeno, calor y luz, lo que limita aún más sus aplicaciones en productos alimenticios, nutracéuticos y farmacéuticos (Yuan, 2008).

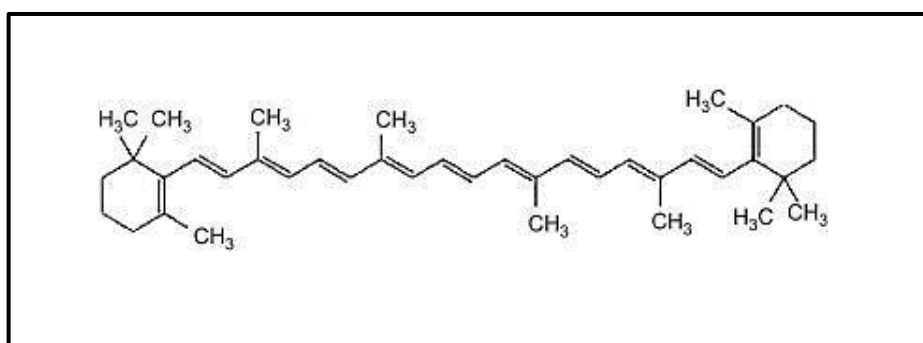


Figura 8. Estructura química de β -caroteno (Ribeiro, 2008).

El β -caroteno se convierte en retinol en el cuerpo y también posee actividad de provitamina A. Debido a su actividad antioxidante, β -caroteno pueden desempeñar papeles importantes en la prevención de enfermedades degenerativas (Packer y col., 2004).

Entre los carotenoides, el β -caroteno tiene la mayor pro - actividad de vitamina A, por lo que es un fuerte candidato para su incorporación en alimentos funcionales. Sin embargo, la absorción de β -caroteno a partir de muchos alimentos naturales y procesados es a menudo ineficaz y muy variable. Esto se ha atribuido a una serie de causas: El atrapamiento en matrices de alimentos, baja solubilidad en agua, alto punto de fusión, estabilidad química pobre (Boon y col, 2010; Castenmiller y West, 1998; Yonekura y Nagao, 2007). Los estudios han demostrado que la biodisponibilidad de β -caroteno y otros carotenoides puede ser mejorado por su co-administración con los lípidos digestibles (Borel , 2003 y van het Hof y col., 2000).

1.3.3 NORMATIVIDAD Y LEGISLACIÓN.

La investigación Toxicología y evaluación de los riesgos de las nanotecnologías son prácticamente inexistentes, especialmente en el sector de la alimentación (Tiede y col., 2008). Ya que pocos han demostrado ser de gran valor en términos de su uso en la evaluación de la toxicidad (Cartas & Magnuson, 2010). Actuales enfoques de prueba de toxicidad utilizados para los materiales convencionales son un punto de partida adecuado para evaluar los riesgos asociados a los nanomateriales, sin embargo, las modificaciones deben hacerse para dar cuenta de las diferencias entre los materiales convencionales y nanomateriales.

Algunas nanopartículas se ha encontrado que exhiben efectos negativos sobre tejidos tales como la inflamación, el estrés oxidativo y signos de formación de tumor temprano (Carlson y col., 2008). Para determinar los perfiles de toxicidad los detalles de las nanopartículas se deben considerar el tamaño, forma, solubilidad, reactividad y otros parámetros fisicoquímicos, así como las propiedades de la sustancia en una forma no-nano. Es probable que las propiedades toxicológicas varíen entre los nanomateriales de partículas, así una evaluación del riesgo se debe realizar en una base de caso por caso (Munro y col., 2009).

CAPÍTULO II METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1 OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la estabilidad de un sistema coloidal con β -caroteno nanoencapsulado en presencia de sólidos solubles y diferentes pH's mediante pruebas físicas, fisicoquímicas y espectrofotométricas en jugos sometidos a temperatura ambiente y refrigeración para establecer condiciones de aplicación en jugos.

2.1.1 OBJETIVO PARTICULAR 1

Analizar las características de nanocápsulas de β -caroteno mediante análisis morfológicos, pruebas de dispersión láser determinando tamaño de partícula y potencial zeta para obtener un sistema de talla submicrónica.

Variables

Factor independiente: tamaño de partícula.

Factor explicativo: talla submicrónica.

2.1.2 OBJETIVO PARTICULAR 2.

Analizar la estabilidad de nanocápsulas de β -caroteno mediante pruebas de tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta (ζ) en dispersiones en función del pH, °Brix y temperatura para establecer condiciones de aplicación en jugos.

Variables

Factor independiente: pH, [] de azúcar y temperatura.

Factor explicativo: estabilidad de nanocápsulas.

2.1.3 OBJETIVO PARTICULAR 3.

Analizar la estabilidad de nanocápsulas de β -caroteno mediante pruebas colorimétricas y turbidimétricas en función de la concentración de nanocápsulas para establecer condiciones de aplicación en jugos.

Variables

Factor independiente: concentración de nanocápsulas.

Factor explicativo: estabilidad de nanocápsulas.

2.1.4 OBJETIVO PARTICULAR 4.

Analizar el β -caroteno residual del sistema coloidal mediante pruebas espectrofotométricas y colorimétricas para correlacionarlo con la estabilidad del polímero encapsulante a diferentes condiciones de pH, presión osmótica y temperatura.

Variables

Factor independiente: pH, presión osmótica y temperatura.

Factor explicativo: estabilidad del polímero encapsulante.

2.1.5 OBJETIVO PARTICULAR 5.

Analizar el comportamiento de nanocápsulas de β -caroteno en formulación de jugos naturales para contrastar su comportamiento en producto terminado.

Variables

Factor independiente: condiciones del jugo

Factor explicativo: comportamiento de las nanocápsulas de β -caroteno.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 ACTIVIDADES PRELIMINARES

2.2.1.1 Elaboración de Nanocápsulas de β -caroteno.

La elaboración de las nanocápsulas de β -caroteno, se llevó a cabo mediante el método de emulsión – difusión (MED), propuesto por Quintanar – Guerrero y col., 1998 y optimizado para activos alimenticios por Zambrano y col., 2011.

2.2.1.2 Elaboración de Soluciones Buffer.

Se realizaron 3 soluciones buffer de pH en intervalos de 3, 4.5 y 6 para analizar la estabilidad que tienen las nanocápsulas. Se prepararon a partir de la mezcla de ácido ascórbico con fosfato monobásico.

Las soluciones se obtuvieron mezclando soluciones madre a partir del ácido ascórbico 3 M y fosfato monobásico de sodio 3 M. A partir de estas concentraciones iniciales se realizaron diluciones de acuerdo al pH requerido conforme a las siguientes expresiones:

$$ka = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \rightarrow [H^+] = \frac{ka * [HA]}{[A^-]} \rightarrow [H^+] = \frac{ka * C_a}{C_s} \quad \text{Ecuación (2)}$$

$$pH = -\log [H^+] \quad \text{Ecuación (3)}$$

2.2.1.3 Caracterización de Jugos Comerciales.

Con el fin de conocer las características de un jugo comercial en cuanto a formulación y características fisicoquímicas (pH, °Brix, turbidez y color) se prosiguió a caracterizar cinco marcas de jugos comerciales para posteriormente poder formular un jugo con características similares a los resultados obtenidos.

2.2.1.4 Curva Patrón de β -caroteno.

Con la finalidad de determinar la concentración de nanocápsulas de β – caroteno a las diferentes condiciones experimentales se realizó una curva patrón en base a la absorbancia utilizando para las mediciones espectrofotométricas un espectrofotómetro (Genesys 10s UV-Visible, USA) a 460 nm.

Posteriormente se llevó a cabo la curva patrón de las nanopartículas de β -caroteno, a la longitud de onda que tiene el máximo de absorbancia. Se realizaron las diluciones a partir de la solución madre que se encuentra a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en intervalos de 20y se determinó en el espectrofotómetro (Genesys 10s UV-Visible, USA). Se elaboró la curva patrón concentración en función a la absorbancia.

2.2.3 ESTABILIDAD DE NANOCÁPSULAS DE β -CAROTENO.

2.2.3.1 Morfología de las Nanocápsulas.

Las nanocápsulas se purificaron por tres ultracentrifugaciones (30 000 rpm durante 1 hora a 5°C) a fin de eliminar el exceso de estabilizante. Una gota de suspensión concentrada fue esparcida en la superficie de un recipiente de vidrio y secada. Finalmente, las muestras secas fueron montadas en un portaobjetos y adheridas con cinta al carbón electroconductiva en un evaporador catódico con una capa de oro (-20 nm) utilizando un JFC-1100 Sputter Coater (JEOL, Japón) y después observadas al alto vacío en un microscopio electrónico de barrido.

2.2.3.2 Tamaño de Partícula e índice de Polidispersión.

El tamaño de partícula e índice de polidispersión se determinó por la técnica de dispersión de luz láser en un ángulo fijo de 273°, a una temperatura de 25 °C usando un Z-sizer Nano ZS90 (Malvern Zetasizer Mod. ZEN3690, U.K). Las dispersiones se diluyeron con agua Milli-Q®, de acuerdo con el histograma de frecuencias volumen. Las mediciones se

realizaron por triplicado a las nanocápsulas de β -caroteno y posteriormente a las soluciones preparadas.

2.2.3.3 Potencial Zeta (ζ).

El potencial zeta fue estimado para las nanocápsulas de β -caroteno y posteriormente a las soluciones preparadas, usando un Z-sizer Nano ZS90 (Malvern Zetasizer Mod. ZEN3690, U.K) una vez diluidas con agua Milli-Q ® a 0.01%, el valor del potencial zeta fue normalizado con dispersión patrón de poliestireno ($\zeta = -55$ mV), las mediciones fueron realizadas a 25°C por triplicado.

2.2.3.4 Determinación de °Brix.

Los grados °Brix fueron evaluados de acuerdo con la NMX-F-103-1982, para la determinación en alimentos, frutas y derivados, ya que es lo que marca la norma NOM-173-SCFI-2009 para jugos de fruta pre envasados como referencia de la prueba. La determinación de °Brix se realizó con el Refractómetro (AO 10431 Scientific Instruments, USA) calibrando el equipo en 0 con agua destilada, posteriormente se tomó una muestra de las soluciones y se colocó en el prisma realizándose por triplicado.

2.2.3.4 Determinación de pH.

Se realizaron las pruebas de pH con el potenciómetro (Hanna 213 Microprocessor pH meter, Portugal) previo a la determinación de calibro con una solución buffer de 7 y 4. Se realizó directamente en todas las soluciones, todos los ensayos se hicieron por triplicado.

2.2.3.5 Turbidimetría.

Se determinó la turbidez mediante el turbidímetro (Hanna LP 2000, Rumania) de longitud de onda 890 nm, el cual se calibro con agua destilada que a su vez fue el medio de dilución

de las muestras posteriormente la muestra fue colocada en la cubeta de medición (4u) obteniéndose así las unidades nefelométricas Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente por triplicado.

2.2.3.6 Colorimetría.

La determinación de color se realizó utilizando un colorímetro Minolta Spectrophotometer CM-5, Japón). Se registraron las coordenadas de L, a y b de la escala de Hunter Lab de acuerdo a lo que establece la CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) que fueron tomadas usando iluminante C y un observador estándar a 10° con ayuda de una celda de cuarzo para líquidos. Cada medición fue realizada a temperatura ambiente por triplicado. La evaluación de color se estableció de acuerdo a los siguientes parámetros.

$$\Delta E \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad \text{Ecuación (4)}$$

$$\text{Ángulo } ^\circ\text{Hue (h = } \tan^{-1} (a / b)) \quad \text{Ecuación (5)}$$

$$\text{Croma } \sqrt{(a)^2 + (b)^2}. \quad \text{Ecuación (6)}$$

2.2.3.7 β -caroteno Residual.

Se calculó la concentración de β -caroteno con el fin de conocer la eficiencia de encapsulación, se tomó la muestra inicial (día 0), de los diferentes tratamientos y se hizo la determinación espectrofotométrica. Obtenidos los valores de concentración, se calculó la eficiencia de encapsulación, en el sistema a las diferentes condiciones experimentales de la siguiente manera:

$$\beta\text{-caroteno residual (\%)} = \frac{C_1}{C_2} \times 100 \quad \text{Ecuación (7)}$$

2.2.4 APLICACIÓN EN JUGOS.

Con el fin de contrastar los resultados obtenidos sobre la estabilidad de las nanocápsulas en las soluciones se prosigue a formular un jugo natural, tomando en cuenta los ingredientes y características obtenidas en la caracterización de los jugos de las actividades preliminares.

Los parámetros evaluados fueron los mismos que para las soluciones control a diferentes condiciones experimentales que se muestran a continuación en la tabla 4. Las muestras pasteurizadas en un intercambiador de calor de superficie raspada a condiciones óptimas de proceso (González-Reza, 2012) y almacenadas en frascos de vidrio a temperatura ambiente y refrigeración (4 °C) durante 4 semanas.

Tabla 4. Formas de adición de β -caroteno en los Jugos Naturales

Muestra Control	Sistema
1	Jugo Natural
2	Jugo Natural / Nanocápsulas (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
3	Jugo Natural / Nanoemulsión (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
4	Jugo Natural / β -caroteno hidrosoluble (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

En la tabla 5 se muestran las variables y los niveles considerados para ver la influencia de las variables sobre la estabilidad de las nanocápsulas de β -caroteno. El diseño experimental considerado fue el factorial completo 3^2 con un punto central.

Se realiza un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar las diferencias significativas entre las variables independientes utilizando el programa estadístico MINITAB 16.

Los jugos de naranja se analizan mediante un análisis de varianza (ANOVA) para ver la influencia que presentaban las variables.

Tabla 5. Diseño de Experimentos Factorial Completo.

Tratamientos	pH	°Brix	[] Nanocápsulas (µg/mL)
1	3	7	50
2	3	7	100
3	6	7	50
4	6	7	100
5	3	15	50
6	3	15	100
7	6	15	50
8	6	15	100
9	4.5	11	75

CAPÍTULO III RESULTADOS

3.1 Actividades Preliminares.

3.1.1 Caracterización de Jugos Comerciales.

Tabla 6. Parámetros físicos determinados en jugos comerciales.

Jugos	pH	°Brix	Turbidez	L	a*	b*	° Hue	Croma
JUMEX "Único Fresco" Naranja	3.20	11.00	2150.50	57.48	10.36	66.45	82.90	67.25
JUMEX "Néctar de Naranja"	3.00	10.00	1522.00	56.53	6.95	48.25	81.80	48.75
BOING Jugo de Piña	2.66	9.00	567.50	79.43	1.97	73.01	88.45	73.04
FLORIDA 7 Bebida Cítricos	2.25	9.00	1826.50	59.44	16.39	77.59	78.07	79.30
FLORIDA 7 Bebida Pulpa de Guayaba	3.11	13.00	1250.00	60.72	8.32	27.95	73.42	29.16

La tabla 6 muestra la caracterización fisicoquímica de jugos comerciales en la cual se observa un rango de sólidos solubles de 9 a 13 °Brix de acuerdo con lo establecido con la NOM-173-SCFI-2009 para bebidas y cítricos (naranja, toronja y limón) y contrastando con lo obtenido para bebida de guayaba de acuerdo con lo establecido por CODEX STAN 247-2005 para jugos y néctares de frutas que indica que el nivel mínimo de °Brix para esta fruta es de 8.5. Los valores obtenidos para color, en cuanto a los valores de luminosidad los datos de los jugos con pulpa presentan valores por debajo a los que se analizaron en el jugo de piña que tiene un valor de 79.43, siendo de un color más claro los de la pulpa, los valores presentados sobre color se acercan al comportamiento obtenido por Meléndez-Martínez y col., 2011 en los cuales reporta valores de 73.41 ± 1.29 a 61.13 ± 2.42 de luminosidad (L), 13.94 ± 1.60 a 8.15 ± 1.24 de a^* , 68.92 ± 3.76 a 55.75 ± 3.75 de b^* ; de Croma 70.32 ± 3.94 a 56.35 ± 3.80 y °Hue 78.59 ± 0.87 a 81.69 ± 1.04 respectivamente, siendo mayor el de bebida de cítricos en el valor de Croma lo cual nos indica que el jugo presenta un color oscuro. En base a los datos obtenidos en el análisis de jugos comerciales se eligieron los valores para el diseño de experimentos.

3.1.1 Curva Patrón de nanocápsulas de β -caroteno.

La curva patrón se realizó a partir del barrido, donde se obtuvo que a la longitud de onda a la cual tenía mayor absorbancia fue a 460 nm, por lo cual a esta longitud de onda se realizó la curva patrón Figura 9, con la cual se obtuvo la siguiente ecuación: con una R^2 de 0.99945, lo cual reafirma que la tendencia es de la Ley de Lambert - Beer.

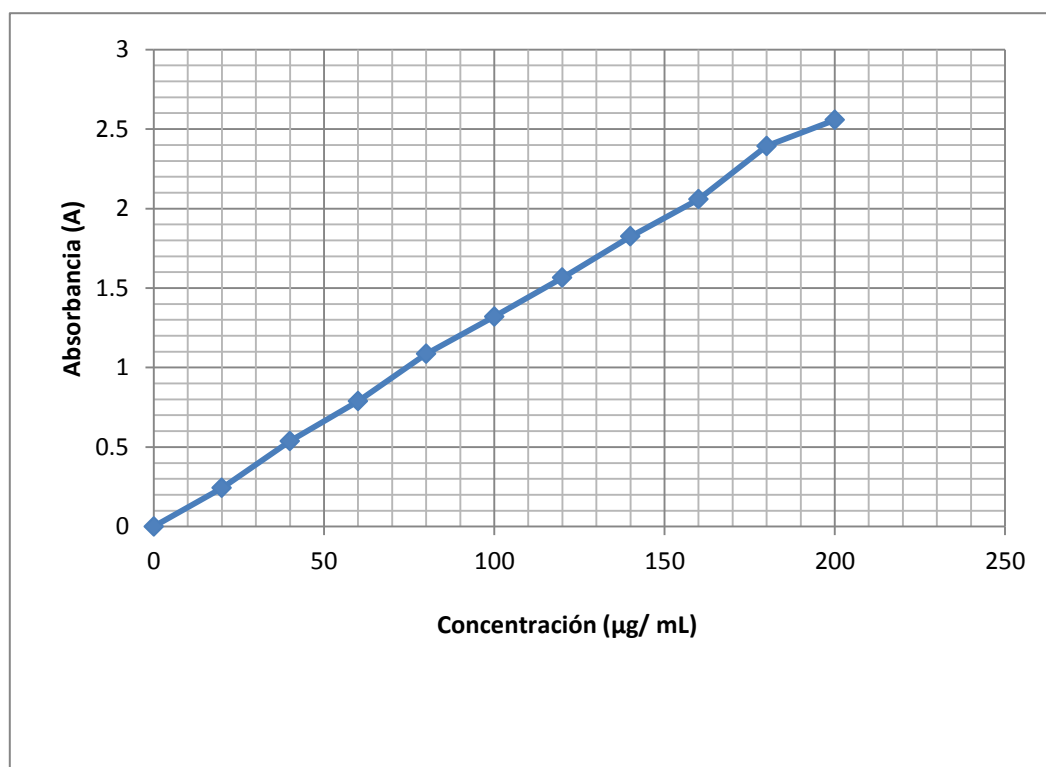


Figura 9. Curva Patrón de nanocápsulas de β -caroteno.

La ecuación obtenida para conocer la concentración de β -caroteno en las soluciones y los jugos fue la siguiente:

$$\text{Concentración de } \beta\text{-caroteno} = \frac{\text{Absorbancia}}{1.3034 \cdot 10^{-2}} \quad \text{Ecuación (8)}$$

3.2 Caracterización de Nanocápsulas Elaboradas por el Método Emulsión – Difusión (MED).

3.2.1 Análisis Morfológico.

En la figura 10 se presenta la micrografía obtenida en el microscopio electrónico de barrido que corresponden a la muestra inicial de nanocápsulas, es decir, antes de ser adicionadas a las soluciones, con la cual el principal objetivo era demostrar la presencia de nanocápsulas uniformes en el sistema disperso y la forma esférica definida. Estas son la mejor evidencia de la estructura capsular consiste en una nanogota oleosa (β -caroteno) rodeada por una envoltura delgada (poli- ϵ -caprolactona).

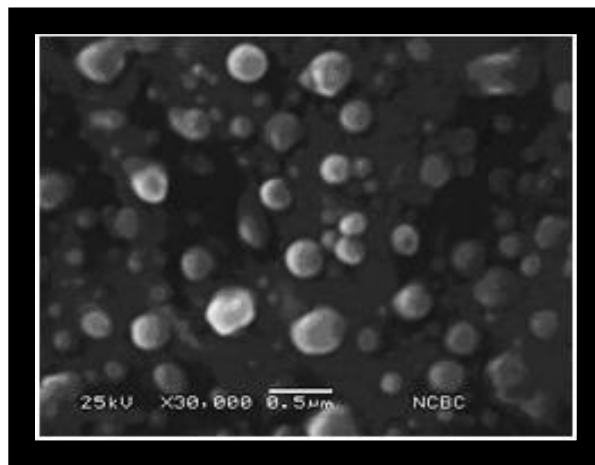


Figura 10. Morfología de Nanocápsulas de β -caroteno.

3.2.2 Tamaño de Partícula e índice de polidispersión (IPD).

Se observa en la tabla 7 que el tamaño de partícula se encuentra dentro del rango establecido por Quintanar-Guerrero y col. (2005) que es de 150-200 nm, sin embargo

existen otros reportes sobre el tamaño de partícula ya que este dependerá del método de preparación, la composición de la fase orgánica y por la velocidad de cizallamiento del proceso de emulsificación. Moinard-Chécot y col. (2008) reporta que este método permite tamaños controlados de nanocápsulas de 100 – 500 nm, la distribución de los tamaños de partícula obtenidos en este sistema nos indica la homogeneidad del sistema, es decir, que solo se tiene una población de tamaño de partícula con una fracción de intensidad 100%. De la misma manera se observa que el índice de polidispersión es muy próximo a lo reportados por Zambrano-Zaragoza y col., (2011) al nanoencapsular β -caroteno como ingrediente de grado alimenticio el cual muestra una distribución pequeña de las nanocápsulas que tiende a ser más estable debido a que entre menor sea el IPD mayor será la estabilidad.

Tabla 7. Tamaño de Partícula e Índice de Polidispersión en las Nanocápsulas de β -caroteno

Tamaño de Partícula (nm)	Índice de Polidispersión
193.96 \pm 3.14	0.190 \pm 0.018

3.2.3 Potencial Zeta (ζ).

El ζ obtenido para las nanocápsulas de β -caroteno fue de -30.9 ± 2.48 lo que representa que el sistema tiende a la estabilidad con poca probabilidad de agregación, debido a que las partículas cargadas se repelen entre si y por lo tanto superan la tendencia natural a agregarse (Noriega-Peláez y col., 2011). De acuerdo con Heurtault y col. (2003) la medición del ζ nos permite realizar predicciones acerca de la estabilidad de almacenamiento de una dispersión coloidal. Actualmente se admite que los potenciales zeta de ± 30 mV a ± 6 mV como óptimo, son necesarios para la estabilización electrostática, por tanto el sistema que se adicionara a las soluciones modelo es estable y es adecuado para aplicar la tecnología.

3.3 Estabilidad de las Soluciones Modelo.

Con el fin de evaluar el efecto del pH, °Brix y la temperatura de las soluciones en la estabilidad del sistema nanoencapsulado fueron tomados en cuenta como parámetros de control durante los 30 días de experimentación a temperatura ambiente (TA) y a temperatura de refrigeración (TR) 4 °C, obteniendo los datos que se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. pH y °Brix de las soluciones almacenadas a temperatura ambiente y refrigeración.

Tratamientos	pH		°Brix	
	Ambiente	Refrigeración	Ambiente	Refrigeración
pH 3, °Brix 7, [] 50 µg/mL	3.22± 0.20	3.15±0.11	8 ± 1	8 ± 1
pH 3, °Brix 7, [] 100 µg/mL	3.20±0.17	3.14±0.19		
pH 6, °Brix 7, [] 50 µg/mL	5.87±0.18	5.91±0.11		
pH 6, °Brix 7, [] 100 µg/mL	5.94±0.09	5.92±0.10		
pH 3, °Brix 15, [] 50 µg/mL	3.18±0.13	3.17±0.15	17 ± 1	16 ± 1
pH 3, °Brix 15, [] 100 µg/mL	3.25±0.28	3.15±0.16		
pH 6, °Brix 15, [] 50 µg/mL	5.90±0.11	5.89 ±0.10	14 ± 1	14 ± 1
pH 6, °Brix 15, [] 100 µg/mL	5.91±0.11	5.91±0.09		
pH4.5, °Brix 11, [] 75 µg/mL	4.68±0.12	4.57±0.11	13 ± 1	12 ± 1

En la tabla 8 se muestran los promedios de los valores que se obtuvieron durante todo el tratamiento, en la columna uno se muestran las condiciones iniciales de pH y °Brix de las soluciones lo cual indica que la variación no es significativa ($p < 0.05$) entre las muestras ya que la variación solo fue de ± 0.20 con respecto a una pH inicial de 3, un comportamiento similar se obtuvo para los tratamientos con pH de 4.5 así como para los °Brix. Por lo cual las condiciones a las que se sometieron las soluciones tuvieron un comportamiento constante durante la experimentación, sin embargo se denota una disminución en las muestras con un pH de 6 lo cual podría indicarnos la degradación del polímero o de otro ingrediente (Mallin y col., 1996; Kishore y col., 2011) por efecto de la interacción electrostática de partículas en medio acuoso con ese potencial hidrógeno ya que el grado de disociación es mayor. De acuerdo al análisis de varianza realizado para las soluciones los factores lineales y de interacción tuvieron un efecto significativo ($p < 0.05$) para las respuestas analizadas.

3.3.1 Tamaño de Partícula e Índice de Polidispersión en las Soluciones Modelo.

Para la evaluación de la estabilidad del sistema nanoparticulado es fundamental conocer el tamaño de partícula ya que indica la manera en que se encuentran distribuidas las nanocápsulas en la solución, ya que si el porcentaje de intensidad es alto hay una mayor estabilidad por efecto de la cantidad de partículas del mismo tamaño en el sistema (Mirhosseini y col., 2008). Así mismo es importante conocer el IPD valores de IPD que van 0.1 a 0.25 indica una distribución de tamaño estrecha mientras que un PDI mayor que 0.5 se relaciona con una amplia distribución (Wu y col., 2011).

De acuerdo a la distribución del tamaño de partícula presentan un comportamiento monomodal en ambos casos al inicio del periodo de almacenamiento, sin embargo las soluciones con condiciones de pH 3 se tiene una distribución más amplia con respecto a las soluciones de pH 6, es decir, una gama de tamaños de partícula más amplia; con un pH de 3 el tamaño de partícula promedio se encuentra entre 70 nm – 400 nm aproximadamente con una intensidad de 17% y con un tamaño de partícula promedio de 214.93 nm, mientras las soluciones con un pH 6 se encuentra entre 100 nm – 250 nm con una intensidad de 25%

y un tamaño de partícula promedio de 256.53 nm. Con lo anterior se muestra que a pesar que las soluciones con un pH de 3 se presentan tamaños de partícula de 400 nm, la media de tamaños de partícula no se encuentra dentro de estos valores, esta variación se debe a la capa de hidratación que está formando los iones hidronio con las nanopartículas y el azúcar; lo cual nos indica que la hidratación no es igual en todo el sistema, mientras que las soluciones con pH de 6 la mayoría de la población de tamaño de partículas se encuentra mayores a 250 nm que podría indicar un fenómeno de inestabilidad. El aumento en el tamaño medio de las partículas indica que se produce aglomeración. A un pH de 6 la distribución del tamaño es menos amplia lo que indica que existe un mayor número de partículas de tamaños similares sin embargo esto no indica que el proceso de aglomeración esté presente en el sistema o el proceso es ligeramente diferente que conduce a los intervalos de tamaños más amplios que a un pH de 3, esto ocasionado a que las fuerzas electrostáticas de repulsión disminuyen a mayor concentración de iones hidronio (soluciones pH de 6), permitiendo un mayor acercamiento de las partículas y con ello un aumento en la inestabilidad en el sistema, tal como lo reportado por Narong y James (2006).

Con respecto a los cambios ocurridos en las soluciones después del periodo de almacenamiento los resultados se muestran a continuación en las gráficas de caja y Pareto (Figura 11 y 12) respectivamente:

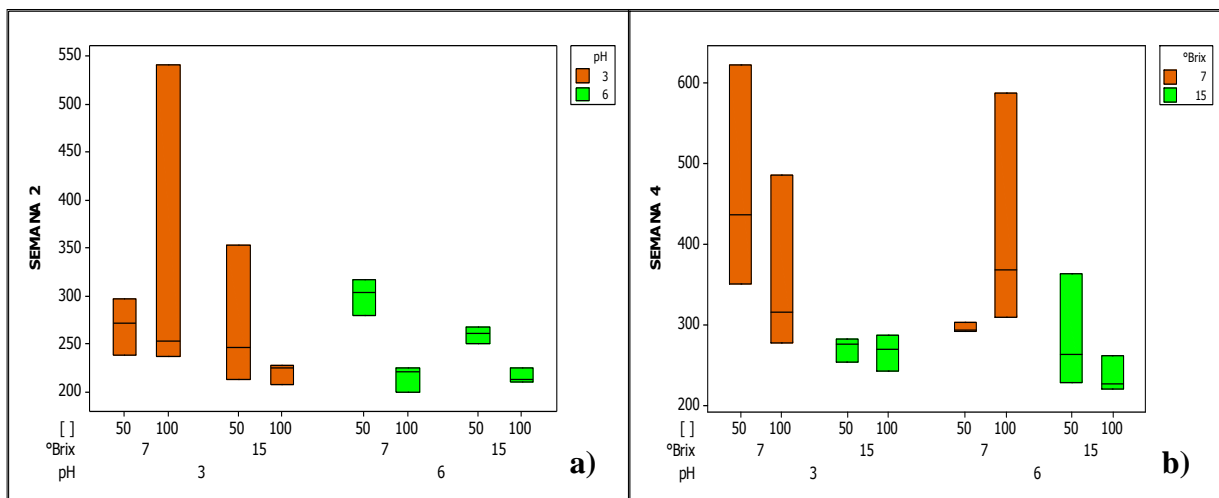


Figura 11. a) Grafica de caja de las soluciones almacenadas a temperatura ambiente (Semana 2). b) Grafica de caja de las soluciones almacenadas a temperatura de refrigeración (semana 4)

Durante la primera semana el comportamiento fue similar tanto para las muestras almacenadas a temperatura ambiente como para las que se encontraban en refrigeración con respecto a las muestras iniciales. En la semana dos las soluciones que fueron almacenadas a temperatura ambiente los resultados presenciaron un cambio significativo ($p < 0.05$) con respecto al tamaño de partícula; donde los factores que tuvieron mayor influencia en este cambio fueron la interacción $\text{pH} * \text{°Brix}$ y $\text{°Brix} * [\]$ y el pH como termino lineal. Sin embargo las soluciones almacenadas a temperatura de refrigeración denota este cambio significativo a partir de la semana 4 resultado un cambio en la última semana con un incremento en el tamaño aun mayor, siendo este más notorio en las soluciones con °Brix de 7, siendo este el factor que tuvo una mayor influencia significativa en las soluciones como se analiza en la gráfica 12, teniendo así un tamaño de partícula promedio durante el periodo de almacenamiento de 399.7 nm para las soluciones con 7 °Brix y de 252.2 nm para 15 °Brix , este comportamiento es debido a que ya que la barrera de energía entre pares de partículas disminuye al aumentar las concentraciones de azúcar, a una concentración crítica de azúcar las interacciones entre las partículas y las moléculas de azúcar (hidratada o no) son más importantes que las interacciones entre las propias partículas, que regula la estabilidad coloidal del sistema (Benítez y col., 2009). A concentraciones mayores de azúcar aumenta la repulsión entre la interacción partícula – azúcar lo que hace que el tamaño de partícula sea menor que las concentraciones menores de azúcar.

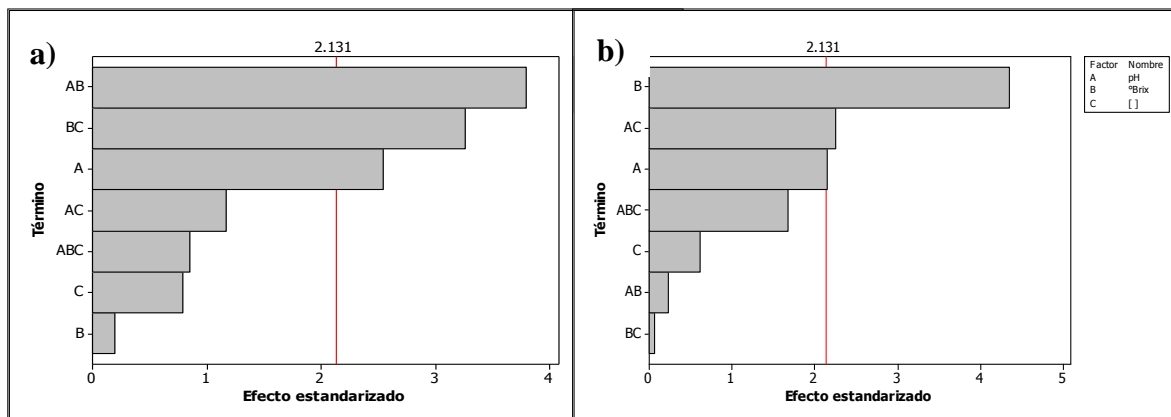


Figura 12. a) Pareto de las soluciones almacenadas a temperatura ambiente (Semana 2). b) Pareto de las soluciones almacenadas a temperatura de refrigeración (semana 4).

A continuación se presentan las gráficas del comportamiento durante el periodo de almacenamiento de las soluciones para entender mejor el comportamiento en cuanto al tamaño de partícula y la distribución del sistema nanoparticulado (Figura 13).

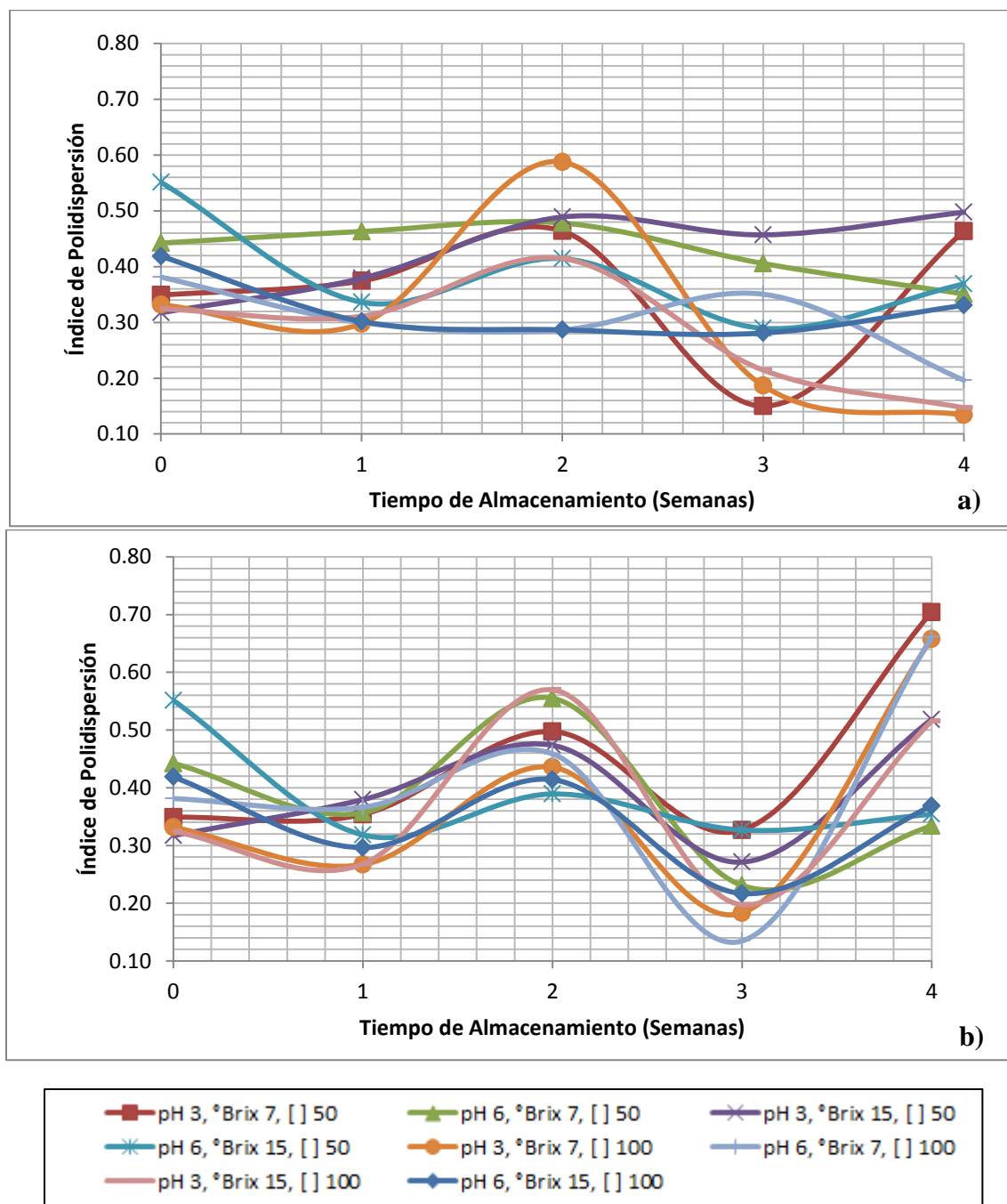


Figura 13. a) IPD de las soluciones almacenadas a temperatura ambiente. b) IPD de las soluciones almacenadas a temperatura de refrigeración.

La Figura 13a muestra que el comportamiento al inicio del almacenamiento de las soluciones modelo es en promedio de 0.40, siendo mayor en las soluciones con un pH de 6 este comportamiento se presentó durante las cuatro semanas de almacenamiento, sin embargo en la semana 2 el aumento de IPD fue mayor para las soluciones con pH de 3, misma semana que se presentó un efecto significativo aumento del tamaño medio de partícula, esto debido a la formación de poblaciones de partículas que tienen diámetros diferentes a las partículas iniciales a causa de los procesos de hidratación, agregación, la desintegración o la degradación de las nanocápsulas (Schaffazick y col., 2003), las soluciones nunca presentaron durante el periodo de almacenamiento un valor de IPD mayor de 0.5, sin embargo para considerarse una excelente homogeneidad tendría que ser el valor de IPD menor a 0.2 como los valores reportados por Grillo y col., (2012) en nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona como agente encapsulante. Con respecto al IPD en la Figura 13b se observa que el comportamiento es similar al de las soluciones almacenadas a temperatura ambiente, sin embargo el efecto que tiene el pH no es estadísticamente significativo sobre esta variable a condiciones de refrigeración ($p > 0.05$), ya que los factores con mayor efecto es la interacción de pH * Brix, teniendo un efecto positivo sobre el IPD a partir de la segunda semana, ya que el valor de IPD no fue mayor de 0.5 en soluciones con un pH de 3 y 15 °Brix, en las soluciones almacenadas a temperatura de refrigeración se observan valores de IPD mayores a las almacenadas a temperatura ambiente, ya que el efecto del azúcar presente en las soluciones como vehículo, hace que la distribución de tamaños sea mayor.

De acuerdo a lo anteriormente mencionado se dice que el tamaño de partícula es afectado por la temperatura de almacenamiento y el pH, siendo más estable en las soluciones a temperatura de refrigeración y pH de 3, ya que el tamaño fue mayor durante el tiempo de almacenamiento y más estable con respecto a temperatura ambiente que empezó a tener cambios notorios en la segunda semana de almacenamiento, con una disminución del tamaño de partícula debido a que aumento la probabilidad de que las nanocápsulas empezaran a liberar el ingrediente activo debido a la desintegración o degradación del polímero encapsulante y comenzaron a reducir su tamaño, mientras que las almacenadas a temperatura de refrigeración el tamaño de partícula empezó a aumentar debido a que los °Brix a esta temperatura formaron una capa que disminuyó la degradación del polímero

encapsulante, este comportamiento se muestra a continuación en la gráfica de distribución de tamaños de partícula (Figura 14) con respecto a la intensidad de partícula.

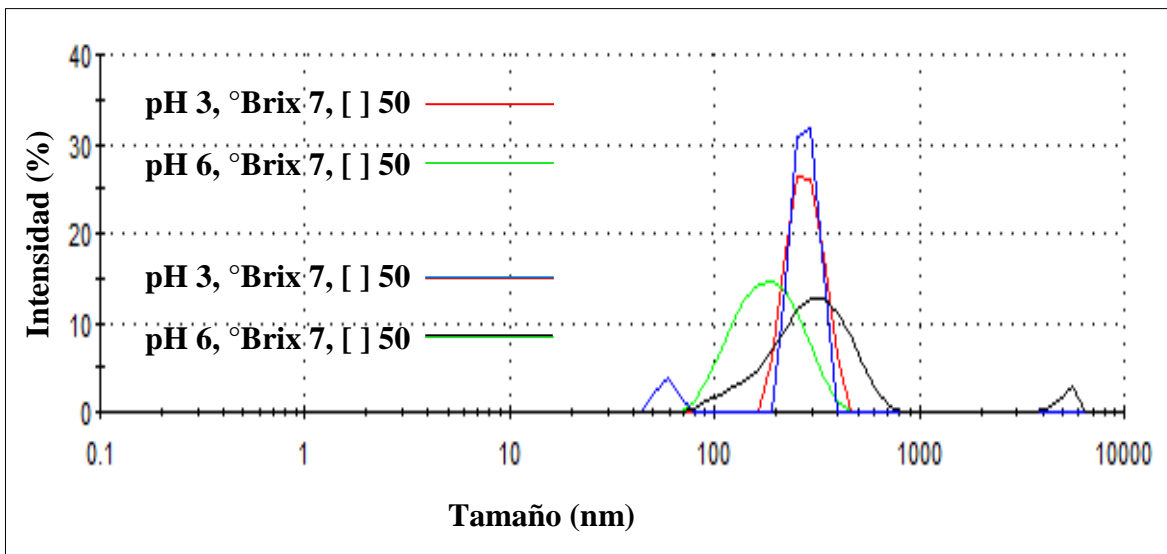


Figura 14. Distribución de tamaño de partícula de las soluciones almacenadas a temperatura ambiente y de refrigeración en la semana cuatro.

3.3.2 Potencial Zeta (ζ).

El potencial zeta es un indicador importante y útil de la carga de la superficie de la partícula, refleja las propiedades químicas superficiales de los coloides en suspensión, la composición química del medio y la forma en que las partículas interactúan entre sí (Heurtault y col., 2003; Lee y Moon, 2004).

Cuanto mayor es el potencial zeta (ζ) aumenta la probabilidad de que el sistema sea más estable debido a que las partículas se repelen entre si y por lo tanto superan la tendencia natural a agregarse por tal motivo la medición del potencial zeta permite realizar predicciones acerca de la estabilidad de almacenamiento en una dispersión coloidal.

El comportamiento de las soluciones iniciales los factores que tienen un efecto significativo son el pH, la concentración; así como la interacción pH * °Brix, siendo el factor de mayor efecto el pH debido a que este determina el grado de disociación de los iones en la solución,

los valores promedio del potencial zeta de las soluciones al inicio con un pH de 3 presentan un valor promedio de -7.32 mV, mientras que las soluciones con un pH de 6 presentan un valor de -17.77 mV, lo cual nos indica que el potencial zeta es más del doble con un pH de 6, junto con el análisis del tamaño de partícula se puede decir que al inicio las soluciones con un pH de 6 son más estables, mientras que con un pH de 4.5 no tiene un efecto significativo. Sin embargo esto no es indicador completamente que el sistema sea estable, bien puede deberse a que el sistema en el plano de cizallamiento, es decir, entre las dos capas Stern y Gouy es altamente electronegativo debido a la carga de la partícula y el medio que tiene más iones negativos y bien en las soluciones de pH de 3 no es una afirmación que las nanopartículas se estén agregando, sino que la capa de hidratación hace que disminuya la distancia de esta doble capa y aumente la distancia entre la superficie de la nanopartículas y el medio, mostrando valores de potencial zeta menores. El valor negativo de los valores de potencial zeta se debe a la densidad de carga negativa de los grupos carboxilato de la cadena principal de la poli- ϵ -caprolactona (Lobato y col., 2013).

Durante el periodo de almacenamiento las soluciones que fueron almacenadas a temperatura ambiente empezaron a tener un cambio significativo del potencial zeta (ζ), que se vio afectado principalmente por el pH y la interacción pH * [Nanocápsulas], lo cual se visualiza en la gráfica de Pareto y caja que se muestran a continuación (Figura 15):

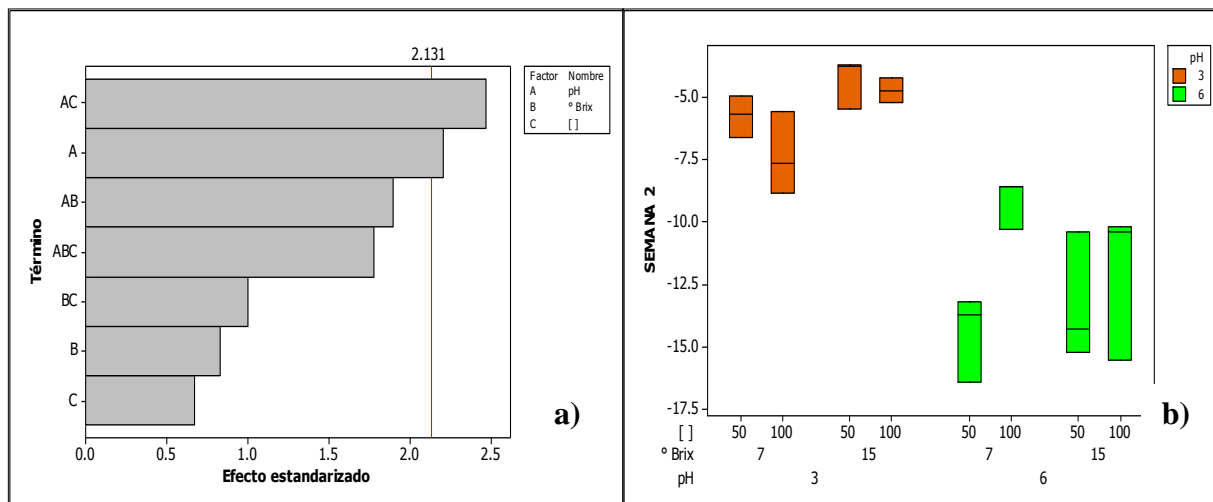


Figura 15. a) Pareto de ζ para las soluciones almacenadas a temperatura ambiente.

b) Gráfica de caja de ζ para las soluciones almacenadas a temperatura ambiente.

En la figura 15b se distingue una disminución del potencial zeta, durante la segunda semana de almacenamiento a temperatura ambiente, siendo los factores de principal efecto los antes mencionados, durante las siguientes semanas las soluciones con un pH de 6 a pesar de que tienen un potencial mayor que el de pH de 3, empezaron a tener variaciones ya que el potencial zeta (ζ) fue más estable en un pH de 3, esto debido a que durante el tiempo de almacenamiento no presento variaciones significativas ($p < 0.05$) solo en la primera y cuarta semana donde aumento, por el contrario las soluciones con un pH de 6 presentaron variaciones mayores, determinando un cambio significativo en la semana 1 y en la semana 3, el valor de potencial zeta en promedio se presentan a continuación en la Tabla 9:

Tabla 9. Potencial zeta (ζ) durante las cuatro semanas de almacenamiento en las soluciones de pH de 3 y 6.

	Inicial	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
pH 3	-7.32	-5.63	-5.00	-5.76	-6.90
pH 6	-17.77	-12.57	-12.74	-17.05	-15.66

Narong y James, (2006) obtuvieron de la misma manera variaciones de pH en suspensiones de levadura observaron que el mayor cambio de potencial zeta se produce en pH de 3 y 4; y en la región entre pH de 4 y 10 el cambio de potencial zeta es mucho menor, por tal motivo no hay un efecto significativo en las soluciones que tienen un pH de 4.5 ya que el comportamiento es similar a las de pH de 6.

Benítez y col.,(2007) reportan valores cercanos a cero con un pH de 2 a pH de 2.5 y 3 la diferencia no es significativa con respecto al potencial zeta sin embargo de obtiene un aumento sobre esta variable en un pH mayor a 4.5 con valores de -20 a -30 mV, sin embargo esto no indica que la estabilidad es mayor en un pH de 6, ya que al contrastarlo con el valor de turbidez el comportamiento es inverso, ya que en pH de 3 se tienen valores bajos de turbidez de 350 en promedio y en pH elevados se observa un valor máximo de 400

aproximadamente, lo que sugiere que aunque la interacción electrostática fue casi eliminada mediante la reducción de ζ , las partículas se mantuvieron estables.

Con respecto a las muestras almacenadas a temperatura de refrigeración las soluciones mostraron mayor estabilidad, ya que el factor que siguió presentando un efecto significativo con respecto al potencial zeta fue el pH como en las muestras iniciales, sin embargo en la segunda semana se observó un efecto significativo sobre el potencial zeta, ya que las soluciones empezaron a ser afectadas por todos los factores, es decir, pH, °Brix y [nanocápsulas], tal como se muestra en la gráfica de Pareto y caja (Figura 16).

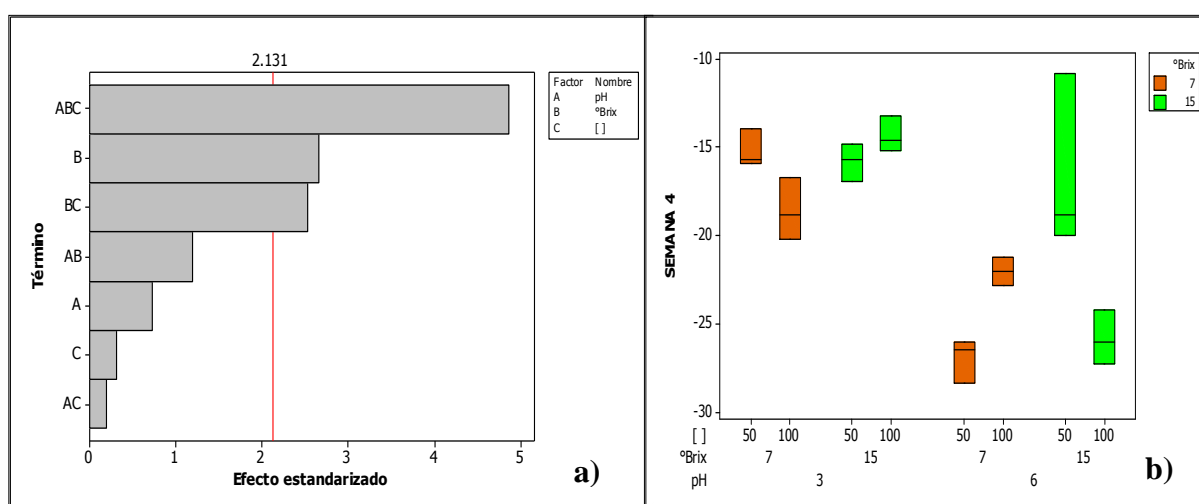


Figura 16. a) Pareto de ζ para las soluciones almacenadas a temperatura de refrigeración. b) Gráfica de caja de ζ para las soluciones almacenadas a temperatura de refrigeración.

El factor que más efecto presenta después de la interacción de los tres factores, son los °Brix siendo este el factor predominante con respecto al cambio del potencial zeta, ya que las soluciones que tienen un valor menor de °Brix, es decir, las soluciones de 7 °Brix tienen un potencial zeta mayor con respecto a las soluciones con °Brix de 15, esto relacionado con los resultados obtenidos de tamaño de partícula en el cual a una concentración menor de °Brix se tiene un mayor tamaño de partícula a consecuencia de la relación directamente proporcional entre la concentración de azúcar y el ζ . A concentraciones bajas la interacción del azúcar y las nanocápsulas juegan un papel importante con respecto a la estabilidad del sistema, con respecto a los valores iniciales

existió un aumento en el potencial zeta en todas las muestras a esta temperatura de almacenamiento.

El comportamiento de las soluciones durante el tiempo de almacenamiento sobre el potencial zeta fue mayor a -5 mV aun en las muestras almacenadas a temperatura ambiente , lo cual nos indica de acuerdo a Heurtault y col., (2003) se admite actualmente que los potencial zeta 30 mV, óptima > 60 mV, como valores necesarios para la estabilización electrostática adecuada, entre los potenciales 5 y 15 mV se encuentran en la región límite de floculación y entre 5 y 3 mV de máxima floculación, sin embargo durante el almacenamiento se obtuvieron valores de ζ cercanos a cero a temperatura ambiente para soluciones con pH de 3 ; pese a estos resultados de forma visual no se distinguió alguna forma de inestabilidad, por tanto esto puede ser atribuido a que el grupo carboxilo de la poli- ϵ -caprolactona se carga negativamente cuando el pH se incrementa por encima de su valor de pKa (constante de disociación). A $\text{pH} < \text{pKa}$, el grupo carboxilo es predominante en su forma protonada (R-COOH) por lo que la carga es cercana a cero, pero a $\text{pH} > \text{pKa}$, el grupo carboxilo está en su forma desprotonada (R - COO⁻) por lo que su carga se vuelve altamente negativa (Rao, J. & McClements, D., 2011). Así mismo los valores de alta negatividad pueden deberse a la hidrolisis que se presenta en la sacarosa presente en el medio a un pH de 6 lo que indica que no existe la capa de hidratación en la superficie de la partícula y la carga negativa del medio.

A continuación se presenta la gráfica de distribución de potencial zeta de las soluciones al final de la experimentación (Figura 17):

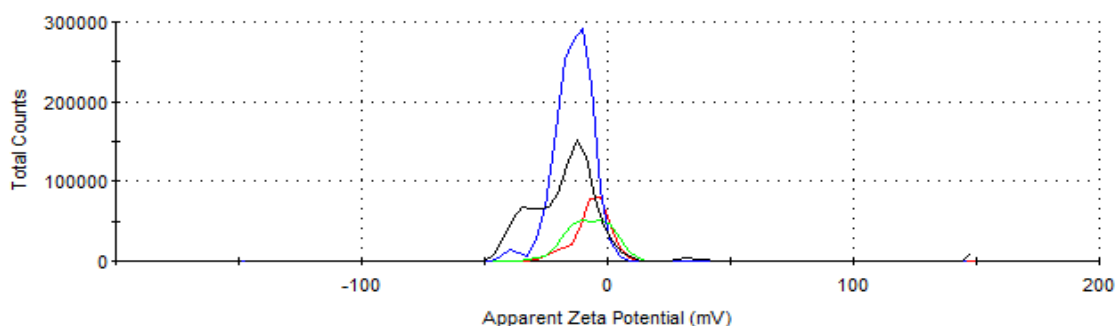


Figura 17. Distribución de potencial zeta (ζ) en la semana cuatro de almacenamiento.

La Figura 17 muestra que se las soluciones que se encuentran más estables debido a que muestra el pico más alto y es una distribución monomodal es la solución almacenada a temperatura ambiente con pH 3, °Brix de 7 y concentración de nanocápsulas de 50 µg/ mL, en tanto que en las demás muestras existen diferentes valores de potencial zeta en la misma solución, lo indica que los °Brix y la temperatura influyen de manera significativa en las muestras cuando estas son almacenadas a temperatura ambiente como refrigeradas.

3.3.3 Turbidez.

La turbidez cuantifica el grado en que la luz viaja a través de una muestra que es dispersada por las partículas en suspensión. La turbidez depende esencialmente de las entidades de tamaño coloidal presente en la fase líquida y en la distribución de tamaño de partícula, por tanto es otra forma de evaluar los cambios en la estabilidad coloidal de las suspensiones (Collado – Fernández y col., 2000; Narong y James, 2006).

En la figura 18 se observa la turbidez obtenida en las soluciones donde queda evidente que el único factor que tuvo influencia significativa sobre la turbidez fue el pH en las muestras que se almacenaron a temperatura ambiente, este mismo comportamiento fue evaluado en sistema coloidal de levadura por Narong y James, (2006), donde determinaron que al aumentar el pH aumentaba el valor de la turbidez, encontrando el mayor valor de turbidez en pH de 7 seguido del efecto de la concentración como se muestra en la figura 18a no se encontró efecto significativo de otra variable en las soluciones almacenadas a esta temperatura. En las muestras que fueron almacenadas a temperatura de refrigeración el comportamiento fue diferente, ya que el factor que tuvo un efecto significativo en las muestras fue la concentración de nanocápsulas en las soluciones iniciales, mientras que en la cuarta semana se determinó un efecto del pH en la turbidez, lo cual de la misma manera en las gráficas de tamaño de partícula y potencial zeta, se tiene un efecto negativo a la estabilidad del sistema.

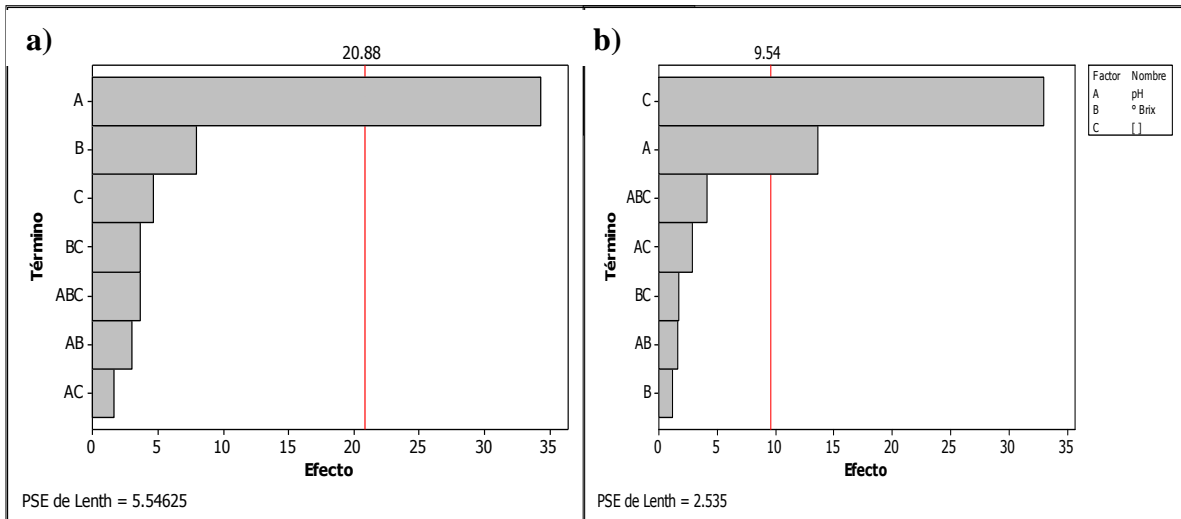
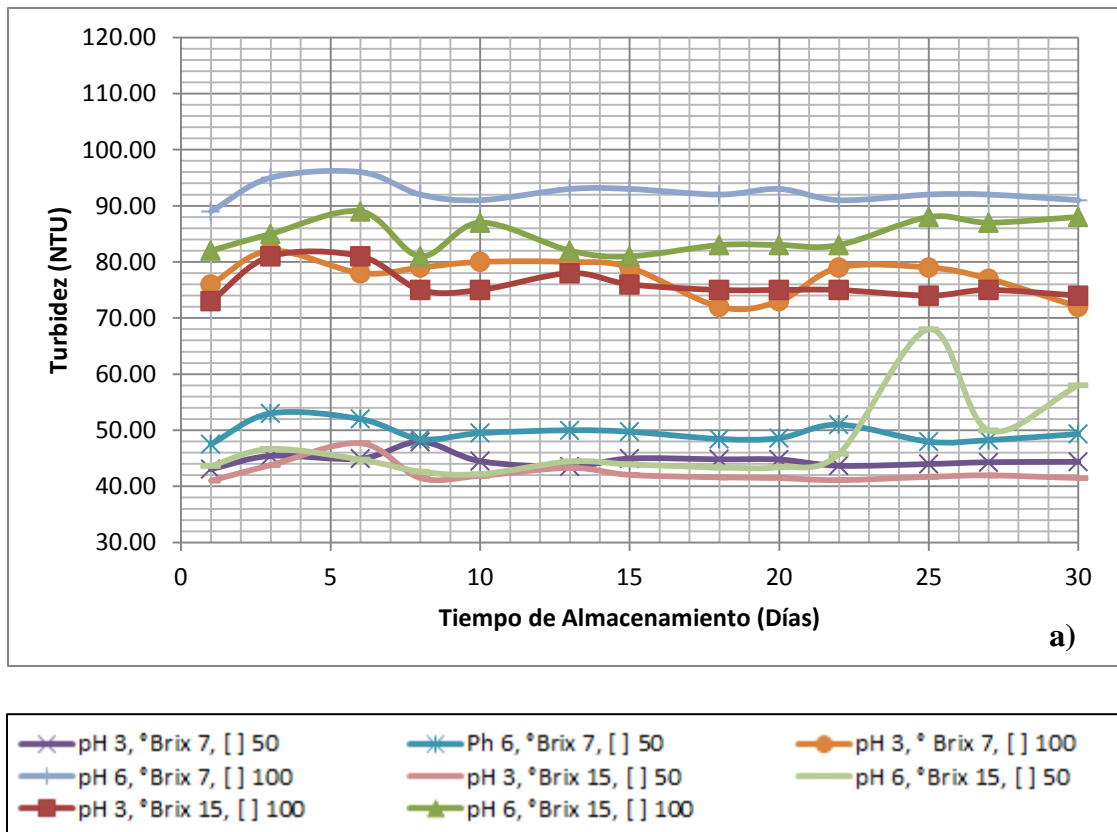


Figura 18. a) Pareto de turbidez para las para las soluciones a) segunda semana de almacenamiento temperatura ambiente. b) Cuarta semana temperatura de refrigeración.



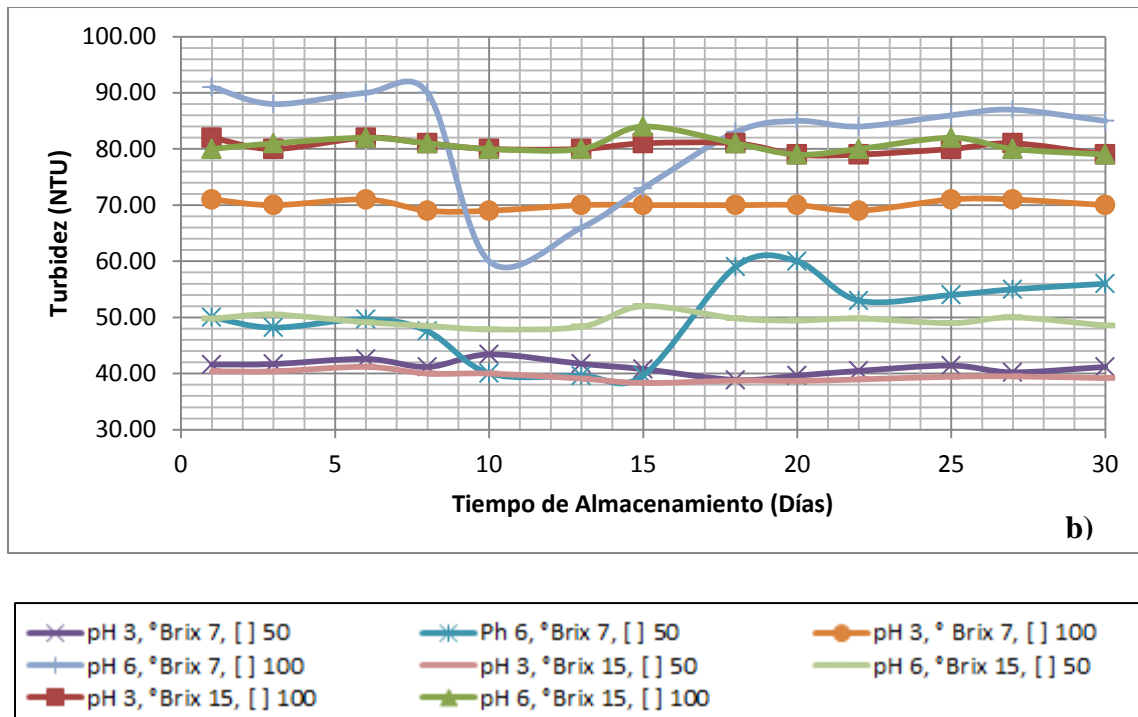


Figura 19. Turbidez de soluciones almacenadas a a) temperatura ambiente y b) refrigeración.

En la Figura 19 a) y b) se muestra el comportamiento de las muestras almacenadas a temperatura ambiente y de refrigeración analizando las soluciones a temperatura ambiente tuvieron un comportamiento estable durante la experimentación, solo las muestras con pH 6, °Brix 7 y concentración de nanocápsulas de 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ muestran un comportamiento inestable durante los días 10 y 20 de almacenamiento, que indica que durante la segunda semana tuvieron una amplia variación similar a lo que se determinó en tamaño de partícula y la disminución del potencial zeta. Las soluciones almacenadas en refrigeración muestran un comportamiento estable con respecto a la turbidez, ya que las muestras con una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se encuentran dentro de los valores 40 – 50 NTU, mientras que las muestras con una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tienen valores más elevados que se encuentran dentro 70 – 98 NTU lo cual establece el efecto que tiene la concentración de nanocápsulas en la turbidez de las soluciones.

El comportamiento de la turbidez y el potencial zeta es directamente proporcional ya que al aumentar la turbidez, es decir en pH de 6 y concentraciones de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, tenemos valores de potencial zeta mayores con respecto al pH de 3 que tiene un valor de turbidez menor, esto puede asociarse a los cambios de distribución de tamaño de partícula, ya que del mismo modo tenemos un aumento en el IPD en un pH de 6, por tanto la estabilidad a pH de 6 es menor a pesar de tener un potencial zeta mayor a -10 mV, sin embargo esto puede atribuirse a aglomeraciones parciales presentes en las soluciones tal como lo reporta Narong y James, (2006).

3.3.3 Color.

El color es una característica importante de los alimentos desde el punto de vista del consumidor. El valor de L^* es una medida de la luminosidad y varía de 0 (negro) a 100 (blanco), el valor a^* varía de -100 (verde) a +100 (rojo); y el valor b^* varía de -100 (azul) a +100 (amarillo). Cuando los valores de L^* , a^* y b^* aumentan, el color se vuelve más saturado o cromático, mientras que, para los colores neutros (blanco, gris o negro), estos valores se acercan a cero (Baccouche y col., 2013).

Los resultados obtenidos de los valores de L^* , a^* y b^* se muestran en las Figuras 20, 21 y 22 respectivamente:

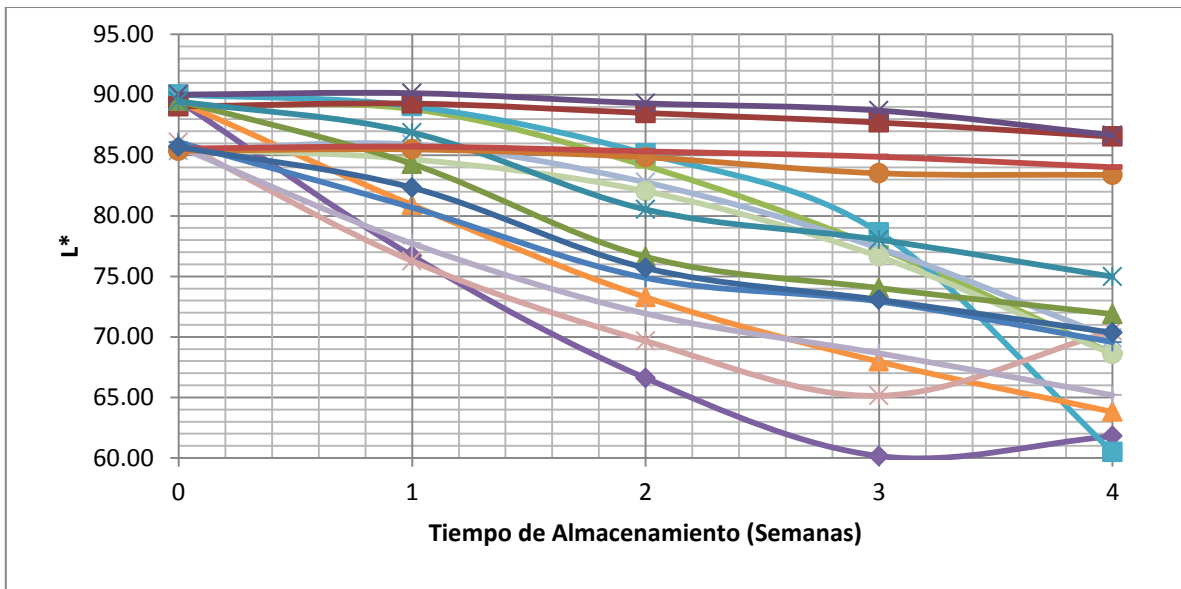


Figura 20. Luminosidad L^* de soluciones almacenadas a temperatura ambiente y refrigeración

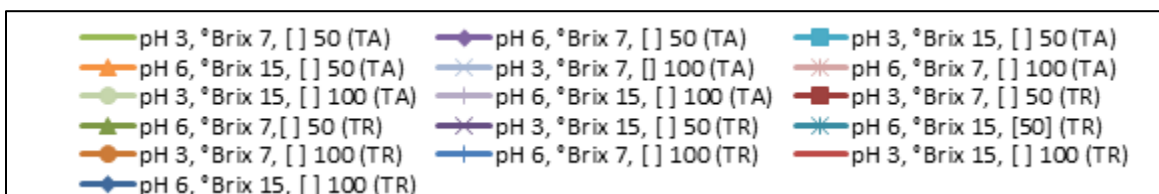
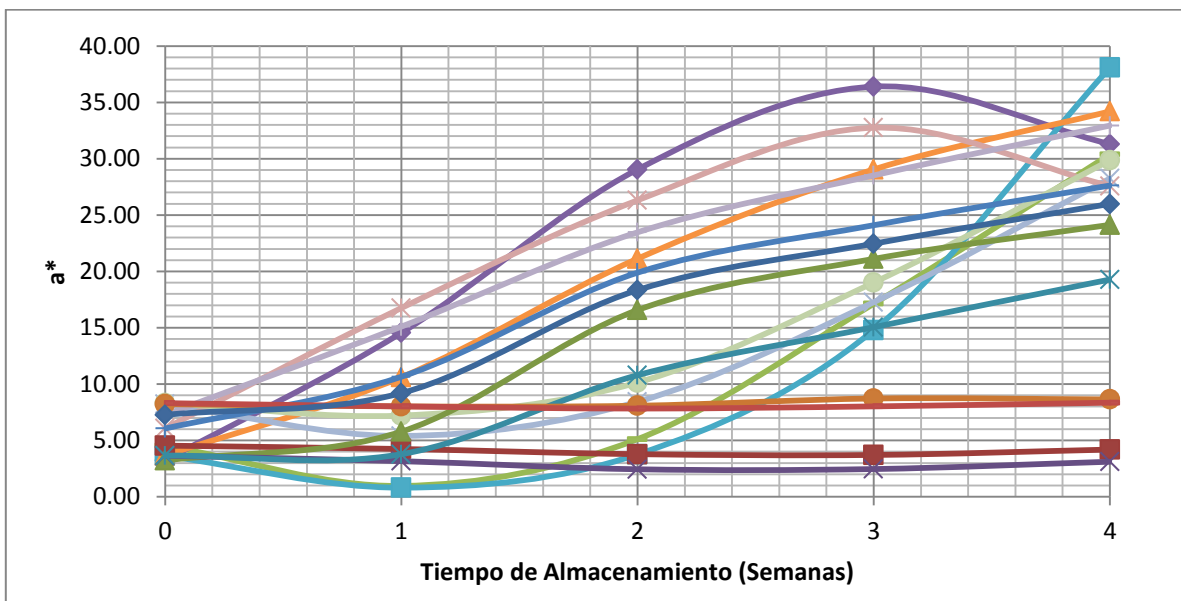


Figura 21. Coordenadas a^* de soluciones almacenadas a temperatura ambiente y refrigeración.

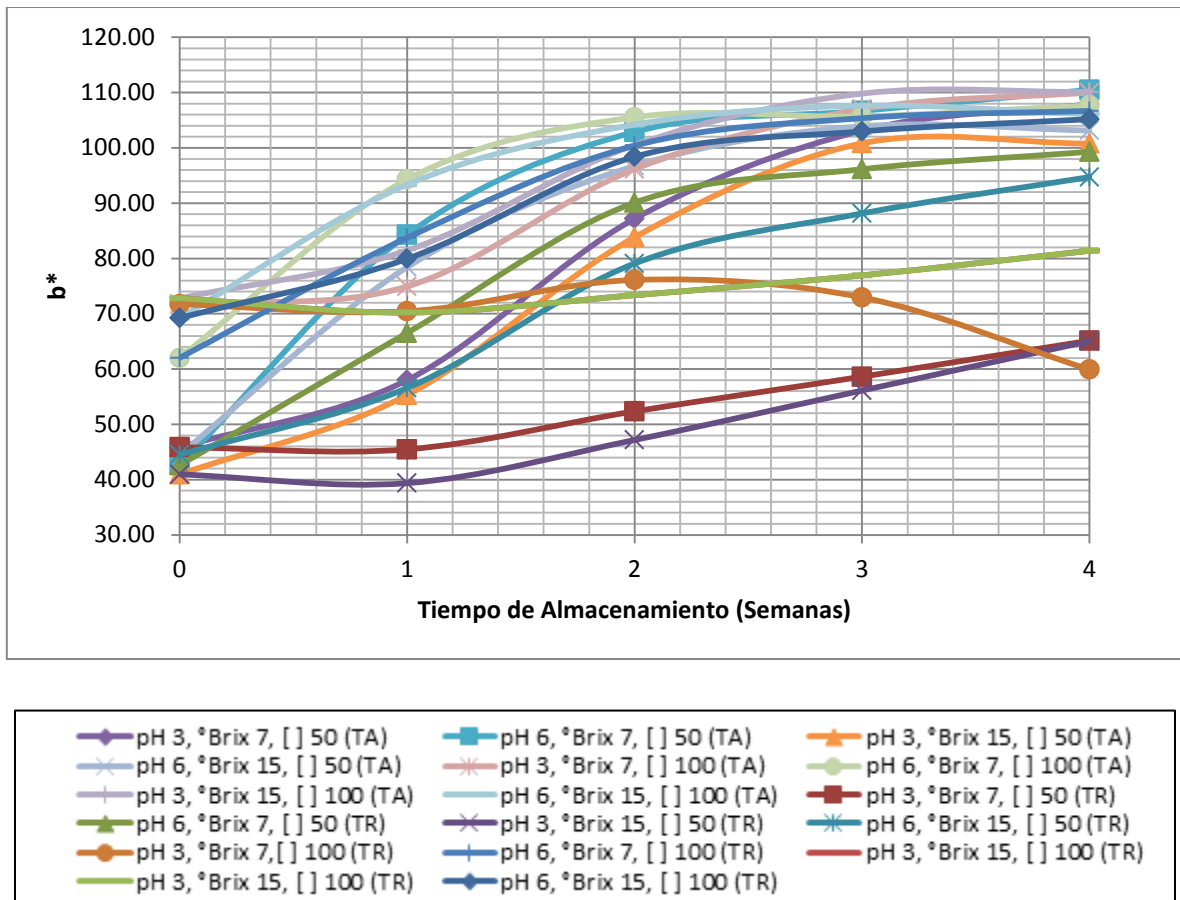


Figura 22. Coordenadas b* de soluciones almacenadas a temperatura ambiente y refrigeración.

La luminosidad L* de las soluciones almacenadas a temperatura ambiente a partir de la primer semana tienen un cambio significativo con respecto a los valores iniciales, siendo el factor que mayor influencia presenta sobre esta variable el pH, ya que valores de pH de 3 tenemos mayor luminosidad que las soluciones con pH de 6, sin embargo en la cuarta semana el comportamiento es el mismo en todas las soluciones, los valores en promedio de luminosidad son aproximadamente de 90 a 60, lo que indica que las muestras fueron oscureciendo, con respecto a las iniciales debido a la liberación de β -caroteno por efecto de la disociación de iones y la reacción de oscurecimiento debido a la hidrólisis del azúcar. En las muestras almacenadas en refrigeración se tiene un comportamiento más estable, teniendo en cuenta que las soluciones con un pH de 6 la tendencia es de disminución del valor de luminosidad, lo cual quiere decir las muestras empezaron a oscurecer a partir de la

semana dos pero presentando valores superiores (90 a 70) respecto a las almacenadas a temperatura ambiente. Las soluciones con un pH de 3 presentan pocas variaciones con valores de 90 a 84 lo cual significa que el color durante el periodo de almacenamiento fue más luminoso o claro. En las Figuras 21 y 22 se presentan las gráficas de a^* y b^* que presentan valores positivos lo cual nos indica que se encuentra entre los colores amarillo-rojo, se tiene que los valores de a^* de las soluciones almacenadas a temperatura ambiente tienden a aumentar significativamente en las soluciones con un pH de 6 a partir de la primera semana (5 a 15) , mientras que con un pH de 3 es a partir de la tercera semana donde se determina un aumento sobre esta variable (5 a 17). Los valores de b^* en las soluciones tienden a aumentar por efecto de la aglomeración de polímero e interacción de polisacáridos de alto peso molecular con respecto al grado de disociación en el medio acuoso. Las soluciones con mayor diferencia son las de pH 3, °Brix 7 y 15, con una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ que durante las primeras dos semanas presentaron valores inferiores que las demás soluciones. Los valores de a^* y b^* fueron aumentando de color acercándose a colores naranja-rojos debido a la liberación de antioxidante en las soluciones de pH de 6 a temperatura ambiente y de refrigeración en menor grado, en las soluciones de pH de 3 almacenadas a temperatura de refrigeración no se encontró diferencia estadísticamente significativa de cambios de color durante el tiempo de almacenamiento, con valores entre 5 y 10.

En la Figura 23, se observan posicionadas las coordenadas de los valores a^* y b^* ejemplificando las soluciones iniciales y las de pH de 3 y 6 finales, con un punto azul se indican las soluciones iniciales, el punto color rojo intenso las soluciones con un pH de 3 almacenadas a temperatura de refrigeración la cual indica que el color no tuvo una variación significativa y el punto rojo claro indica las soluciones de pH de 6 almacenadas a temperatura de refrigeración en la cual se distingue que la variación fue mayor que las de pH de 3; sin embargo el color no llega a los tonos rojizo en la última semana de almacenamiento tal como se contrasta en las soluciones de pH de 3 y 6 almacenadas a temperatura ambiente que en la última semana llegan a los colores naranja-rojizos, siendo más notorio en pH de 6.

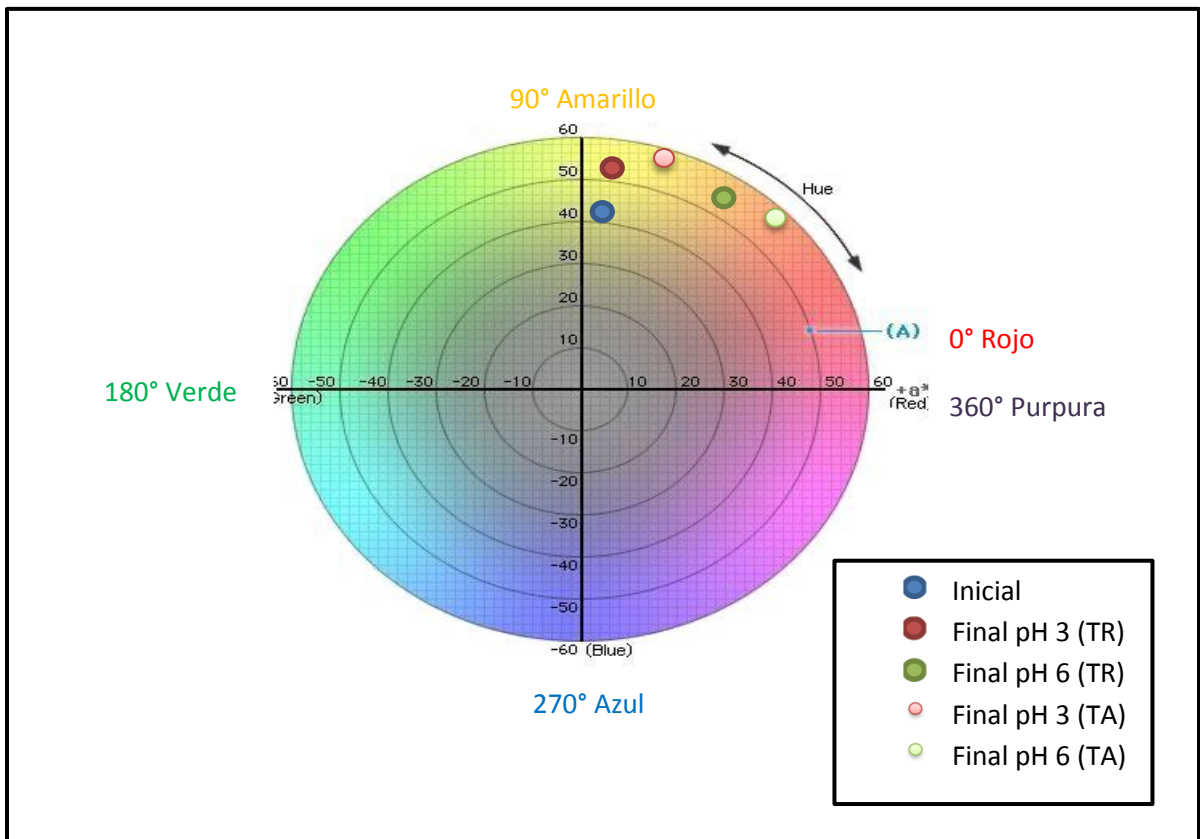


Figura 23. Espacio de color CIELAB*de soluciones iniciales y finales

a) ΔE

Con respecto a los valores obtenidos de ΔE (Figura 24) que es la variación de color, durante la primera semana no se presentó algún efecto significativo sobre los cambios totales de color lo cual indica que la variación fue mínima con respecto a las siguientes semanas ($p < 0.05$), en promedio el valor de ΔE 10.10 para un pH de 3 y de 31.22 para un pH de 6, en la semana dos se observó una variación del color significativa en las muestras almacenadas a temperatura ambiente.

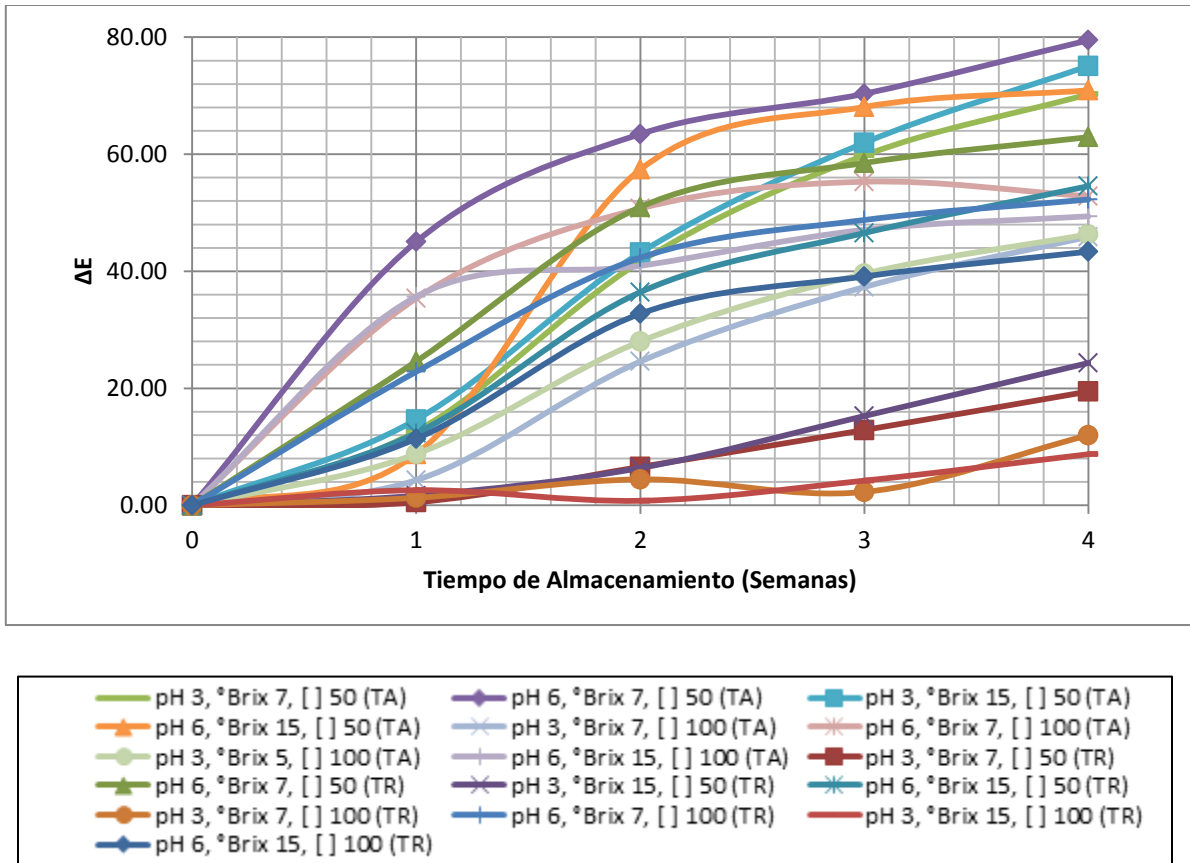


Figura 24. ΔE para las soluciones almacenadas a temperatura ambiente y refrigeración.

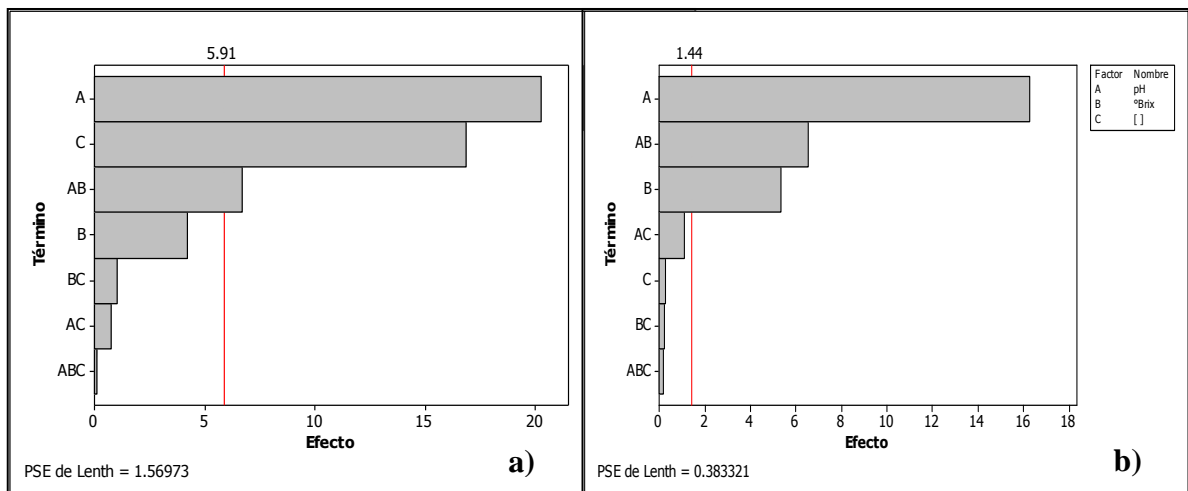


Figura 25. a) Pareto de ΔE para las soluciones almacenadas a temperatura ambiente segunda semana. b) Pareto de ΔE para las soluciones almacenadas en temperatura de refrigeración primer semana.

La Figura 25 muestra que al transcurrir la primera semana las soluciones almacenadas a temperatura ambiente no tuvieron variación significativa ($p > 0.05$) donde el factor que tuvo mayor influencia sobre la variación total de color fue el pH, obteniendo variaciones más altas con un pH de 6 con valores mayores a 35 esto debido principalmente por los compuestos responsables del cambio de color durante el almacenamiento de las bebidas debido a la reacción de Maillard, caramelización y reducción del ácido ascórbico. El azúcar existente en la pulpa de las bebidas, así como la adición de azúcar se puede hidrolizar en presencia de un ácido para producir azúcares reductores (glucosa y fructosa) requeridos para las reacciones de Maillard (Baccouche y col., 2013); en la semana dos se distingue un comportamiento similar en la mayoría de las muestras siendo aún significativo el efecto del pH y la concentración de nanocápsulas, esto puede explicarse debido a la hidrólisis del azúcar, sin embargo en los resultados presentados de tamaño de partícula, IPD, potencial zeta y turbidez durante esta semana revelan un efecto significativo sobre estas variables, por lo tanto esta variación de color puede deberse del mismo modo a la ruptura de la estructura capsular y que a un pH de 6 existe la liberación del ingrediente activo (β -caroteno). Las muestras almacenadas a temperatura de refrigeración presentaron una variación significativa siendo las variables que más efecto tuvieron en el cambio el pH y los °Brix como términos lineales y de interacción °Brix* pH. Los valores de ΔE es menor con respecto a las almacenadas a temperatura ambiente ya que el factor que tienen un efecto significativo en estas muestras es el pH, en las muestras con un pH de 3 los valores se encuentran entre 0.53 - 24.33, mientras que para un pH de 6 se tiene una diferencia de 11.39 - 62.92, sin embargo en las muestras con un pH de 6 la tendencia a aumentar la variación de color es mayor con respecto de las soluciones con pH 3. Así mismo a esta temperatura de almacenamiento (refrigeración) otro factor que tiene un efecto significativo son los °Brix a partir de la primera semana, dándole mayor estabilidad al sistema de acuerdo a lo mencionado anteriormente en tamaño de partícula, IPD y potencial zeta, formando una película protectora a las nanocápsulas y así mismo evitando la liberación del ingrediente activo.

b) °Hue

El °Hue es el atributo según el cual los colores se definen generalmente como rojizo, verdoso, etc., Se utiliza para definir la diferencia de un color con referencia a un color gris con la misma ligereza (Fernández- Vázquez y col., 2013). Al inicio las soluciones se ven afectadas por el pH y la concentración de nanocápsulas presentes en la solución, este efecto se muestra en la Figura 23, mientras que en las siguientes semanas el único efecto significativo con una P (<0.05) es el pH, las soluciones con un pH de 3 muestran un comportamiento que tiende a disminuir del mismo modo que las de pH de 6, a partir de la semana 3 estas soluciones indican un aumento en el valor del ángulo °Hue.

En la Figura 26 se presentó una variación mayor en la solución con un pH de 6, °Brix 7 y concentración de 50 µg/mL a temperatura ambiente, ya que en la tercera semana presenta el valor más bajo de °Hue de 67.85, mientras que las soluciones con un valor mayor de °Hue fueron en la semana uno fueron las soluciones con un pH de 3, °Brix de 7 y 15 y una concentración de 50 µg/mL, sin embargo a partir de la semana dos los valores de °Hue de igual manera empezaron a disminuir. La tendencia de las soluciones almacenadas a temperatura ambiente fue a disminuir con valores aproximadamente de 90 a 67 de °Hue, mientras que las almacenadas a temperatura de refrigeración presentan una tendencia más estable con valores aproximadamente en promedio de 87 a 76. De acuerdo a los resultados obtenidos por Fernández- Vázquez y col., (2013) en jugos de naranja con valores de 77.6 (más rojizo) y 83.7 (más amarillas) en los jugos de naranja, los datos obtenidos son similares, ya que en las soluciones almacenadas partieron de un tono amarillento y al disminuir los valores de °Hue las soluciones fueron cambiando a un tono naranja- rojizo, es decir que las muestras almacenadas a temperatura ambiente a partir de la semana dos empezaron a tener la tonalidad naranja-rojiza, mientras que las almacenadas a temperatura de refrigeración a partir de la semana tres las muestras con un pH de 6, °Brix de 7 y 15 con una concentración de 50 µg/ mL empezaron a tener esta tonalidad rojiza; las soluciones con un pH de 3 el tono amarillento permaneció a esta temperatura de almacenamiento (refrigeración), este cambio se debe a la liberación de β-caroteno, ya que en pH de 6 la tonalidad la tendencia es a tonos naranja-rojizos, mientras que las soluciones con un pH de 3 el color fue constate, del mismo modo observamos este comportamiento en los ΔE de las soluciones donde existió una mayor variación de color en pH de 6 a temperatura ambiente;

valores de tonalidad en jugos de naranja en el trabajo de Tiwari y col., (2008) reporta valores de °Hue de 84.8 ± 0.09 en promedio lo cual indica que las soluciones con pH 3, no afecta significativamente el valor de tonalidad de los jugos al adicionar las nanocápsulas de β -caroteno a temperatura de refrigeración.

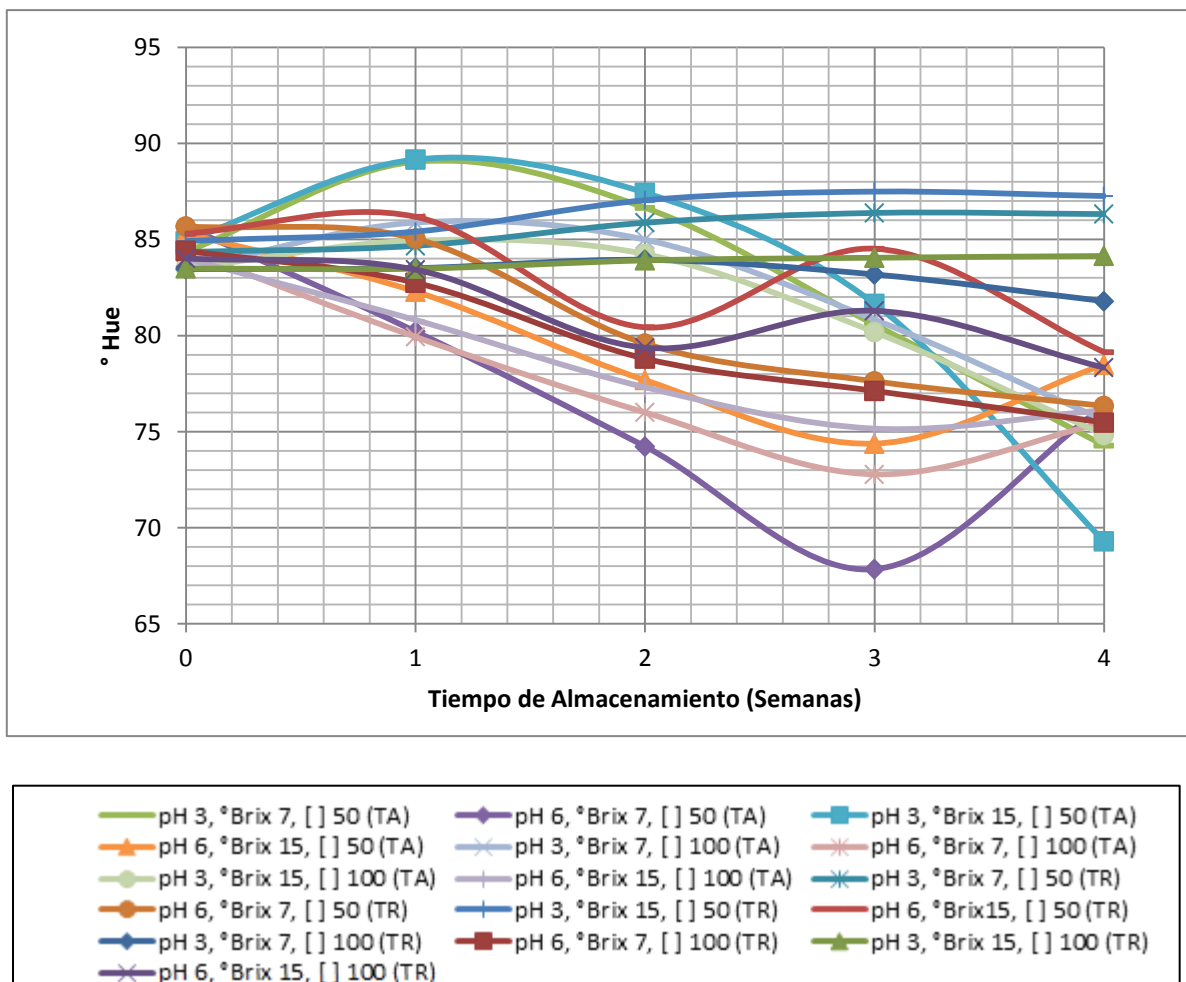


Figura 26 . °Hue para las soluciones almacenadas a temperatura ambiente y de refrigeración.

c) Cromaticidad.

Croma se utiliza para determinar el grado de diferencia de un color en comparación con un color gris con la misma ligereza, y se considera el atributo cuantitativo de cromatismo, e otras palabras indican la saturación del color. (Fernández- Vázquez y col., 2013; Meléndez-Martínez y col., 2010).

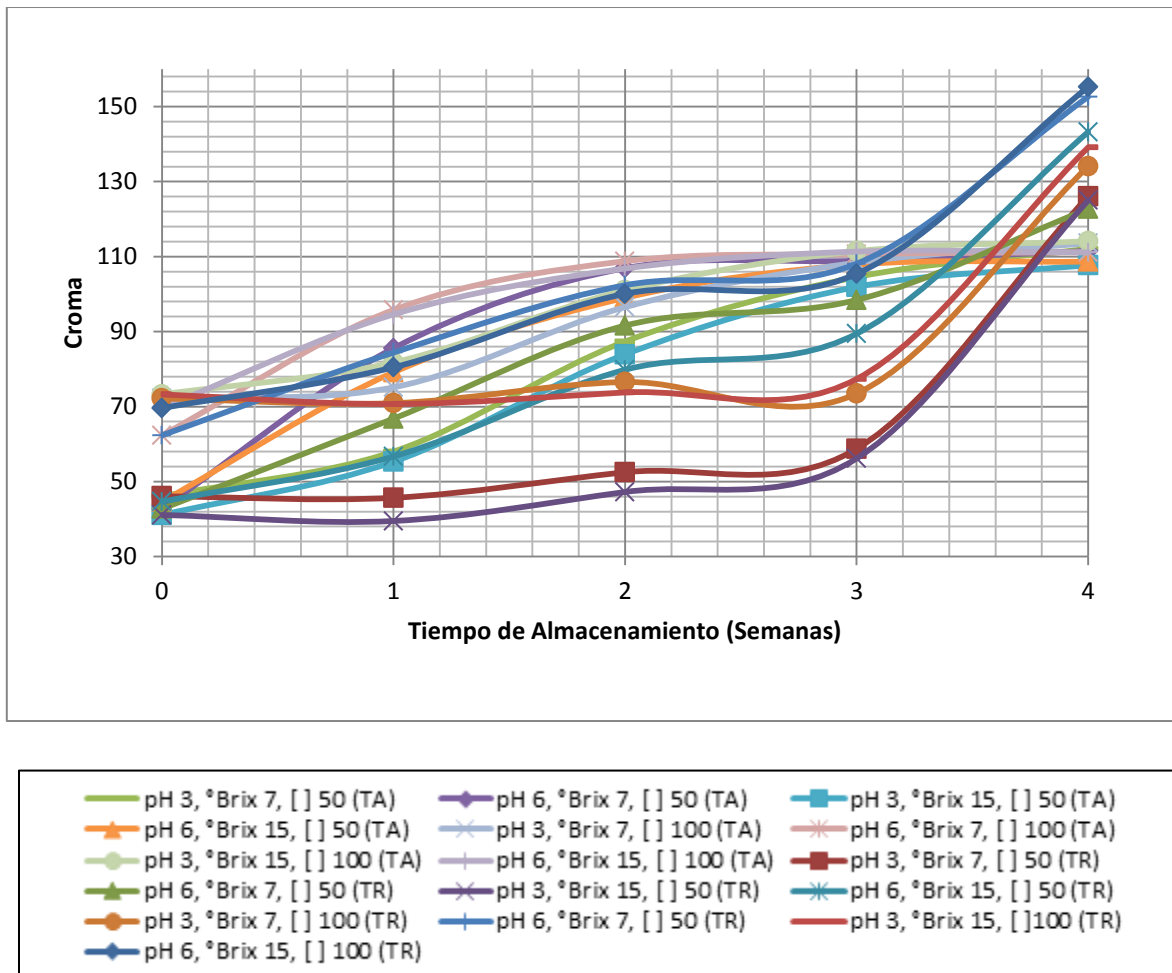


Figura 27. Croma para las soluciones almacenadas a temperatura ambiente y de refrigeración.

En la Figura 27 se analizan las soluciones almacenadas a temperatura ambiente y refrigeración; respecto al valor Croma a partir de la semana uno y dos aumento la intensidad del color en las muestras siendo más notorio en las soluciones con un pH de 6 y siendo menor la intensidad en las soluciones con pH de 3. Después de la semana dos se observa que el comportamiento es estable, es decir, ya no existió un cambio significativo con respecto a la intensidad de color, ya que las muestras permanecieron sin ningún cambio significativo en la variación del color y °Hue; en las soluciones almacenadas a temperatura de refrigeración se observa que la tendencia es constante durante las dos primeras semanas en las soluciones de pH de 3 principalmente, a partir de la semana dos existe un efecto significativo sobre la intensidad de color en las soluciones, cabe mencionar que presentaron

un valor de °Hue aproximado a tonalidad amarillenta no presentaron una tonalidad naranja-rojiza hasta la semana cuatro que es donde se observa los valores más altos de croma.

El comportamiento es similar a los valores de °Hue ya que el factor que tiene un efecto significativo sobre este valor es el pH seguido de la concentración de nanocápsulas ya que durante la primera semana se empezó a desarrollar un efecto significativo sobre la intensidad del color y contrastando con el valor de °Hue a partir de esta semana la tonalidad empezó a cambiar con tendencia a tonos naranjas-rojizos, siendo mayor en las soluciones con un pH de 6 y concentraciones de 100, esto debido a la liberación del ingrediente activo a esta condición de pH y la concentración de nanocápsulas es mayor.

Las soluciones almacenadas a temperatura ambiente durante las primeras semanas tienen un comportamiento no deseado, ya que con respecto a lo anterior mencionado sobre la variación de color y °Hue, existe una mayor liberación del ingrediente activo, así como la hidrólisis del azúcar presente mencionada con anterioridad que intensifica el color de las soluciones, en contraste con las soluciones almacenadas a temperatura de refrigeración que durante las primeras semanas el valor de la intensidad de color es menor esto debido a que la liberación del ingrediente activo fue menor.

3.3.5 β -caroteno encapsulado residual.

Es un parámetro clave para los sistemas de nanoencapsulación. Está influenciado no sólo por los procesos de encapsulación sino también la naturaleza química del ingrediente activo como los polímeros de encapsulación, es decir, composición y peso molecular (Cheng y col., 2010).

Durante la primera semana de almacenamiento a temperatura ambiente el principal factor que afectó significativamente a las soluciones fue el pH en el cual observamos que los que tienen mayor porcentaje de eficiencia son las muestras con un pH de 3, ya que las concentraciones presentes de β -caroteno fueron de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aproximadamente y en la primera semana disminuyó la concentración, lo cual quiere decir que existió pérdida del

ingrediente activo debido a las condiciones almacenadas, sin embargo en las soluciones almacenadas a pH de 6 se observan valores bajos de eficiencia en la primer semana de almacenamiento cerca del 60%, esto es debido a que la concentración fue aumentando, lo cual nos indica que el ingrediente activo empezó a liberarse a partir de la primera semana en pH de 6, con mayor rapidez que con un pH de 3.

Este comportamiento lo podemos observar en las gráficas de Pareto Figura 28, donde se observa que el factor que mayor influencia tiene sobre la eficiencia de encapsulación es el pH, en pH menores observamos una mayor eficiencia con respecto a un pH de 6 en las soluciones a temperatura ambiente y en las soluciones almacenadas en refrigeración es la interacción pH* °Brix.

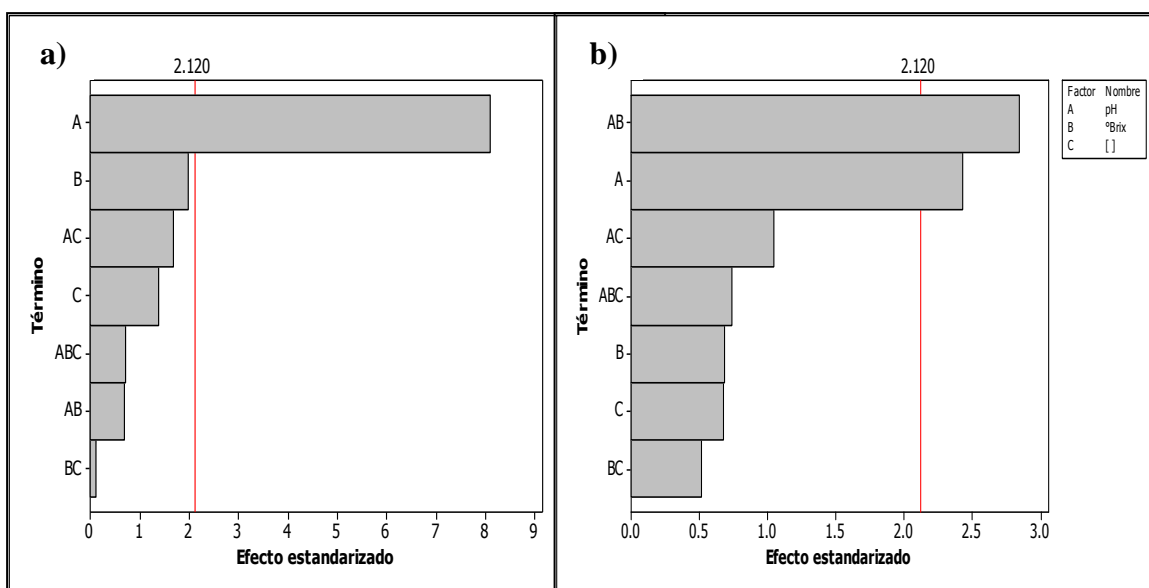


Figura 28. a) Pareto de las soluciones en la primer semana almacenadas a temperatura ambiente) Pareto de las soluciones en la primer semana almacenadas en temperatura de refrigeración.

En la Figura 29 se observa la tendencia de las soluciones con respecto al β -caroteno encapsulado residual durante el periodo de almacenamiento a temperatura ambiente y en refrigeración, en la cual se distingue el comportamiento antes mencionado durante la primera semana de almacenamiento que fue donde se observa un porcentaje mayor de eficiencia lo cual quiere decir que la concentración disminuyo, este es un indicativo de que

no se está liberando el ingrediente activo en pH de 3 ya que a estas condiciones lo que ocurrió en la semana uno fue una degradación del β -caroteno debido a las condiciones de almacenamiento, posteriormente a esta semana el porcentaje de eficiencia empezó a disminuir, es decir, la liberación del β -caroteno fue influenciada por el pH siendo mayor la liberación en las soluciones pH de 6, contrastando con los valores de ΔE , $^{\circ}$ Hue y croma donde a partir de la primera semana se tiene un aumento en estos valores lo cual indica un oscurecimiento de las soluciones así como tonos naranjas—rojizos, es debido a la liberación del β -caroteno que iba aumentando en las soluciones provocando una coloración distinta a la inicial, que fue provocado por la degradación del polímero. Sin embargo a partir de la semana dos se tiene una disminución del porcentaje de eficiencia en los dos casos lo cual indica una liberación rápida obteniendo valores de eficiencia a partir de la semana tres menores a 40%.

Con respecto a las muestras almacenadas a temperatura de refrigeración se obtuvo un efecto significativo ($p < 0.05$) en la semana uno, esto debido a dos factores que se ven involucrados de manera positiva en el comportamiento sobre los valores de eficiencia debido a la interacción de $\text{pH} * ^{\circ}\text{Brix}$, ya que como se mencionó en los análisis anteriores este factor es un efecto positivo hacia la estabilidad de las soluciones con respecto a turbidez y color, debido a la capa de hidratación que se ha formado debido a los enlaces de hidrogeno entre el hidrogeno del agua y los grupos ^-OH del polisacárido, los $^{\circ}\text{Brix}$ no tienen un efecto significativo en términos lineales, ya que no es significativa la concentración de azúcar presente en las soluciones. El comportamiento del valor de eficiencia se mantiene constante durante las primeras semanas, en la semana uno y dos los valores se encuentran por arriba del 100% en las dos condiciones de pH, lo cual indica que no hubo liberación de β -caroteno durante las primeras semanas, sin embargo a partir de la semana tres se observa una disminución de la eficiencia de entre 80 a 100% en pH de 3 y en pH de 6 de 60% aproximadamente, aunque es evidente el aumento de la concentración de β -caroteno (menores eficiencias), el valor de eficiencia fue mayor a 50% en contraste con las muestras almacenadas a temperatura ambiente que los valores llegaron a 20%. Durante las primeras tres semanas el valor de eficiencia de encapsulación coincide con los valores reportados por Quintanar- Guerrero y col., 1998.

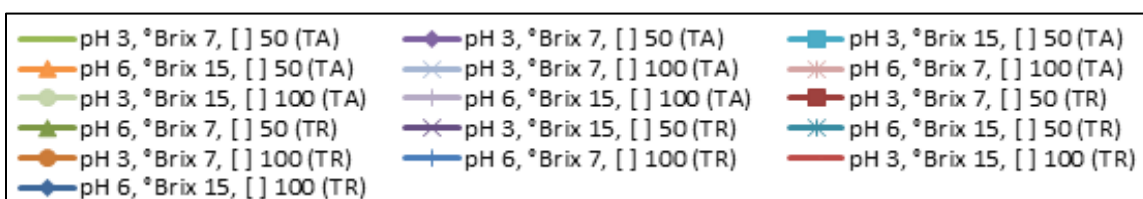
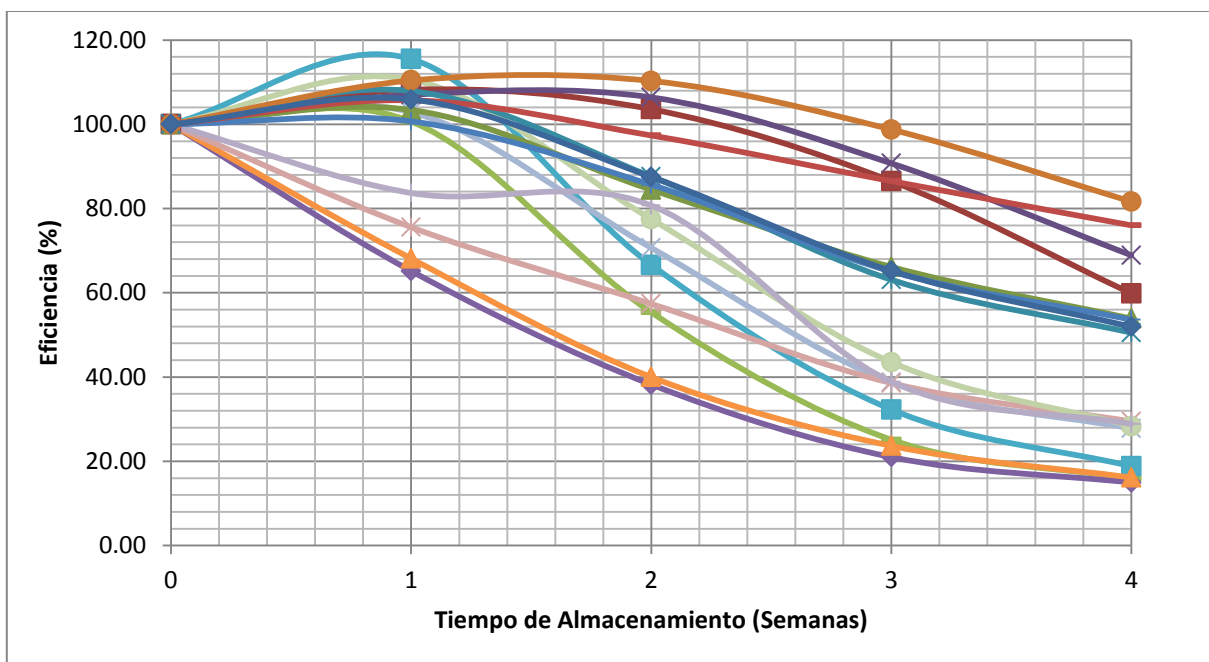


Figura 29. Eficiencia para las soluciones almacenadas a temperatura ambiente y de refrigeración.

3.3.6 Contraste del comportamiento de β -caroteno nanoencapsulado en jugo natural

Los valores de pH, °Brix y concentración de nanocápsulas en la elaboración de jugo natural de naranja y durante su almacenamiento se observan en la Tabla 10:

Tabla 10. Características físicas iniciales de los jugos sometidos a almacenamiento refrigerado y a temperatura ambiente

pH	3.7 – 3.9
°Brix	10 -12
[] µg/ mL	100

Los valores iniciales de pH, °Brix y concentración de nanocápsulas fueron evaluados al principio de la experimentación tal como lo muestra la tabla 10, estos valores no fueron monitoreados debido a que no se observó un cambio significativo en pH por debajo de 6, ya que a pH de 6 existió una disminución de pH esta disminución puede ir relacionada como se mencionó con anterioridad con la degradación del polímero o de otro ingrediente, es normal para este tipo de formulación por la liberación del monómero de poliéster durante la hidrólisis de la poli-ε-caprolactona (Kishore y col., 2011; Mallin, 1996).

3.3.6.1 Tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta.

En el sistema de nanoemulsión predominan las fuerzas atractivas en el sistema debido al pH del medio las nanogotas tendieron a aglomerarse desde el inicio de la experimentación, ya que este es su comportamiento común y permanecen como entidades individuales cuando las interacciones repulsivas predominan (McClements, 2005), mientras que la interacción entre dos gotas de aceite recubiertas por una capa de moléculas de polímero cargadas tendría una serie de valores máximos y mínimos en ciertas separaciones, como barreras de energía de corto y largo alcance.

En la Figura 30 se observa el comportamiento de los jugos naturales de jugo de naranja los cuales fueron almacenados en las mismas condiciones de almacenamiento que las soluciones modelo, se distingue que los jugos con nanoemulsión son los que presentan tamaños de partícula más pequeños debido a que forman una capa protectora que rodea las nanogotas evitando así aglomeraciones lo que provoca que el tamaño de partícula sea

menor incluso al jugo de naranja sin ninguna adición de β -caroteno. El jugo natural en temperatura ambiente presento el mismo comportamiento durante las cuatro semanas de almacenamiento cercanos a 900-1000 nm debido a que la estabilidad es menor ya que se forman agregados en el sistema debido a las pectinas presentes a causa de las naranjas, sin embargo a temperatura de refrigeración se observa más estable ya que el tamaño de partícula es de aproximadamente de 600 nm, un comportamiento similar se observa en los jugos con β -caroteno hidrosoluble debido a su estructura. Mientras que las nanocápsulas no muestran un efecto significativo, ya que en promedio se encuentra dentro del comportamiento de un jugo natural, no forma agregados en los jugos solo en la semana cuatro, lo cual es favorable y una ventaja de las nanocápsulas

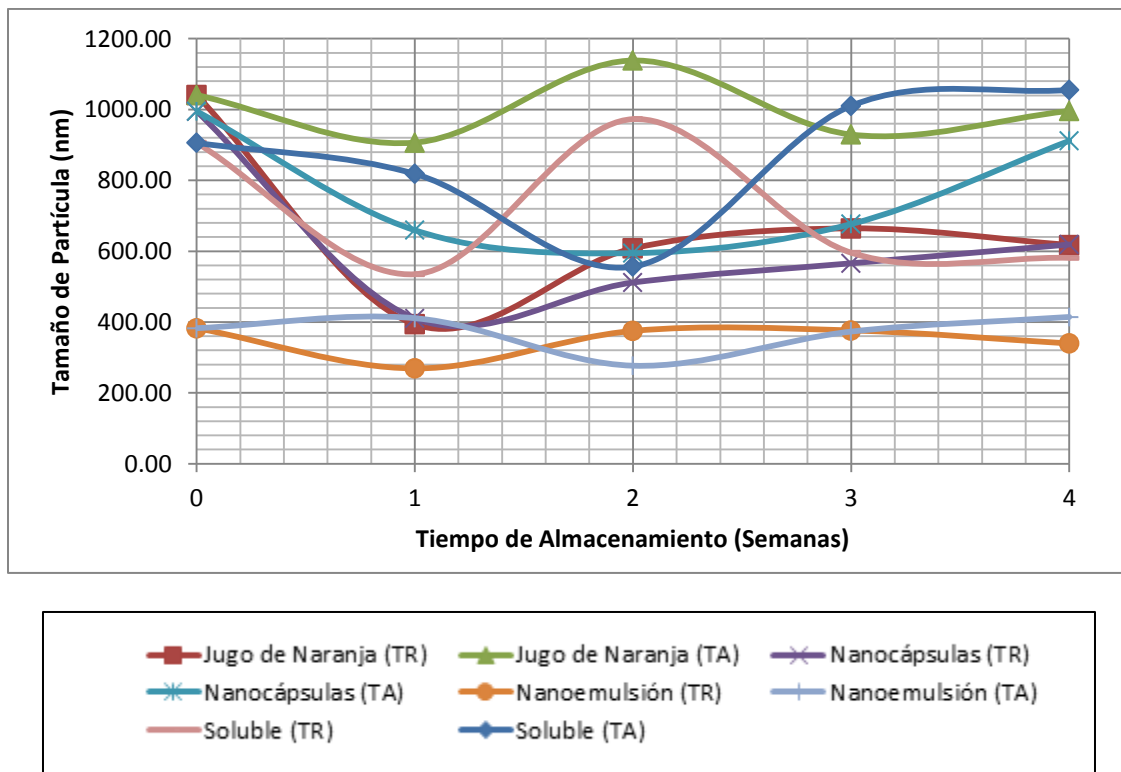


Figura 30. Tamaño de partícula en jugos de naranja almacenados a temperatura ambiente y refrigeración.

De acuerdo al índice de polidispersión en la Figura 31 se muestra que los valores de los jugos se encuentran dentro de 0.60 – 1.00, lo cual nos indica que tenemos una amplia distribución de tamaño, es decir que tenemos diferentes tamaño de partículas dentro del sistema, presentando un valor mayor el jugo de naranja almacenado a temperatura ambiente, sin embargo se observa que las nanocápsulas no afectan en el índice de polidispersión ya que el comportamiento es similar al jugo de naranja sin β -caroteno en cualquier sistema, que es el comportamiento deseado. Los valores superiores a 0.5 de IPD son debidos a que el sistema es multicomponente, es decir, además de los sistemas de antioxidantes adicionados tiene por naturaleza otros componentes propios de la fruta, los cuales revelan el porqué de tan amplia distribución.

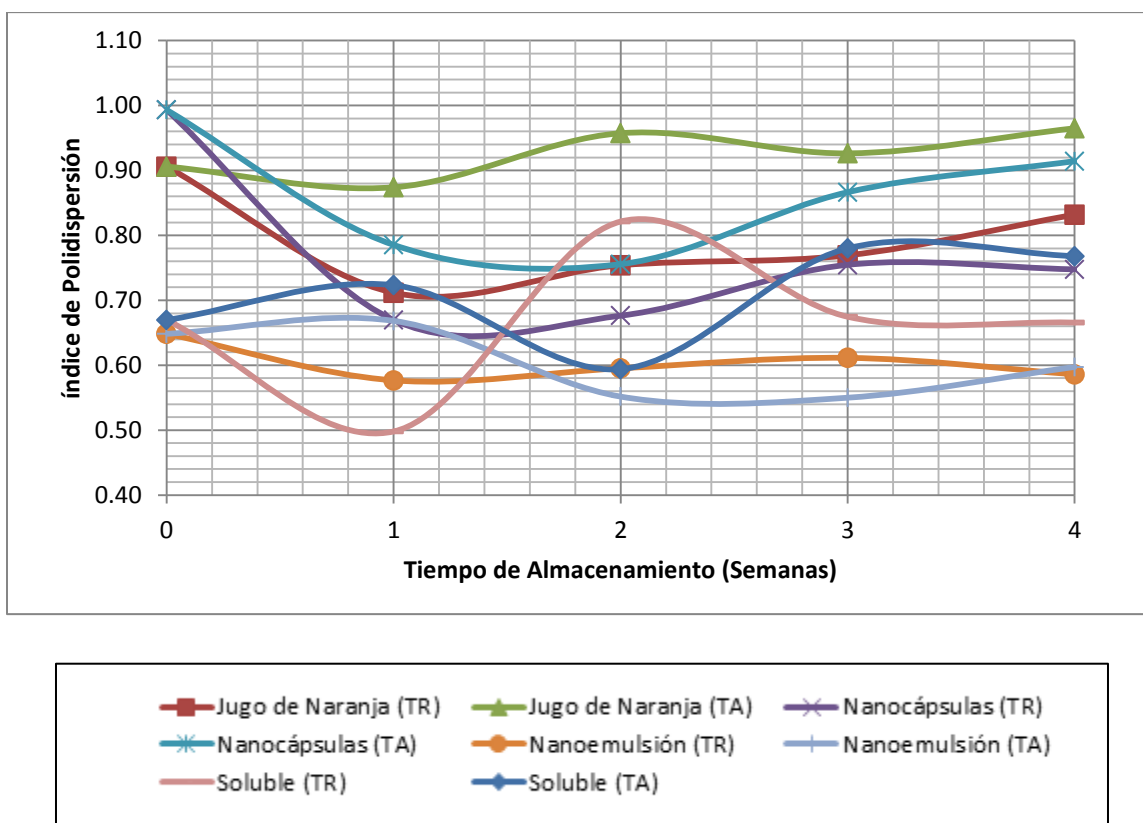


Figura 31. Índice de polidispersión en jugos de naranja almacenados a temperatura ambiente y de refrigeración.

En el caso de las nanoemulsiones se obtuvieron valores altamente negativos como se analiza en la Figura 32 debido a que cualquier molécula de ácido carboxílico presente en la superficie de la partícula debido a la composición del jugo de naranja (ácido cítrico por ejemplo), contribuye a su carga eléctrica global y estas son responsables de la estabilización de las nanogotas de aceite de agregación a valores de pH altos mediante la generación de la repulsión electrostática entre las gotitas y a pH por debajo o igual a su pKa pierde su carga lo que reduce la repulsión electrostática, por lo tanto las gotitas pueden agregarse por las interacciones atractivas de van der Waals y superar las interacciones de repulsión (estérica y electrostática) (Rao, J. & McClements, D.J., 2011) , el pKa del ácido cítrico es de aproximadamente 3.15, lo cual indica que existió una disminución del pH ya que al inicio el valor de ζ es mayor debido a que el pH inicial fue de 3.7, sin embargo a partir de la primer semana se distingue una disminución de más del 50%, indicando que disminuyó la repulsión electrostática entre las nanogotas por tanto el valor de pH fue menor o igual a su pKa a partir de esa semana, caso contrario al de las nanocápsulas que los valores altamente negativos no indican una mayor estabilidad debido a que el pH tenía un valor mayor al inicio la poli- ϵ -carpolactona estaba más cercana a su valor de pKa, mientras que al disminuir el valor de pH el valor se vuelve más cercano a cero debido a su carga negativa y su interacción con el medio (partículas propias del jugo de naranja) debido a que a pH bajos la PCL tiene carga positiva debido a que está por debajo de su pKa y el ácido cítrico presente en el medio debido a la naranja se encuentra cargado negativamente ya que el pH es mayor a su pKa, mientras que en el caso inverso tendríamos una inestabilidad en el sistema tal como se observó en las soluciones modelo anteriormente analizadas debido a que la interacción de la nanopartículas-medio serian del misma carga disminuyendo así la repulsión entre ellas. Con respecto al jugo el comportamiento es similar debido a la pectina que presenta en la nube del jugo las partículas del jugo fueron cargadas negativamente durante las cuatro semanas sin embargo del mismo modo se distingue una disminución del pH en las muestras, ya que el ζ disminuye con respecto al valor de pH, el aumento de la electronegatividad de la nube con respecto al aumento del pH es consistente con los cambios de la carga de las moléculas de pectina: la pectina es un poliacido con un pKa aproximado de 3,5-4,0, a un pH menor a 3.5 la pectina está cargada todavía negativamente pero cercana a 0, debido a la supresión de la disociación de los grupos carboxílicos libres (Croak & Corredig, 2006).

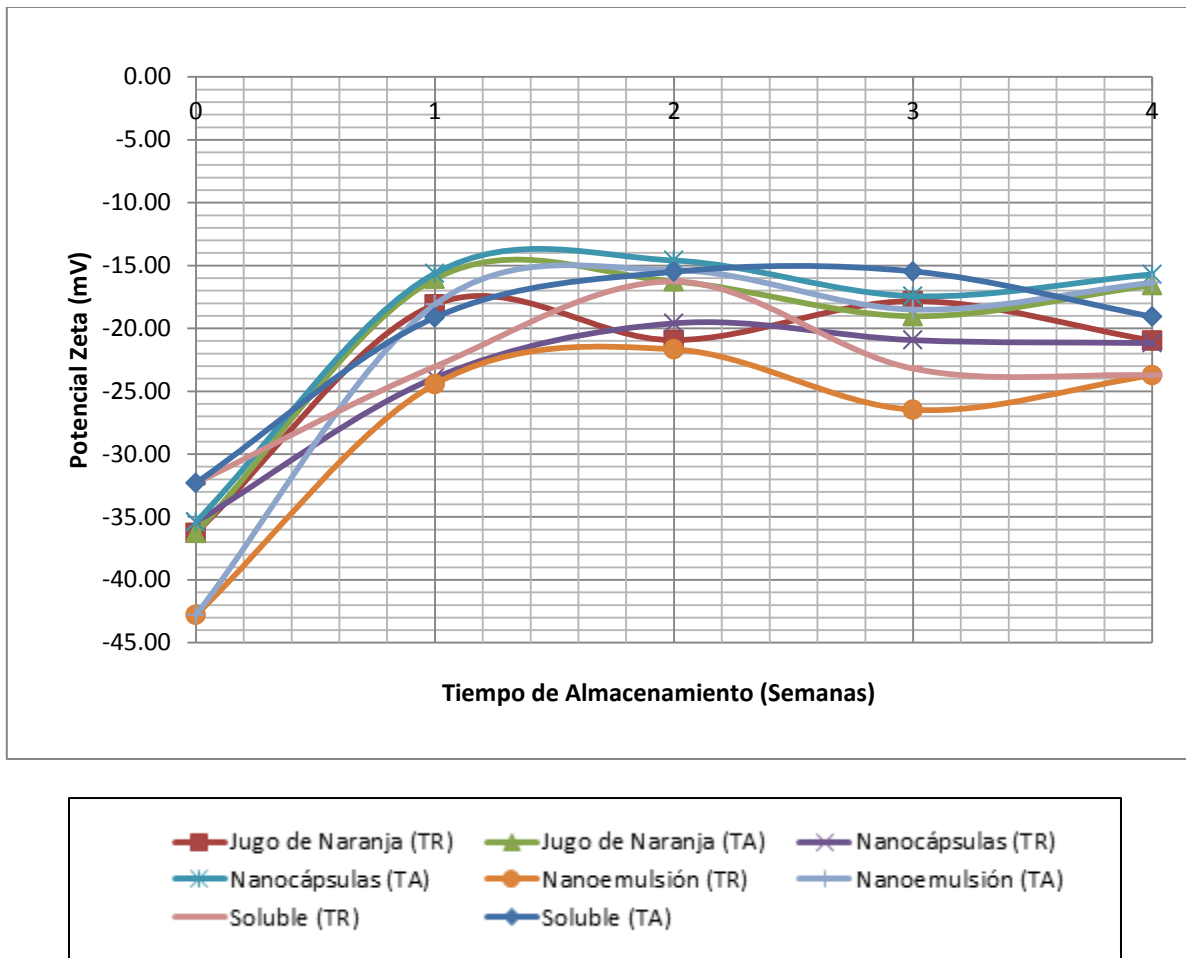


Figura 32. Potencial zeta en jugos de naranja almacenadas a temperatura ambiente y de refrigeración.

3.3.6.2 Turbidez y color.

Al analizar la figura 33 se distingue que al inicio la nanoemulsión tiene valores elevados de turbidez, esto debido a que como anteriormente se mencionó con respecto al tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta, a pesar de que dispersa la luz muy débilmente a comparación de una emulsión normal debido a su tamaño de partícula, sin embargo la composición sigue siendo un factor importante en la turbidez, ya que es más turbio esto a causa de la gran cantidad de tensoactivo que se utiliza en la elaboración de la nanoemulsión, Ziani y col., (2012) reporta valores elevados de turbidez y tamaños de partícula relativamente grandes (aproximadamente 150 nm) esto debido a la cantidad de

tensoactivo (Tween 80), en comparación a las nanopartículas que dispersan la luz con mayor facilidad, posteriormente al adicionar el sistema de nanoemulsión al jugo se produjo una inestabilidad debido a las condiciones del jugo de naranja, siendo el de mayor efecto el pH, ya que como se mencionó con anterioridad las nanoemulsiones son poco estables en pH ácidos, a partir de la primer semana se puede contrastar una disminución del valor de turbidez esto se puede atribuir a una disminución del número y/o tamaño de las partículas presentes en el sistema, lo que sugiere que las moléculas de β -caroteno se mueven fuera de las gotas de emulsión y dentro las micelas del tensoactivo. A una temperatura ambiente la nanoemulsión tiene un comportamiento diferente ya que la curva está por arriba (400 NTU aproximadamente) de la nanoemulsión a temperatura de refrigeración (4°C) (300 NTU aproximadamente) este efecto puede ser debido a un aumento de la tasa de coalescencia de las gotitas asociada con la deshidratación de los grupos de cabeza del tensoactivo (y la correspondiente disminución en la tensión superficial), o puede haber sido debido a la aceleración de los procesos de maduración de Ostwald debido a la mayor difusión de las moléculas de aceite pequeñas a las grandes.

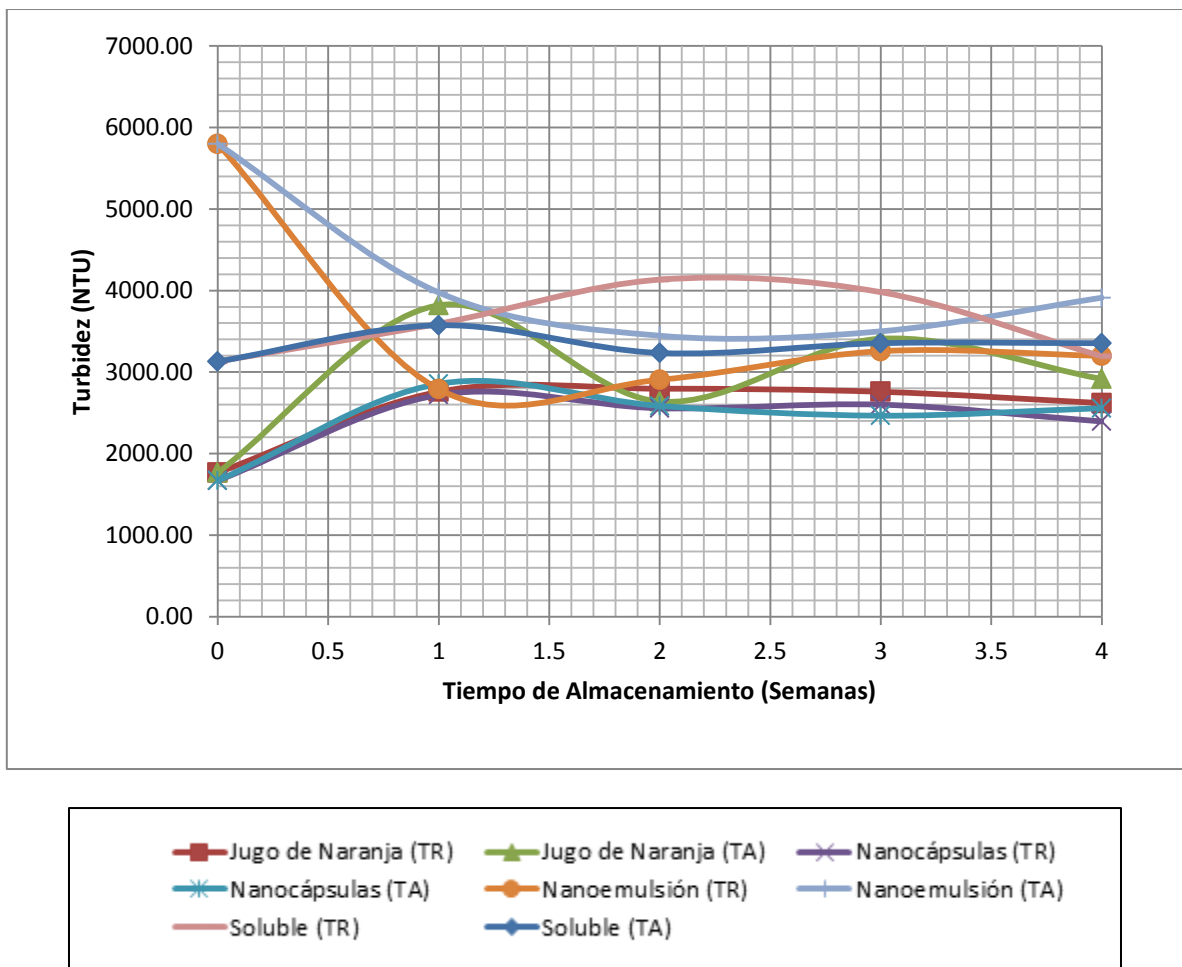


Figura 33. Turbidez en jugos de naranja almacenadas a temperatura ambiente y de refrigeración.

A continuación se muestra en la Figura 34 los valores de ΔE en donde se observa que en la semana uno existe un efecto significativo sobre el valor a partir de la segunda semana el valor es constante con valores entre 6 y 8, mientras que los valores del β -caroteno hidrosoluble no se encuentra nanoencapsulado y a temperatura de refrigeración sirve como antioxidante en el sistema logrando que no exista un oscurecimiento en el jugo y aumente el valor de ΔE , de igual modo sucede con la nanoemulsión con valores mayores de liberación de β -caroteno.

La nanoemulsión a temperatura de refrigeración se observa un menor valor debido a que a partir de la segunda semana se observa una pérdida de β -caroteno en los jugos esto debido a la eficiencia de encapsulación es menor con respecto a las nanocápsulas lo cual indica que

en el medio había ingrediente activo sin encapsular y se degradó, mientras que a partir de la siguiente semana existió una liberación lo cual hizo que actuara como antioxidante de igual manera se observa que es menos estable la nanoemulsión a temperatura ambiente ya que la liberación de β -caroteno fue mayor. Las nanocápsulas a pesar de que no hubo liberación en las nanocápsulas a temperatura de refrigeración existió un aumento de delta E esto debido al oscurecimiento provocado por reacciones de Maillard, caramelización o al deterioro del ácido ascórbico presente en la naranja.

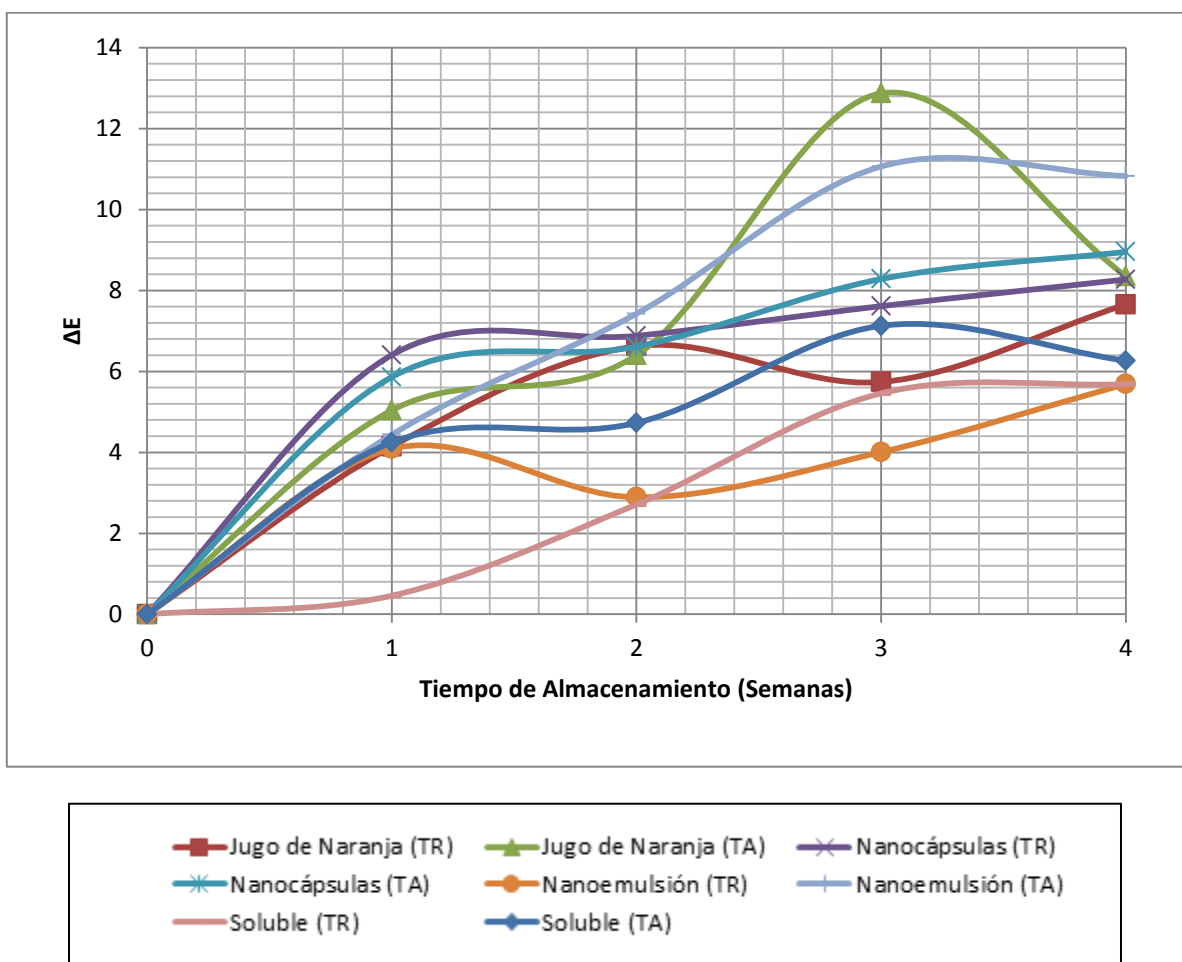


Figura 34. Cambio total de color en jugos de naranja almacenados a temperatura ambiente y de refrigeración.

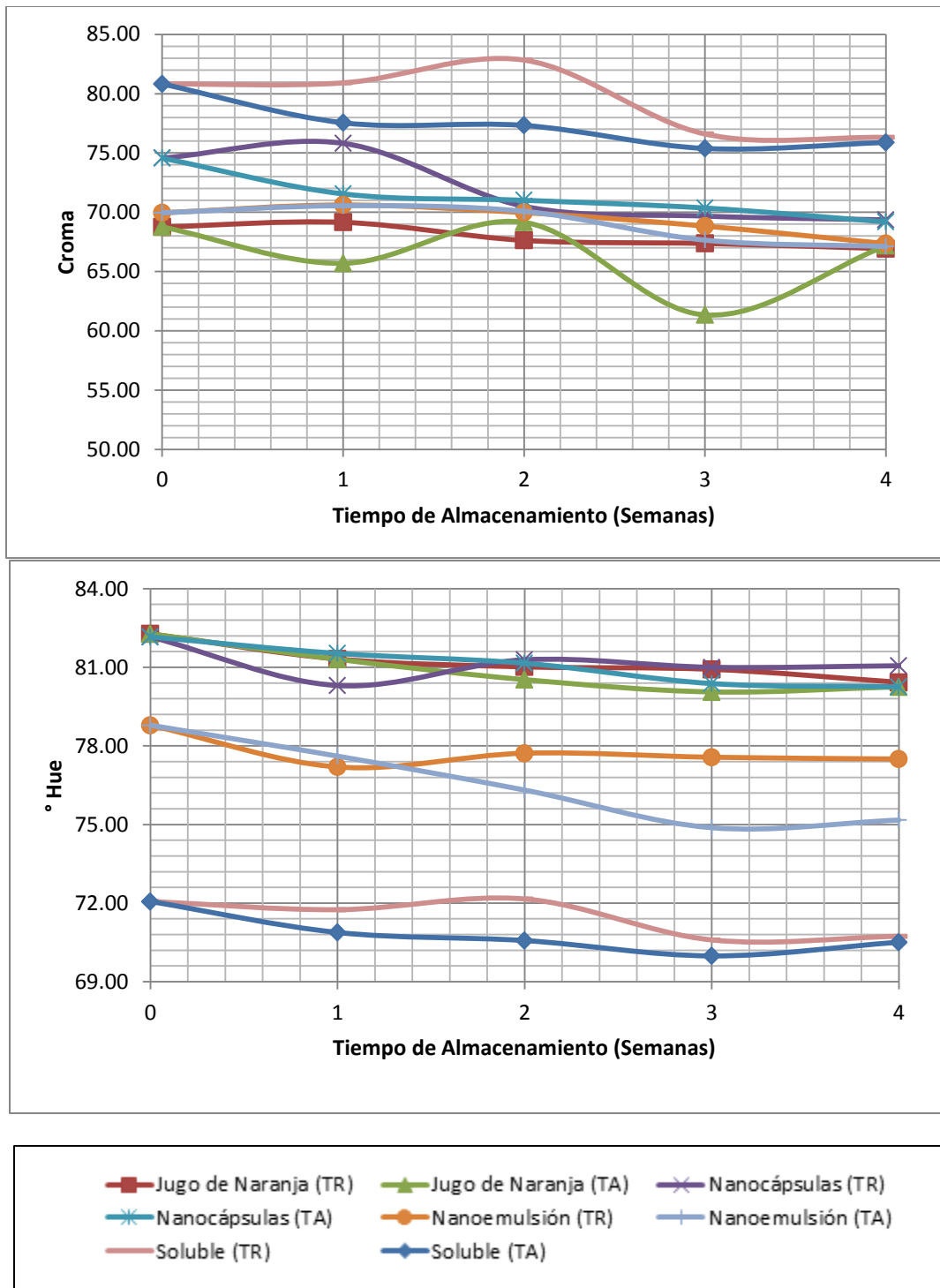


Figura 35. Croma y °Hue en jugos de naranja almacenados a temperatura ambiente y de refrigeración.

En la Figura 35 se contrasta el comportamiento de los jugos naturales sin ningún sistema y adicionado con β -caroteno (nanocápsulas, nanoemulsión e hidrosoluble) con respecto a los valores de croma y $^{\circ}$ Hue, en los cuales los valores de los jugos de naranja tanto a temperatura ambiente y de refrigeración se aproximan a los valores reportados croma 63.97 ± 7.72 y $^{\circ}$ Hue 82.62 ± 2.12 de jugos tratados térmicamente, Meléndez-Martínez y col., (2011), lo cual quiere decir que los jugos fueron estables con respecto a su tonalidad e intensidad con tonos más cercanos a los amarillos ya que los valores se acercan más a los 90° , mientras que la nanoemulsión y el β -caroteno hidrosoluble presentan tonalidades naranjas los datos se alejan más de los 90° , siendo el β -caroteno hidrosoluble el sistema con un efecto mayor. Las nanocápsulas con respecto a este valor presentan un comportamiento similar a los jugos lo cual indica que la eficiencia de encapsulación del β -caroteno se encuentra por arriba de la nanoemulsión, ya que no afecta de manera significativa la tonalidad de los jugos, mientras que el sistema que no se encuentra encapsulado debido a las tonalidades típicas de la estructura del beta caroteno el jugo presenta un cambio en su coloración.

Con respecto a los valores de croma del mismo modo los jugos naturales tienen un comportamiento similar a los reportados, sin embargo los jugos con β -caroteno hidrosoluble presentan una saturación mayor de la tonalidad naranja, mientras que las nanocápsulas y la nanoemulsión la tendencia es similar a los jugos de naranja naturales tanto a temperatura ambiente como refrigeración, se observa una ligera disminución en todos los sistemas, esto debido a la degradación que existe del β -caroteno por la exposición a la luz, oxígeno, entre otros factores ambientales

Conclusiones y Recomendaciones

De acuerdo a las evaluaciones realizadas con respecto a la estabilidad de las nanocápsulas en soluciones con diferentes pH's, °Brix y concentración de nanocápsulas de β -caroteno se puede decir que a pesar que en las pruebas directas sobre estabilidad es decir, tamaño de partícula, IPD y potencial zeta (ζ) los valores indican que a pH mayores la estabilidad es mayor ya que se presentaron datos de tamaño de partícula e IPD mayores que los de pH de 3, así mismo una disminución del potencial zeta. Sin embargo es importante mencionar que este comportamiento se ve favorecido por la temperatura de almacenamiento (refrigeración) ya que no existe una diferencia significativa entre las condiciones de pH, ya que se observa un efecto benéfico de los °Brix sobre la estabilidad del sistema.

Así mismo, con respecto a la turbidez y color se contrasta del mismo modo la estabilidad del sistema, ya que la turbidez tiene una relación directa con la estabilidad del sistema, siendo mayor en pH de 6, lo cual nos indica que a pesar de tener una distribución de tamaños menor debido a que el azúcar presente en el medio no tiene ningún efecto ya que a estas condiciones es hidrolizada, mientras que a un pH de 3 el azúcar forma una capa de hidratación en la partícula, provocando que el IPD aumente pero debido a que tenemos diferentes tamaños de partícula debido a la hidratación de cada una de ellas y por tal motivo se observa un aumento de tamaño que no es debido a aglomeraciones, ya que esta capa de hidratación hace que la fuerza de repulsión sea estable.

El color se ve afectado significativamente por el pH y los °Brix debido a que a condiciones de pH de 6 el biopolímero (poli- ϵ -caprolactona) se ve degradado por tal motivo se denota una disminución en el tamaño de partícula y un aumento en el IPD aun en temperatura de refrigeración, debido a que se están formando aglomeraciones y por eso tenemos tamaño de partícula mayores y otros debido a la degradación del polímero con un tamaño menor. Por otra parte el color es intensificado debido a la hidrólisis del azúcar. Existiendo un valor de ΔE , °Hue con valores más cercanos a 0° (tonos rojizo) y con una intensidad mayor.

Este mismo efecto es contrastado con la evaluación de β -caroteno residual donde se contrasta que a pH de 3 lo que sucede con las soluciones es una disminución de la concentración, es decir, que se está degradando el ingrediente activo debido a las

condiciones de almacenamiento siendo más notorio para temperatura ambiente, mientras que con un pH de 6 los porcentajes de encapsulación son 80% aproximadamente.

La concentración de nanocápsulas de β -caroteno no es un factor que afecte significativamente en la estabilidad del sistema, ya que en el análisis de varianza (ANOVA) presento diferencia mínima con respecto a variables como: turbidez y color, debido a que existía mayor cantidad de partículas insolubles en suspensión y con respecto al color, resultaría un tanto mayor debido a que es mayor la cantidad de ingrediente activo nanoencapsulado, siendo más significativo el valor de pH y °Brix. Las condiciones a las cuales se tiene una mayor estabilidad son en pH de 3, 15 °Brix y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Al contrastar con jugos naturales de naranja la estabilidad de las nanocápsulas para estudiar la diferencia que existe entre un sistema nanoencapsulado, nanoemulsión o β -caroteno hidrosoluble, se concluyó que las nanocápsulas no afectan en ninguna de las variables a un jugo natural que fue usado como control, mientras que la nanoemulsión y el β -caroteno hidrosoluble si afectan al jugo sobre parámetros de estabilidad y visuales. Con respecto a la estabilidad de los sistemas a pesar de que la nanoemulsión indicaría que tiene mayor estabilidad por los valores obtenidos de tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta, como analizamos es un sistema estable pero solo en condiciones de pH elevados para la aplicación en jugos que es el objetivo no es un sistema estable, además que proporciona valores elevados de turbidez iniciales con respecto a los otros sistemas, lo cual visualmente no es atractivo a los consumidores, en embargo las nanocápsulas debido a su composición a pH cercanos a 3 (pH's de jugos) el sistema es estable durante el periodo de almacenamiento de 10 días a pesar que los valores de potencial zeta son bajos debido a la interacción de la poli- ϵ -caprolactona con el medio ácido, dando valores cercanos a cero, del mismo modo se vio influenciado el tamaño de partícula y el índice de polidispersión, pero como se muestra en los análisis anteriores esta variación se debió a la hidratación de las nanopartículas con el medio debido a los azúcares presentes formando una capa protectora que ayudo a que el ingrediente activo permaneciera dentro de la nanocápsula durante la experimentación, siendo más estable a temperatura de refrigeración, por tanto la forma más viables de adicionar el ingrediente activo como antioxidante (hidrofóbico) es a través de un sistema coloidal como bien se menciona, pero para una aplicación en jugos el más adecuado bajo estas condiciones son las nanocápsulas.

Con el fin de evaluar a mayor detalle la estabilidad del sistema se recomienda llevar a cabo un análisis de estabilidad por dispersión de luz, del mismo modo llevar a cabo el análisis ya con jugos en condiciones de proceso, es decir, adicionar las nanocápsulas antes de pasteurizar el jugo para ver la estabilidad frente al proceso térmico al cual será evaluado.

De igual manera es importante llevar a cabo estudios sobre la cinética de degradación del polímero encapsulante y del β -caroteno a pH de 3, para conocer el comportamiento de estos en un periodo más largo de almacenamiento y así ayudar a predecir la vida útil de las nanocápsulas para asegurar que lleguen lo más íntegras posibles al tracto y cumplan con su funcionalidad.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Allémann, E., Gurny, R., & Doelker, E. (1993). Drug-loaded nanoparticles - preparation methods and drug targeting issues. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 39(5), 173-191.
2. Baccouche, A., Ennouri, M., Felfoul, I. & Attia H. (2013). A physical stability study of whey-based prickly pear beverages. *Food Hydrocolloids* 33, 234-244.
3. Benítez, E., Genovese, D. B., & Lozano, J. E. (2009). Effect of typical sugars on the viscosity and colloidal stability of apple juice. *Food Hydrocolloids* 23, 519– 525.
4. Bendich A., Olson J.A. (1989). Biological actions of carotenoids. *FASEB J* 3:1927–32.
5. Bilati, U., Allémann, E., Doelker, E. (2005). Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 59, 375–388.
6. Boon, C. S., McClements, D. J., Weiss, J., & Decker, E. A. (2010). Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(6), 515–532.
7. Borel, P. (2003). Factors affecting intestinal absorption of highly lipophilic food microconstituents (fat-soluble vitamins, carotenoids and phytosterols). *Clin. Chem. Lab. Med.*, 41, 979-994.
8. Bouchemal, K., Briancon, S., Perrier, E., & Fessi, H. (2004). Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. *International Journal of Pharmaceutics*, 280, 241-251.
9. Britton G. (1995a). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J* 9:1551–8.
10. Britton G. (1995b). *Carotenoids vol. 1B spectroscopy*. Basel, Boston, Berlin: Birkh" auser. 360 p.
11. Calvo, P., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J. (1997). Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carriers. *Int. J. Pharm.* 153, 41–50. Cattani,

- V.B., Pohlmann, A.R., Costa, T.D., 2008. Pharmacokinetic evaluation of indomethacin ethyl ester-loaded nanoencapsules. *Int. J. Pharm.* 363, 214–216.
12. Castellan, G.W. (1987) *Fisicoquímica*. Segunda edición. Editorial Pearson. México.
 13. Castenmiller, J. J. M., & West, C. E. (1998). Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annual Review of Nutrition*, 18, 19–38.
 14. Chang, P. R., Jian, R., Yu, J., & Ma, X. (2010). Fabrication and characterization of chitosan nanoparticles/plasticized-starch composites. *Food Chemistry*, 120, 736-740.
 15. Chaudhry, Q., Scotter, M., Blackburn, J., Ross, B., Broxall, A., Castle, L., et al. (2008). Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. *Food Additives and Contaminants*, 25, 241-258.
 16. Cheng, X., Liu, R. & He, Y. (2010). A simple method for the preparation of monodisperse protein-loaded microspheres with high encapsulation efficiencies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 76, 336–341.
 17. (CODEX STAN 247-2005) Norma General Del Codex Para Zumos (Jugos) Y Néctares De Frutas.
 18. Collado-Fernández M, M.L. González-Sanjosé & R. Pino-Navarro. (2000). Evaluation of turbidity: correlation between Kerstesz turbidimeter and nephelometric turbidimeter. *Food Chem.*, 71: 563-66.
 19. Couvreur P, Barratt G, Fattal E, Legrand P, Vauthier C. (2002). Nanocapsule technology: a review. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* .99-134.
 20. Couvreur P, Dubernet C, Puisieux F. (1995). Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. *European Journal Pharmaceutics Biopharmaceutics* 41. 2 - 13.
 21. Croak, S. & Corredig, M. (2006). The role of pectin in orange juice stabilization: Effect of pectin methylesterase and pectinase activity on the size of cloud particles. *Food Hydrocolloids* 20, 961–965.
 22. Cusen, M., Kerry, J., Morris, M., Cruz-Romero, M. & Cummins, E. (2012). Nanotechnologies in the food industry e Recent developments, risks and regulation. *Trends in Food Science & Technology* 24, 30- 46.

23. Dash, T.K. & Konkimalla V.B. (2012). Polymeric Modification and Its Implication in Drug Delivery: Poly- ϵ -caprolactone (PCL) as a Model Polymer. *Pharmaceutics* 9, 2365–2379.
24. Duncan, C. (2011). Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of Colloid and Interface Science* 363, 1–24.
25. Elzein, T., Nasser-Eddine, M., Delaite, C., Bistac, S., Dumas, P. (2004). FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. Volume 273, Issue 2, Pages 381–387.
26. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y Organización Mundial de la Salud. (2011), Roma.
27. Fattal, E., & Vauthier, C. (2002). Nanoparticles as drug delivery systems. In: Swarbrick, J., Boylan, J.C. (Eds.), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Marcel Dekker, New York, pp. 1864–1882.
28. Fernández-Vázquez, R., Stinco, C.M., Hernanz, D., Heredia, F.J. & Vicario, I.M. (2013). Colour training and colour differences thresholds in orange juice. *Food Quality and Preference* 30, 320–327.
29. Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J.P., Ammoury, N., Benita, S. (1989). Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* 55, R1–R4.
30. Garti, N. (1997). Double emulsions—scope, limitations and new achievements. *Colloid Surf. A* 123/124, 233–246.
31. Gómez, G., Chaves N., Sagástume, B., Murillo, S., Fernández, A., & Ulate G. (2001). Consumo de micronutrientes con función antioxidante en estudiantes de la Universidad de Costa Rica, con edades comprendidas entre los 17 y 19 años. *Acta pediátr. costarric* v.15 n.1.
32. González-Reza R.M. (2012) Optimización energética y cinética del proceso de pasteurización de un fluido modelo en un intercambiador de superficie raspada. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
33. Grigoriev, D., Miller, R. (2009). Mono- and multilayer covered drops as carriers. *Curr. Opin. Colloid Interf. Sci.* 14, 48–59.

34. Grillo, R., Pereira dos Santos, N.Z., Maruyama, C.R., Rosa, A.H., Lima, L., Fraceto, L.F. (2012). Poly (-caprolactone)nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. *Journal of Hazardous Materials* (231– 232), 1– 9.
35. Gutierrez-Rios, E. (1985). *Química*. Editorial Reverté S.A. España. 191-197.
36. Halliwell B & Gutteridge J. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Halliwell B and Gutteridge J eds, Oxford University Press, New York.
37. Hasler CM. (1998). Functional foods: their role in disease prevention and health promotion. *Food Technology* 52(2):57–62.
38. Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J. (2003). *Biomaterials* 24. 4283–4300.
39. Hobson, D.W. (2011). *Nanotechnology. Volume 3: Industrial Biotechnology and Commodity Products*, 683–697.
40. Hoek, E. M. V., & Agarwal, G.K. (2006). Extended DLVO interactions between spherical particles and rough surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* 298, 50–58.
41. Ishikawa, Y., Katoh, Y., & Ohshima, H. (2005). Colloidal stability of aqueous polymeric dispersions: Effect of pH and salt concentration, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 42, 53–58.
42. Jaffe, H., Giang, P.A., Hayes, D.K., Miller, J.A. (1981). Stroud BH. *Controlled release pesticides and pharmaceuticals*. New York: Plenum. 303.
43. Kishore, R. S. K., Kiese, S., Fischer, S., Pappenberger, A., Grauschopf, U., & Mahler, H. C. (2011). The degradation of polysorbates 20 and 80 and its potential impact on the stability of biotherapeutics. *Pharmaceutical Research*, 28, 1194–1210.
44. Khoee, S., Yaghoobian, M. (2008). An investigation into the role of surfactants in controlling particle size of polymeric nanocapsules containing penicillin-G in double emulsion. *Eur. J. Med. Chem.*, doi:10.1016/j.ejmech.2008.09.045.
45. Lee Hong-Joo & Moon Seung-Hyeon. (2004). Influences of colloidal stability and electrokinetic property on electrodialysis performance in the presence of silica sol. *Journal of Colloid and Interface Science* 270, 406–412.
46. Lertsutthiwong, P., Noomun, K., Jongaroonngamsang, N., Rojsitthisak, P., Nimmannit, U. (2008). Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil. *Carbohydr. Polym.* 74, 209–214.

47. Letchford, K., Burt, H. (2007). A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanosphere nanocapsules and polymersomes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 65 (3), 259–269.
48. Liang, Y., Hilal, N., Langston, P., Starov, V. (2007). Interaction forces between colloidal particles in liquid: Theory and experiment. *Advances in Colloid and Interface Science*, Volumes 134–135, Pages 151–166.
49. Lobato, K.B., Pease, K., Forgearini, J.C., Guterres, S.S., Jablonski, A. & Oliveira-Rios, A. (2013). Characterisation and stability evaluation of bixin nanocápsulas. *Food Chemistry*, Volume 141, Issue 4, 15, 3906–3912.
50. Lyklema, J. (1995). *Fundamentals of Interface and Colloid Surface*, vol. 1, Solid–Liquid Interfaces, Academic Press, New York.
51. Mallin, M., Vainio, H., Karjalainen, K., & Seppala, J. (1996). Biodegradable lactone copolymers. II. Hydrolytics study of e-caprolactone and lactide copolymers. *Journal of Applied Polymer Science*, 59, 1289–1298.
52. Maron, H.S., Prutton, F.C. (2010). *Fundamentos de Fisicoquímica*. Editorial Limusa. 267-275.
53. Maynard, A.D., Aitken, R.J., Butz, T., Colvin, V., Donaldson, K., Oberdorster, G., Philbert, M.A., Ryan, J., Seaton, A., Stone, V. (2006). Safe handling of nanotechnology. *Nature* 444 (7117), 267–269.
54. McClements, D. J. (2005). *Food Emulsions: Principles, practices, and techniques* (2nd Ed.). Boca Raton, FL: CRC Press.
55. McClements, D. J., Decker, E. A., & Weiss, J. (2007). Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Journal of Food Science*, 72(8), R109-R124.
56. McClements, D., Decker, E. A., Park, Y., & Weiss, J. (2009). Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49, 577-606.
57. McClements, D. J. (2010). Emulsion design to improve the delivery of functional lipophilic components. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1(1), 241-269.
58. Meléndez-Martínez, A.J., Gómez-Robledo, L., Melgosa, M., Vicario, I.M. & Heredia, F.J. (2011). Color of orange juices in relation to their carotenoid contents

- as assessed from different spectroscopic data. *Journal of Food Composition and Analysis* 24, 837–844.
59. Mirhosseini, H., Tan, C.P., Hamid, N.S.A., Yusof, S. (2008). Effect of Arabic gum, xanthan gum and orange oil contents on ζ -potential, conductivity, stability, size index and pH of orange beverage emulsion. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 315, 47–56.
 60. Miyazaki, K., Islam, N. (2007). Nanotechnology systems of innovation—An analysis of industry and academia research activities. *Technovation* 27, 661–675.
 61. Moinard-Chécot, D., Chevalier Y., Briançon S., Beney L., & Fessi, H. (2008). Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion–diffusion process. *Journal of Colloid and Interface Science* Volume 317, Issue 2, 458–468.
 62. Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., & Elaissari, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 385(1-2), 113-142.
 63. Motoyama, Y., Appelbaum, R., Parker, R. (2011). The National Nanotechnology Initiative: Federal support for science and technology, or hidden industrial policy? *Technology in Society* 33, 109–118.
 64. Narong, P. & James, A.E. (2006). Effect of pH on the ζ -potential and turbidity of yeast suspensions. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 274,130–137.
 65. Noriega-Peláez, E.K., Mendoza-Muñoz, N., Ganem-Quintanar, A. & Quintanar-Guerrero, D. (2011). Optimization of the emulsification and solvent displacement method for the preparation of solid lipid nanoparticles. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 37(2); 160-166.
 66. Norma Oficial Mexicana NOM-173-SCFI-2009, Jugos de frutas preenvasados-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba.
 67. Onate-jaén A., Bellido-Milla D. & Hernández-Artiga M.P. (2006). Spectrophotometric methods to differentiate beers and evaluate beer ageing. *Food Chem.*, 97(2) 361-369
 68. Packer, L., Obermueller-Jevic, U., Kraemer, K., & Sies, H. (2004). Carotenoids and retinoids: molecular aspects and health issues. Champaign, USA: AOCS Press.

69. Pinto-Reis, C. Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J., Veiga F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, Volume 2, Issue 1, 8–21
70. Pitt, C.G, Marks, T.A, Schindler, A. (1980). *Controlled release of bioactive materials*. New York: Academic Press. 19.
71. Powers, K. W., Brown, S. C., Krishna, V. B., Wasdo, S. C., Moudgil, B. M., & Roberts, S. M. (2006). Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. *Toxicological Sciences*, 90, 296-303.
72. Rao J. & McClementns D.J. (2011). Food-grade microemulsions, nanoemulsions and emulsions: Fabrication from sucrose monopalmitate & lemon oil. *Food Hydrocolloids*. Volume 25, Issue 6, August 2011, Pages 1413–1423.
73. Rhim, J. W., Hong, S. I., & Ha, C. S. (2009). Tensile, water vapor barrier and antimicrobial properties of PLA/nanoclay composite films. *LWT e Food Science and Technology*, 42, 612-617.
74. Ribeiro H.S., Cruz R.C.D. (2004). Hochkonzentrierte carotinoidhaltige Emulsionen. *Chem Ing Technik* 76(4):433–47.
75. Ribeiro, H.S., Boon-Seang Chu, Ichikawa, S. & Nakajima, M. (2008). Preparation of nanodispersions containing β -carotene by solvent displacement method. *Food Hydrocolloids* 22, 12–17.
76. Sagalowicz, L., & Leser, M. E. (2010). Delivery systems for liquid food products. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15(1-2), 61-72.
77. Sanguansri, P., & Augustin, M. A. (2006). Nanoscale materials development e a food industry perspective. *Trends in Food Science & Technology*, 17(10), 547-556.
78. Sanz-Pedrero, P. (1996). *Fisicoquímica para farmacia y biología*. Ediciones científicas y técnicas. 90-100.
79. Schaffazick, S.R., Pohlmann, A.R., Dalla-Costa, T. & Guterres, S.S. (2003). Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56, 501–505.
80. Som, C., Berges, M., Chaudhry, Q., Dusinska, M., Fernandes, T., Olsen, S., & Nowack, B. (2010). The importance of life cycle concepts for the development of safe nanoproducts. *Toxicology*, 269(2-3), 160-169.

81. Stahl, W. & Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine* 24, 345–351.
82. Sukhorukov, G.B., Donath, E., Lichtenfeld, H., Knippel, E., Knippel, M., Budde, A., Möhwald, H. (1998). Layer-by-layer self-assembly of polyelectrolytes on colloidal particles. *Colloid Surf. A* 137, 253–266.
83. Tiede, K., Boxall, A.B., Tear, S.P., Lewis, J., David, H. & Hasselov, M. (2008). Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment. *Food Addit. Contam.* 25 (7), 795–821.
84. Tiwari, B.K., Muthukumarappan, K., O'Donnell, C.P. & Cullen, P.J. (2008). Colour degradation and quality parameters of sonicated orange juice using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology* 41, 1876-1883.
85. Qingrong-Huang. (2012). *Nanotechnology in the food, beverage and nutraceutical industries*. Woodhead publishing series in food science, Technology and nutrition: number 218, USA, 18-21.
86. Quintanar-Guerrero, D., Allémann, 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*.
87. Quintanar-Guerrero, D., Tamayo-Esquivel, D., Ganem-Quintanar, A., Alléman, E., & Doelker, E. (2005). Adaptation and optimization of the emulsification-diffusion technique to prepare lipidic nanospheres. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26, 211-218.
88. Van het Hof, K. H., West, C. E., Weststrate, J. A., & Hautvast, J. G. (2000). Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *Journal of Nutrition*, 130, 503–506.
89. Velikov, K. P., & Pelan, E. (2008). Colloidal delivery systems for micronutrients and nutraceuticals. *Soft Matter*, 4(10), 1964-1980.
90. Weiss, J., Takhistov, P. & McClements, J. (2006). Functional materials in food nanotechnology. *Journal of Food Science* 71 (9), R107–R116.
91. Wu, L.; Zhang, J. & Watanabe, W. (2011). Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 456- 469.
92. Yonekura, L., & Nagao, A. (2007). Intestinal absorption of dietary carotenoids. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(1), 107–115.

93. Yuan, Y., Gao, Y., Mao, Like & Zhao, J. (2008). Optimization of conditions for the preparation of β -carotene nanoemulsions using response surface methodology. *Food chemistry*, 107, 1300-1306.
94. Zambrano-Zaragoza, M. L., Mercado-Silva, E., Gutiérrez-Cortez, E., Castaño-Tostado, E., & Quintanar-Guerrero, D., 2011. Optimization of nanocapsules preparation by the emulsion-diffusion method for food applications. *LWT-Food Science and Technology* 44(6), 1362-1368.
95. Zambrano-Zaragoza, M.L., Mercado-Silva, E., Ramírez-Zamorano, P., Cornejo-Villegas, M.A., Gutiérrez-Cortez, E., & Quintanar-Guerrero, D. (2013). Use of solid lipid nanoparticles (SLNs) in edible coatings to increase guava (*Psidium guajava* L.) shelf-life. *Food Research International* 51, 946–953.
96. Ziani, K., Fang, Y., & McClements, D.J. (2012). Fabrication and stability of colloidal delivery systems for flavor oils: Effect of composition and storage conditions *Food Research International* 46 (2012) 209–216.
97. Zhou, J., Ralston, J., Sedev, R. & Beattie, D.A. (2009). Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure and colloid stability. *Journal of Colloid and Interface Science* 331, 251–262.
98. <http://www.nano.gov/>. National Nanotechnology Initiative. (2013).