



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**EFFECTO PROTECTOR DE NANOCÁPSULAS DE
 α -TOCOFEROL SOBRE LA DEGRADACIÓN DE
 β -CAROTENO DE TAMAÑO SUBMICRÓNICO EN
UNA BEBIDA DE FRESA REFRIGERADA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN ALIMENTOS

PRESENTA:

HIMMEL DANIEL RODRIGUEZ RAMOS

ASESORES:

**DRA. MARÍA DE LA LUZ ZAMBRANO ZARAGOZA
IA. RICARDO MOISÉS GONZÁLEZ REZA**

CUAUTILÁN IZCALLI EDO. DE MÉXICO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa 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 comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Efecto protector de nanocápsulas de α -tocoferol sobre la degradación de β -caroteno de tamaño submicrónico en una bebida de fresa refrigerada.

Que presenta el pasante: **Himmel Daniel Rodríguez Ramos**

Con número de cuenta: **409027437** para obtener el Título de la carrera: **Ingeniería 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 HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 28 de Octubre de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	L.B.Q. José Jaime Flores Minutti	
VOCAL	Dra. María Elena Vargas Ugalde	
SECRETARIO	Dra. Ma. de la Luz Zambrano Zaragoza	
1er. SUPLENTE	L.A. Miriam Alvarez Velasco	
2do. SUPLENTE	L.Q. Guillermo Martínez Morua	

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

LMCF/cga

El presente proyecto fue financiado por:

- El proyecto PAPIIT IT200814, “Efecto de recubrimientos nanoparticulados y tratamiento con luz UV-C sobre la actividad antioxidante, enzimática e integridad de frutas y hortalizas cortadas. De la DGAPA-UNAM.
- El proyecto PAPIIME: PE206614 “Implementación y métodos de enseñanza para la aplicación de nanotecnología en la conservación de alimentos a bajas temperaturas sometidas a procesos térmicos y de transferencia de masa”, de la DGAPA-UNAM.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María de la Luz Zambrano Zaragoza por el apoyo, la asesoría constante, el tiempo dedicado, los grandes consejos y enseñanzas para la realización de este trabajo en el Laboratorio de transformación y Tecnologías Emergentes de Alimentos en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria.

Al Ingeniero Ricardo Moisés González Reza por el apoyo en la realización de este trabajo.

A la Dra. María de los Ángeles Cornejo Villegas por el apoyo técnico en el desarrollo metodológico de este trabajo de tesis en el Laboratorio de Transformación y Tecnologías Emergentes de Alimentos en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria.

A los profesores: José Jaime Flores Minutti, María Elena Vargas Ugalde, Miriam Alvares Velasco y Guillermo Martínez Morua, por el apoyo en la revisión de este trabajo.

A mis compañeros y amigos: Clau, Vero, Moy, Florencia, Lili, Mon y Quiquis por el apoyo, la amistad y el tiempo el cual compartimos en el Laboratorio.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO por haber sido mi hogar durante tanto tiempo y haberme abierto las puertas durante mi formación académica.

DEDICATORIAS

A Dios por estar conmigo en todo momento, por haberme dado la oportunidad de crecer como persona en el ámbito académico y en este camino

A mis padres por el amor el cariño y la sabiduría, por el gran apoyo y la educación suficiente para seguir adelante en mi camino de vida.

A mis hermanos por ser mis amigos y apoyarme en los proyectos que juntos hemos realizado.

A Iker y Mateo por regalarme tantas sonrisas y momentos hermosos.

A Eduardo por ser mi compañero en este camino, por sus consejos, comprensión y cariño que me brinda todos los días.

A mis amigos: Gaby, Lidia, Marieli, por las aventuras y espacio que me brindaron durante la carrera.

A Luz Zambrano por sus múltiples enseñanzas, consejos, paciencia y su gran amistad.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1 CAPÍTULO 1. MARCO TEORICO	4
1.1 Generalidades de la fresa	4
1.1.1 Bebidas	5
1.1.2 Jugo de fruta	5
1.1.3 Composición	7
1.1.4 Producción	7
1.2 Tratamiento térmico	8
1.2.1 Pasteurización	9
1.2.2 Sensibilidad térmica de los materiales	10
1.2.3 Almacenamiento en refrigeración	10
1.3 Cambios fisicoquímicos	11
1.3.1 pH y acidez	11
1.3.2 °Brix	12
1.3.3 Cinética de degradación de compuestos termolábiles	12
1.4 Factores de calidad	13
1.4.1 Color	13
1.4.2 Turbidez	14
1.5 Antioxidantes	15
1.5.1 Antocianinas	15
1.5.2 β - Caroteno	16
1.5.3 α - Tocoferol	17
1.5.4 Nutracéuticos	18
1.6 Nanotecnología	19
1.6.1 Definición de nanopartículas poliméricas	20
1.6.2 Nanoencapsulación	20
1.6.3 Método de emulsificación-Difusión	21

1.6.4	Poly - ϵ - caprolactona	23
1.6.5	Nanoemulsiones	24
1.6.6	Caracterización de sistemas de talla submicrónica	25
1.6.7	Tamaño de partícula e índice de polidispersión	25
1.6.8	Potencial zeta	26
1.7	Aplicaciones de la nanotecnología en la industria de alimentos	26
2	CAPÍTULO II. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL	28
2.1	Problema	28
2.2	Objetivo general	28
2.2.1	Objetivos particulares	28
2.3	Materiales y métodos	29
2.3.1	Preparación de nanoemulsiones y nanocápsulas	29
2.3.3	Material biológico	30
2.3.4	Extracción del jugo	30
2.3.5	Formulación de las bebidas	30
2.3.6	Envasado y tratamiento térmico	31
2.3.7	pH	32
2.3.8	°Brix	32
2.3.9	Acidez titulable	32
2.3.10	Colorimetría	32
2.3.11	Turbidimetría	33
2.3.12	Carotenoides	33
2.3.13	Antocianinas	34
2.3.14	Diseño experimental	34
3	CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
3.1	Parámetros fisicoquímicos	35
3.1.1	Acidez titulable	35
3.1.2	pH	38
3.1.3	°Brix	40
3.2	Parámetros físicos	42
3.2.1	Turbidez	42

3.2.2	Color	45
3.2.3	Luminosidad	45
3.2.4	Cromaticidad	47
3.2.5	Cambio total de color	51
3.3	Antioxidantes	53
3.3.1	Degradación de β -caroteno durante el almacenamiento	53
3.3.2	Antocianinas residuales	58
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		62
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		63

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Fragaria x ananassa</i> (Darrow, 1966).	4
Figura 2. Diferentes formas de fresa (Darrow, 1966).	5
Figura 3. Estados con producción significativa de fresa en México (Dirección General de Desarrollo Económico, 2002).	8
Figura 4. Morfología de nanocápsulas (Zambrano-Zaragoza et al., 2011).	22
Figura 5. Polimerización de apertura de anillo de ϵ -caprolactona a Policaprolactona (Elzein y col., 2004).	23
Figura 6. Cambios en el % de acidez titulable expresada como meq de ácido ascórbico en bebidas con jugo de fresa con o sin goma. GA= goma arábica, GX = goma xantana, Sin = sin gomas.	35
Figura 7. Cambios en el % de acidez titulable expresada como ácido ascórbico en bebidas con jugo de fresa incorporadas con sistemas de talla nanométrica. GA = Goma arábica, GX = goma xantana; GX-A = goma xantana-arábica.	36
Figura 8. Cambios de pH para bebidas control con y sin gomas empleadas como estabilizantes del sistema, GA = Goma Arábica, GX = goma xantana y SG = Sin goma.	37
Figura 9. Comparación del comportamiento de pH en bebidas con jugo de fresa incorporados con sistemas de talla nanométrica. GA= goma arábica, GX = goma xantana, GX-A = goma xantana-arabiga, Ncs = nanocápsulas, NE = nanoemulsión.	37
Figura 10. Cambios en Sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix) para muestras control. GA = goma arábica, GX = goma xantana, SG = sin goma, C = Control.	39
Figura 11. Cambios en $^{\circ}$ Brix en función a la composición de goma y sistemas de talla nanométrica en bebidas con 30% de jugo de fresa. GA = goma arábica, GX = goma xantana, GX-A = goma xantana-arábica, Ncs = nanocápsulas y NE = nanoemulsión.	40
Figura 12. Cambios de turbidez en función al tiempo de almacenamiento	42

para bebidas con jugo de fresa, muestras control. GA = goma arábica, GX = goma xantana, SG = sin goma y C = Control.

Figura 13. Cambios en turbidez para bebidas incorporadas con sistemas de talla nanométrica, GA = goma arábica, GX = goma xantana GX-A = goma xantana-arábica. 43

Figura 14. Cambios en luminosidad asociados al empleo de gomas y aquellas formulaciones sin la adición de esta. GA = goma arábica, GX = goma xantana, SG = sin gomas y C = control. 45

Figura 15. Cambios en luminosidad en muestras incorporadas con sistemas de talla submicrónica Ncs = nanocápsulas, NE = nanoemulsión, GA = goma arábica, GX = goma xantana, GX-A = goma xantana-arabiga. 46

Figura 16. Cambios de cromaticidad en bebidas control. GX: goma xantana, GA: goma arábica, GX-A: goma xantana-arábica y C: control. 47

Figura 17. Cambios de cromaticidad asociados a la incorporación de sistemas de talla submicrónica. GA: goma arábica, GX: goma xantana, GX-A: goma xantana-arábica, Ncs: nanocápsulas, NE:nanoemulsión. 49

Figura 18. ΔE , asociada a la formulación y tiempo de almacenamiento para las muestras control. GA =goma arábica, GX = goma xantana, SIN = sin goma, C = control. Todos los resultados corresponden a tres repeticiones. 51

Figura 19. ΔE para muestras incorporadas con sistemas de talla submicrónica. GA = goma arábica, GX = goma xantana, GX_A= goma xantana-arábica, Ncs = nanocápsulas, NE = nanoemulsión. 52

Figura 20. Caroteno residual cuantificado en bebida con 30 % de jugo de fresa. GA = goma arábica, GX = goma xantana, GX_A= goma xantana-arábica, Ncs = nanocápsulas, NE = nanoemulsión. 53

Figura 21. Cambios en el contenido de antocininas totales para las muestras control en bebidas con 30 % de jugo de fresa, sin β -caroteno. 57

Figura 22. Comportamiento de las antocianinas totales durante el almacenamiento de bebidas con 30 % de jugo de fresa e incorporadas con sistemas de talla submicrónica con β -caroteno. 58

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Composición química de la fresa expresado en 100 g de porción comestible (Angulo, 2003).	6
Cuadro 2. Parámetros de estabilidad de los sistemas nanoestructurados.	28
Cuadro 3. Composición base de las bebidas con jugo de fresa.	30
Cuadro 4. Porcentaje de aditivos e ingredientes que se utilizaron en las soluciones.	30
Cuadro 5. Análisis de Varianza para la retención de Caroteno en bebida con 30% de jugo de fresa.	54
Cuadro 6. Constantes cinéticas de orden cero para degradación de β -caroteno.	55

RESUMEN

La fresa es un producto altamente perecedero, rico en vitamina C, antocianinas y otros compuestos bioactivos, razón por la que una de las formas de conservar sus características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales de tal manera que permitan mayores tiempos de comercialización es el desarrollo de bebidas preparadas con jugo de fresa. El objetivo de este trabajo fue establecer el efecto protector de nanocápsulas de α -tocoferol sobre la cinética de degradación de β -caroteno nanoencapsulado mediante la evolución en los cambios físicos y fisicoquímicos en una bebida de fresa almacenada en refrigeración. Las fresas objeto de este estudio fueron adquiridas libres de daños mecánicos, crecimiento de moho, de color rojo uniforme y de tamaño homogéneo. El jugo fue obtenido empleando un extractor eléctrico, las nanocápsulas de α -tocoferol y β -caroteno fueron preparadas por el método de emulsificación-difusión y las nano emulsiones por emulsificación convencional estas tuvieron tamaños de partícula > 300 nm, estas se incorporaron a los polisacáridos estabilizantes (goma arábica, goma xantana y la mezcla de estas), las bebidas se prepararon con 30 % de jugo de fresa, estabilizante, nanocápsulas y agua, se envasaron y pasteurizaron a 65 °C/5 min, para su posterior almacenamiento a 4 °C / 4 semanas, se evaluaron los cambios en turbidez, color, antocianinas totales, carotenoides, pH y acidez. Se observó que el empleo de mezcla goma arábica/xantana logró darle estabilidad a la bebida con menores variaciones en turbidez, además el empleo de sistemas antioxidantes de talla submicrónica contribuyó a mantener los compuestos bioactivos (antocianinas y carotenos) principalmente cuando se empleó nanoemulsión.

INTRODUCCIÓN

La evolución de la industria de los alimentos, en tecnologías emergentes con mejoras en los procesos y/o tratamientos que dan como resultados un incremento y/o mantenimiento de calidad y conservación. La demanda en la actualidad, de productos benéficos para la salud, ha traído como consecuencia el desarrollo de nuevas alternativas tecnológicas aplicables en el desarrollo de nuevos productos con diferentes usos y aplicaciones. En este sentido la nanociencia y la nanotecnología han tomado un papel preponderante (Barbosa, 2005). La nanotecnología ha crecido rápidamente en los últimos años y está teniendo un gran impacto en el desarrollo de nuevos materiales y productos. Las repercusiones tecnológicas en todo el mundo, serán un importante motor económico en el futuro previsible.

La nanotecnología ha sido considerada como una tecnología emergente, está relacionada con la introducción de nuevas dimensiones a la ciencia y la tecnología con la posibilidad de manipular átomos y moléculas a nivel nanométrico. 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 alimentos. Esta aún se encuentra en etapa inicial para muchas aplicaciones a nivel industrial, de tal manera que muchos de los beneficios aún están por estudiarse para poder difundirse más adelante (Miyazaki y col., 2007).

La encapsulación es una técnica ampliamente empleada en la industria farmacéutica y de alimentos que consiste en recubrir sustancias activas sólidas, líquidas o gaseosas mediante una pared sólida a temperatura ambiente (Gharsallaoui, 2007). La encapsulación permite que los materiales alimenticios resistan las condiciones de procesamiento y empaque mejorando la calidad en sabor, aroma, estabilidad, valor nutritivo y apariencia (Carrillo- Navas y col., 2011). Mora-Huertas y col (2010) establecieron que el nivel de seguridad y funcionalidad de los sistemas de talla

submicrónica se encuentran entre los intervalos de 1-1000 nm, siendo reportados valores óptimos en un intervalo entre 1-500nm (Zambrano-Zaragoza y col., 2011).

Los tocoferoles son los principales compuestos que exhiben actividad de vitamina E y son los antioxidantes naturales más importantes debido a su elevada actividad. Los antioxidantes interrumpen las reacciones en cadena que producen los radicales libres, los que pueden reaccionar con cualquier otra molécula como ácidos grasos de las membranas de las células, grasas, proteínas, vitaminas, ácidos nucleicos de los genes, etc. El β -caroteno es ahora ampliamente utilizado como un aditivo en la industria alimentaria para mejorar el color de ciertos alimentos y bebidas. Los estudios demuestran que tiene alta actividad antioxidante, además de las funciones benéficas para la salud, tales como la prevención y/o protección contra el cáncer, enfermedades cardiovasculares y adenomas colo - rectales (Qiu y col., 2009). Debido a su estructura altamente insaturada, los carotenoides son propensos a la degradación por la temperatura durante el procesamiento y almacenamiento (Achir y col., 2010)

La fresa cuenta con una gran variedad de macronutrientes como lo son las proteínas, los hidratos de carbono y micronutrientes funcionales como las vitaminas A, C, B, y fibra, además de una serie de nutrientes como las elagitaninas y quercitina que tienen efectos preventivos contra enfermedades cardiovasculares, cáncer y pérdida cognoscitiva (Angulo, 2003). Las antocianinas, responsables de su coloración roja, son absorbidas de forma eficiente por el cuerpo y tienen efectos antioxidantes (Oregon State University, 2008), gracias a este efecto los compuestos muestran una acción preventiva contra enfermedades cardiovasculares e infartos, inhiben el crecimiento de tumores y tienen efectos anti cancerígenos; algunos otros son utilizados para mejorar la agudeza visual y tratar desordenes circulatorios, diabetes y úlceras, además de que tienen propiedades anti-inflamatorias aparte de actividad antiviral y antimicrobiana.

CAPÍTULO 1. MARCO TEORICO

1.1 Generalidades de la fresa

La fresa (*Fragaria x ananassa*), pertenece a la familia de las *Rosaceae* en el género fragaría, es originaria de las regiones templadas del mundo y se caracteriza por tener tallos rastreros, nudosos y con estolones, hojas grandes trifoliadas, pecioladas, blancas y frutos rojos aromáticos (SAGARPA, 2005). La Figura 1, muestra la estructura de la planta y los frutos correspondientes a la fresa.

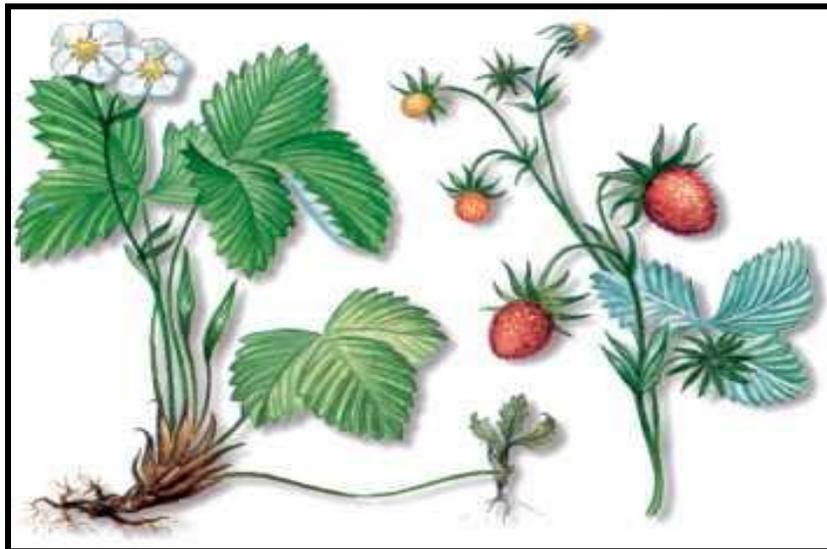


Figura 1. *Fragaria x ananassa* (Darrow, 1966).

Las fresas en realidad no son frutas, sino el final alargado del estambre de la planta; cuentan con más de 200 semillas en su piel las cuales no constituyen el medio normal de reproducción del vegetal ya que este se reproduce por medio de un estolón (IFAS, 2008) Estas “frutillas” pueden tener diferentes tamaños y formas dependiendo de la variedad, los más comunes son: achatada, esférica-cónica y de cuello cónico alargado (García, 1994). Se cosecha generalmente a mano, ya que es un fruto susceptible a

daño. La Figura 2 muestra las diferentes formas que presenta la fresa en relación a su estructura.

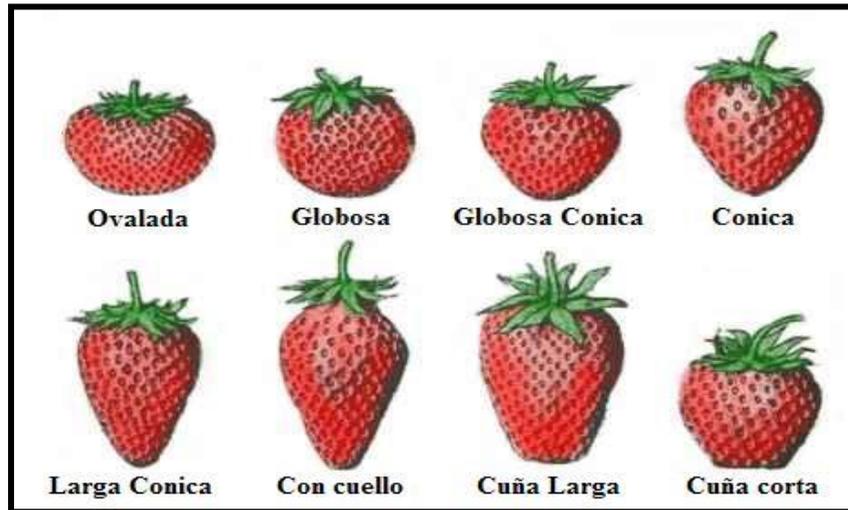


Figura 2. Diferentes formas de fresa (Darrow, 1966).

Después de la cosecha se recomienda llevarla a bajas temperaturas lo más pronto posible ya que el fruto sin tratar, solo cuenta con una vida de 2 o 3 días, esto por lo general se logra por medio de aire forzado a 1 °C y después se recomienda mantenerlo a condiciones atmosféricas óptimas (90-95% HR, 5-10%O₂ y 15-20% CO₂) y temperatura adecuada (0°C) para que el producto tenga una vida útil que oscile entre los 7-10 días (Siller-Cepeda et al.,2002). La fresa se caracteriza por tener sabores dulce ácido, debido a que cuenta con una variedad de azúcares y ácidos orgánicos, cuya concentración oscila dependiendo la variedad.

1.1.1 Bebidas

1.1.2 Jugo de fruta

Es el producto líquido sin fermentar, pero fermentable, obtenido al exprimir frutas en buen estado, debidamente maduras y frescas o frutas que se han mantenido en buen estado por procedimientos adecuados, inclusive por tratamientos de superficie

aplicados después de la cosecha, clarificado o no, y sometido al tratamiento adecuado que asegura su conservación en el envase. No debe contener corteza ni semillas, ni materia extraña objetable. (NOM-173-SCFI-2009). El Cuadro 1, muestra la composición química de la fresa, resaltando en ésta su contenido de micro nutrimentos y haciendo énfasis en el contenido de Vitamina C de este fruto, así como el contenido de pro-vitamina A y el contenido de minerales como el fosforo y el selenio.

Cuadro 1. Composición química de la fresa expresado en 100 g de porción comestible (Angulo, 2003).

Energía (Kcal)	50
Agua (g)	84
Hidratos de carbono (g)	11.6
Fibra dietética (g)	3.8
Grasas (g)	0.1
Proteínas (g)	1.0
Vitaminas	
B (mg)	29.3
C (mg)	94.1
A (mg)	44.8
Minerales	
Fosforo (mg)	31.5
Hierro (mg)	0.6
Calcio (mg)	1.1
Selenio (mg)	14

El jugo debe prepararse mediante procedimientos que mantengan las características físicas, químicas, organolépticas y nutrimentales esenciales de la fruta de que procede. Podrán añadirse pulpa y células (en el caso de los cítricos), la pulpa y las células son las envolturas del jugo obtenido del endocarpio) obtenidas por procedimientos físicos adecuados del mismo tipo de fruta. (NOM-173-SCFI-2008).

1.1.3 Composición

Según la norma general del CODEX *alimentarius* para zumos (jugos) y néctares de frutas (Codex stan 247-2005) para jugos de frutas exprimidos directamente, el nivel de °Brix será el correspondiente al del jugo exprimido de la fruta y el contenido de sólidos solubles del jugo de concentración natural no se modificará salvo para mezclas del mismo tipo de jugo.

La preparación de jugos de frutas que requieran la reconstitución de jugos concentrados deberá ajustarse al nivel mínimo de °Brix con exclusión de los sólidos de cualesquiera ingredientes y aditivos facultativos añadidos. Si en el Cuadro no se ha especificado ningún nivel, el nivel mínimo de °Brix se calculará sobre la base del contenido de sólidos solubles del jugo de concentración natural utilizado para producir tal concentrado.

1.1.4 Producción

México registró en 2008 una superficie cultivada de fresa de 6 mil 214 hectáreas, obteniéndose una producción de 208 mil 932.25 toneladas métricas, por lo que alcanzó un rendimiento promedio de 33.86 toneladas por hectárea.

Las principales entidades productoras de esta frutilla son Baja California, Guanajuato, Estado de México y Michoacán; en esta última entidad se concentra la mayor producción nacional con una superficie cultivada de 3 215 Ha. y una producción superior a las 106 905 Ton., seguido por el estado de Baja California con una superficie de 1 355 Ha. y una producción de 70 410 Ton.; el estado de Guanajuato con una superficie de 1 048 Ha. y una producción de 18 065 toneladas y por último el estado de México con una superficie de 244 Ha. y una producción de 5 068 Ton. A

continuación, en la Figura 3 se expresa en porcentaje el valor de la producción de cada entidad productora de fresa.

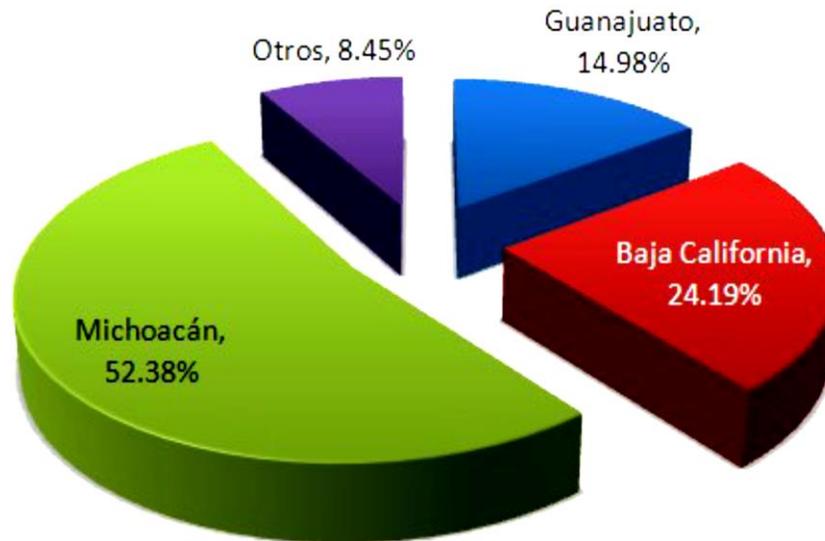


Figura 3. Estados con producción significativa de fresa en México (Dirección General de Desarrollo Económico, 2002).

1.2 Tratamiento térmico

El procesamiento térmico se usa para provocar la muerte de varios microorganismos patógenos, pero también ocasiona efectos indeseables, como la reducción de ciertos valores nutrimentales. El ácido ascórbico (vitamina C) y la tiamina y riboflavina (vitamina B1 y B2) se destruyen parcialmente en el procesamiento térmico. La reducción de estos constituyentes deseables también puede constituir un parámetro cinético, para la esterilización y la pasteurización (Geankoplis, 1998).

Los jugos de frutas son sensibles al calor y su viscosidad aumenta notablemente al concentrar la solución. Además, la materia sólida en suspensión en los jugos de frutas tiende a adherirse a la superficie de calentamiento, causando sobrecalentamientos que conducen a carbonizaciones y deterioro del material (Geankoplis, 1998).

1.2.1 Pasteurización

Se emplea para matar organismos que presentan relativamente menor resistencia térmica, comparados con aquellos para los cuales se utilizan los procesos de esterilización más drásticos.

Para pasteurizar alimentos tales como leche, jugos de frutas y cerveza, se utilizan los mismos procedimientos matemáticos y gráficos que para los procesos de esterilización, a fin de alcanzar el grado de esterilización deseado en la pasteurización. Los tiempos que se necesitan son mucho menores y las temperaturas de pasteurización son mucho más bajas. Generalmente, el valor del factor de calidad se da a 150 °F (65.6 °C) o a una temperatura similar en lugar de los 250 °F (121 °C) de la esterilización (Geankoplis, 1998)

El jugo de fruta es una bebida popular en todo el mundo. La pasteurización es el tratamiento térmico comúnmente utilizado para extender la vida útil de los jugos de fruta, por la inactivación de microorganismos y enzimas. Se puede llevar a cabo mediante llenado en caliente siempre y cuando se mantenga el proceso de pasteurización. En el proceso de llenado en caliente, el jugo se calienta hasta la temperatura deseada (normalmente entre 92 y 105 °C) durante 15-30 s (Spinelli et al., 2010). La mayoría de los microorganismos no pueden sobrevivir a la temperatura, a excepción de algunas bacterias, hongos y levaduras, como *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Bajo algunas condiciones las esporas de microorganismos supervivientes pueden crecer causando el deterioro de jugo durante el almacenamiento. Debido a que la temperatura de esterilización se eleva sólo gradualmente mediante tratamientos térmicos convencionales, la resistencia térmica de estos microorganismos puede aumentar a medida que la temperatura aumenta

Aunque el tratamiento térmico excesivo inactiva los microorganismos de forma eficiente y prolonga la vida útil de jugo, da lugar a la degradación de color, sabor, textura, y calidad nutricional de jugo (Qin et al., 1995). En contraste con el

calentamiento convencional, el tiempo de procesamiento corto y un calentamiento uniforme son las principales ventajas de la radio-frecuencia y de calentamiento por microondas, ya que el calor se genera volumétricamente el interior del alimento mediante la conversión de alternar la energía del campo eléctrico a energía térmica (Coronel et al., 2008 y Guo et al., 2011). La Radio-frecuencia o calentamiento por microondas ha demostrado ser eficaz contra una amplia gama de microorganismos (Giuliani et al., 2010), y también proporciona un mejor color, sabor, textura y nutrimentos (Coronel et al., 2003 y Gentry y Roberts, 2005).

1.2.2 Sensibilidad térmica de los materiales

Muchos productos, en especial los alimentos y otros materiales biológicos, son sensibles a la temperatura y se degradan cuando ésta sube o el calentamiento es muy prolongado. Entre ellos están los materiales farmacéuticos; productos alimenticios como leche, jugo de naranja y extractos vegetales; y materiales químicos orgánicos delicados. La degradación de los componentes está en función de la temperatura y del tiempo (Geankoplis, 1998).

1.2.3 Almacenamiento en refrigeración

El enfriamiento de materiales se basa en la eliminación del calor sensible y calor metabólico, es decir, la temperatura suele reducirse más o menos a un intervalo de 4.4 °C (40 °F); esto es, un poco por encima de la congelación. Los materiales pueden almacenarse más o menos entre una semana hasta varios meses, dependiendo del producto y de la atmósfera prevaleciente. Cada material tiene una temperatura óptima de almacenamiento en frío.

El calor se elimina por convección en la superficie del material y por conducción de estado no estacionario, en el propio material. Para eliminar este calor se utiliza el fluido que rodea al alimento o material biológico, que en muchos casos es aire

enfriado previamente por refrigeración de -1.1°C hasta $+4.4^{\circ}\text{C}$, dependiendo del material y de otras condiciones (Geankoplis, 1998).

1.3 Cambios fisicoquímicos

1.3.1 pH y acidez

El grado de acidez se reporta como ácido anhídrido, y aunque se determina en función del ácido en mayor proporción, no es concluyente debido a que puede contener otros aditivos que impartan acidez al producto. El pH es un parámetro que indica si una sustancia es ácida, neutra o básica; se calcula por la concentración de iones de hidrógeno, un factor que controla la regulación de muchas reacciones químicas, bioquímicas y microbiológicas. La escala de pH es de 0 a 14 y afecta a muchas propiedades funcionales como son el color, sabor y textura de los alimentos.

Ambas pruebas se basan en la determinación de iones hidrógenos, estos parámetros se encuentran íntimamente ligados, teniendo una incidencia directa en la conservación de los alimentos. A medida que la fruta madura, el pH se incrementa y contribuye tener una menor acidez. Mientras que, cuando se incrementa la concentración, la acidez aumenta debido al aumento de los iones presentes en la solución de hidrógeno; los iones de hidrógeno determinan el grado de acidez. Como la concentración de iones de hidrógeno reducen el valor de pH se espera que este aumente (Nadya *et al.*, 2012).

El intervalo general de pH para los jugos de frutas es 2 a 5 y puede variar entre 3 y 4 respectivamente. El valor medio de pH para las verduras no ácidas es ligeramente más de 6 (Ranganna, 1984)

1.3.2 °Brix

La norma oficial NMX-F-103-1982 para alimentos frutas y derivados dice que es el porcentaje de sólidos disueltos en un producto derivado de las frutas o de un líquido azucarado. Este método se basa en la propiedad de los líquidos de refractar la luz en proporción a su contenido de sólidos solubles totales.

1.3.3 Cinética de degradación de compuestos termolábiles

La tecnología de procesamiento afecta significativamente la calidad y la vida útil de un producto. Tradicionalmente, las técnicas térmicas se aplican en la elaboración de alimentos y conservaciones (Jabbar et al., 2014). Estos tratamientos no sólo inactivan enzimas y microorganismos que garanticen la seguridad alimentaria y la mejora de la vida útil del producto, sino también disminuyen el deterioro y/o agotamiento de los nutrimentos de los alimentos, especialmente los antioxidantes (Abid et al., 2014 y Rawson et al., 2011). Por lo tanto, son de gran utilidad para preservar estos compuestos fitoquímicos y satisfacer la demanda de los consumidores de alimentos nutritivos mínimamente procesados.

La decoloración debido al oscurecimiento enzimático es un problema importante en los jugos de frutas y vegetales (Abid, et al., 2014). Las enzimas comúnmente involucradas en reacciones de oscurecimiento en jugos de frutas son, polifenoloxidasas (PPO) y peroxidasa (POD). El sabor y el color marrón indeseable en el producto es el resultado de la oxidación de compuestos fenólicos por PPO y / o POD (Chen et al., 2000, Sapers, 1993 y Tomás-Barberán y Espín, 2001). Para garantizar la calidad del producto final, estas enzimas necesitan ser inactivadas durante el procesamiento y almacenamiento de jugos de frutas.

El color es uno de los atributos sensoriales más importantes en los alimentos. Debido a ello, esta propiedad visual es la primera evaluada por los consumidores. En los productos de fresa, su color rojo brillante atractivo, es debido principalmente a la

presencia de compuestos fenólicos, las antocianinas específicamente. Sin embargo, estos compuestos son inestables y fácilmente susceptibles a la degradación durante el almacenamiento, incluso en aquellos productos que han sido pasteurizados previamente (Garzón y Wrolstad, 2002 y Holzwarth et al., 2012). Aparte de deterioro microbiano, las pérdidas de color pueden ser producidas por la oxidación enzimática y reacciones de oscurecimiento no enzimático. Las oxidaciones enzimáticas son catalizadas por oxidorreductasas, tales como la polifenoloxidasas (PPO) o peroxidasa (POD), entre otros, que degradan compuestos fenólicos a amarillo indeseable, marrón, o pigmentos negros, responsables de la decadencia de color. Por otra parte, las antocianinas también están involucradas en asociaciones complejas, incluyendo reacciones con pigmentación, la auto-asociación, y de polimerización que producen pigmentos derivados y cambios de color durante el almacenamiento.

1.4 Factores de calidad

1.4.1 Color

El color es uno de los principales parámetros que se tienen en cuenta durante la evaluación del producto por parte del consumidor, quien juzga la frescura y calidad del producto y en función a este, toma su decisión de compra (Lenart *et al.*, 2014). Es uno de los criterios de elección que actúa como indicador cuantificador de la vida útil del producto (Brennan *et al.*, 2000). Este atributo puede ser perdido o alterado durante el procesamiento, dependiendo del contenido de agua y del desarrollo de reacciones de oscurecimiento enzimático, debido a procesos fisiológicos que tiene lugar durante la maduración y que se ve influenciado por las prácticas de cosecha y tratamientos posteriores.

En los últimos años ha habido un aumento en el consumo de bebidas de frutas con alto contenido de antioxidantes, tales como rojo, naranja, uva, zumos de bayas y de la granada, debido a las propiedades saludables de los pigmentos naturales presentes en estos frutos, tales como antocianinas (Kończak y Zhang, 2004). Desafortunadamente,

las antocianinas son inestables y susceptibles a la degradación, conduciendo a un color marrón durante el procesamiento y almacenamiento. El deterioro color primario en zumos de frutas que contienen antocianinas se produce como resultado de la degradación de antocianinas, la polimerización y la subsiguiente formación de pigmentos marrones (Somers y Evans, 1986). Estos cambios de color afectan en gran medida el comportamiento del consumidor y el resultado en una pérdida de la comercialización de productos de granada procesados.

El tratamiento térmico es el método más común para extender la vida útil de los jugos de frutas mediante la inactivación de microorganismos y enzimas. El tratamiento térmico justo después de extraer el jugo inhibe las polifenoloxidasas (PPO) nativas, Estas enzimas causan la formación de color marrón mediante la oxidación de los polifenoles (Skrede, Wrolstad, y Durst, 2000). Sin embargo, los tratamientos térmicos convencionales a menudo conducen a cambios perjudiciales en las propiedades sensoriales y nutritivas de los jugos. Actualmente los procesos de pasteurización se llevan a cabo en intercambiadores de calor considerando condiciones promedio de tiempo-temperatura de 72 °C / 15 s. (Geankoplis, 1995).

1.4.2 Turbidez

La turbidez se mide en Unidades Nefelométricas de turbidez, o *Nephelometric Turbidity Unit* (NTU). El instrumento usado para su medida es el nefelómetro o turbidímetro, que mide la intensidad de la luz dispersada a 90 grados cuando un rayo de luz pasa a través de una muestra de agua o de alguna disolución. 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 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, 2000)

Los métodos de dispersión de luz, miden indirectamente las propiedades de una solución, dispersión o suspensión en consecuencia proporciona la medida más directa de la concentración de partículas polidispersas en dicha solución. Se utiliza ampliamente en la industria de alimentos para monitorear la concentración o el cambio de algunos materiales importantes. La turbidez de las dispersiones depende principalmente de la forma, tamaño, y la composición mineral de las partículas. También depende de su índice de refracción relativo y, en cierta medida, en el color de la fase líquida. Sin embargo, el color de la fase líquida, la composición mineral, y el índice de refracción relativo de sólidos en un jugo puede suponerse que es muy similar para una misma especie de fruta. Por lo tanto, los valores de turbidez deben ser utilizados para discriminar entre los jugos de la misma especie de fruta, pero con diferente concentración, forma, y tamaño de las partículas en suspensión. Intuitivamente, estos parámetros parecen estar relacionadas con la concentración volumétrica de partículas sólidas que son más propensos a ser retenido por una membrana de micro filtración.

1.5 Antioxidantes

Los antioxidantes pueden prevenir la formación o difusión de radicales libres. Los antioxidantes nutracéuticos comunes incluyen los tetraterpenos (carotenoides y xantofilas) en muchas frutas y variedad de alimentos vegetales. Los tetraterpenos, específicamente actúan a través de su capacidad antioxidante que previene la iniciación de estos radicales.

1.5.1 Antocianinas

El término, antocianina, acuñado por Marquart en 1835, se deriva de las palabras griegas "*Anthos*" flor y "*kyanos*" que significa azul, respectivamente, y se utiliza para designar los pigmentos azules de flores (Marquart, 1835). Las antocianinas son un grupo de compuestos fenólicos que se encuentran en frutas, verduras, muchas flores, y granos, y en cierta medida en las hojas, tallos y raíces de plantas. Estos son

responsables de la coloración rosa salmón, naranja, rojo, violeta, y colores azules. Se han utilizado de forma segura como colorantes naturales en los alimentos procesados.

En los EE.UU., los colorantes se preparan a partir de frutas o se añaden en los jugos de verduras utilizando sólo métodos físicos para uso alimentario. Además del color, el interés en ellos, también es debido su alto poder antioxidante, anti-mutagénico, antimicrobiano, anti-obesidad, y para ciertas actividades antivirales. (Fossen y col, 1998).

1.5.2 β - Caroteno

El β -caroteno, en comparación con todos los otros carotenoides, se cita a menudo como el inhibidor más potente de los radicales de oxígeno, aunque el debate científico continúa acerca de si los carotenoides, xantofilas, o la vitamina E, son los antioxidantes más eficaces para los seres humanos, aunque sí se sabe que el β -caroteno es el carotenoide más abundante en la dieta. Los carotenoides son altamente conjugados de lípidos solubles fitonutrientes, que son responsables de la naranja, amarillo, rojo y colores en las frutas y hortalizas. Más de 600 carotenoides diferentes han sido descritos hasta ahora, de los cuales el β -caroteno es el más significativo. En humanos, estos compuestos adquieren efectos preventivos contra las principales enfermedades como carcinomas, arteriosclerosis, enfermedades cardiovasculares, degeneración macular y otros trastornos relacionados con la edad. El β -caroteno ha sido un tema de extensa investigación debido a su actividad de provitamina A y propiedades antioxidantes.

También se ha establecido la importancia de la dieta de β -caroteno como provitamina A (precursores de la vitamina A como el alfa caroteno, beta caroteno y criptoxantina beta) (Britton y Jachik de 2009, Qiu et al., 2009 y Sathya et al., 2014). El β -caroteno es un compuesto liposoluble que se encuentra naturalmente en muchas frutas, flores, granos, aceites, vegetales, raíces, hojas y semillas, y en la mayoría de los casos es responsable de coloraciones rojas, naranjas y amarillas (Mellado, Hornero, 2016). El

sistema de doble enlace conjugado de β -caroteno determina las propiedades fotoquímicas y reactividad química que forman la base de la mayor parte de sus funciones, la absorción de la luz es la base de la detección y el análisis. La excitación, la transferencia de energía y enfriamiento están relacionadas con las funciones de protección en los ojos y la piel, que son esenciales para la visión y el crecimiento (Haftel y col., 2015, Petrogianni y col., 2014 y Zaccari y col., 2015). La susceptibilidad de la cadena de polieno rico en electrones a la degradación por reactivos electrófilos y radicales libres oxidantes es una característica fundamental de β -caroteno como antioxidante o prooxidante (Phan-Thi, Durand, Prost, Prost, y Wache, 2016). Actúa como antioxidante al eliminar los radicales peroxilo, lo que inhibe la peroxidación lipídica (Majumdar, Roy, Bejjanki, y Bhaskar, 2015), que ofrece protección contra enfermedades como el cáncer y enfermedades del corazón y hace más lento el proceso de envejecimiento (Akinosho y mimbre, 2015, Brabcová et al., 2013, Rodríguez-Amaya y Kimura, 2004 y Sricharoen et al., 2015).

1.5.3 α - Tocoferol

La vitamina E es un antioxidante soluble en lípidos se considera a menudo a alfa-tocoferol (Ne Cheong et al., 2008). El α -tocoferol es uno de muchos antioxidantes naturales ampliamente utilizados en la administración de suplementos de vitamina, la alimentación, cosmética y farmacéutica (Constantinides et al., 2006). La mayoría de estos antioxidantes son casi insolubles en agua o muestran muy baja solubilidad en agua. Esta escasa solubilidad en agua ha hecho que su uso genere una problemática en la formulación de alimentos (Tan y Nakajima, 2005); y en formas farmacéuticas clásicas, lo que lleva a la insuficiente biodisponibilidad (Muller y Peters, 1998).

El α -tocoferol es la forma más abundante y biológicamente activa de la vitamina E. Como antioxidante lipofílico, puede contribuir a la prevención de enfermedades crónicas asociadas con el estrés oxidativo (Brigelius-Flohe y Traber, 1999). Sin embargo, sus aplicaciones en los sistemas de alimentos son limitados, debido a su sensibilidad al calor, oxígeno y luz y también debido a su naturaleza hidrofóbica.

Su hidrosolubilidad y estabilidad deben mejorarse, utilizando un sistema de transportador efectivo como encapsulación. Varias moléculas antioxidantes se han utilizado en intentos de mejorar la estabilidad oxidativa de aceite y proteína en emulsiones (Di Mattia et al., 2009, Jayasinghe et al., 2013 y Vijanen, 2005). Su eficacia depende de factores, tales como la polaridad, la ubicación, la movilidad y la formación de la formación de micelas, así como el tipo de emulsionantes en los sistemas (Shahidi y Zhong, 2011).

1.5.4 Nutracéuticos

No hay una definición oficial o internacional para alimentos funcionales o nutraceuticos. Una definición propuesta por el Instituto de Medicina de los Estados Unidos es “cualquier modificación en alimentos o ingredientes para estos mismos, que puedan proporcionar un beneficio para la salud, más allá de los nutrientes que tradicionalmente contienen” los nutraceuticos también se definen como “compuestos bioactivos derivados naturales que pueden encontrarse en los alimentos, suplementos alimenticios, productos herbales y tienen efectos positivos para la salud, preventivos o propiedades medicinales.

Los nutraceuticos se pueden definir como cualquier sustancia que es un alimento o una parte de un alimento y proporciona beneficios médicos o de salud, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedad. Los nanomateriales se pueden utilizar como bioactivos en alimentos funcionales y nutraceuticos (Chau et al., 2007). La reducción del tamaño de las partículas de bioactivos puede mejorar la disponibilidad, propiedades de suministro, y la solubilidad y la actividad biológica. Estos se deben a que la actividad biológica de una sustancia depende de su capacidad para ser transferida través de las membranas intestinales a la sangre.

Ácidos Omega-3-grasos tienen ciertos beneficios en especies de bacterias probióticas, licopeno, vitamina D2 y β -caroteno tienen demostrado potencial de éxito comercial en

los estudios de investigación (El Sohaimy 2012). El mantenimiento de la estabilidad de los nutraceuticos en todo el proceso de producción es una tarea desafiante. El advenimiento de la nanotecnología ayudará a superar este reto para el beneficio de la industria (Cushen et al., 2012).

1.6 Nanotecnología

El término "nano" se deriva de la palabra griega que significa enano (Sangamithra y Thirupathi 2009). El concepto de nanotecnología fue primeramente mencionada por el premio nobel de Física Richard Feynman en 1959; Sin embargo, el término "nanotecnología" fue acuñado en 1974 por el fallecido Norio Taniguchi (Warad y Dutta 2005). La nanociencia se define como el estudio de los fenómenos y la manipulación de materiales atómicos, moleculares, y escalas macromoleculares, donde las propiedades difieren de los que están en una escala mayor (Mannino y Scampicchio 2007).

La nanotecnología se ha definido provisionalmente en relación con los materiales, sistemas, y los procesos que operan a una escala de 100 nanómetros (nm) o menos. Los EE.UU en la Iniciativa Nacional de Nanotecnología. Ha definido la nanotecnología como "la comprensión y el control de la materia a las dimensiones de aproximadamente 1 a 100 nm, en fenómenos singulares que permiten nuevas aplicaciones; que abarca la ciencia a nanoescala, la ingeniería y la tecnología, la nanotecnología implica proyección de imagen, de medición, modelado y la manipulación de la materia a nano escala "(Chen et al. 2006a). En 2009, la European Food Safety Authority (EFSA), definió a nanomaterial como "cualquier forma de un material que tiene una o más dimensiones en la nanoescala "y nanopartículas como" una entidad discreta que tiene las tres dimensiones en la nanoescala "(FAO / OMS 2010).

En la Industria Alimentaria. Los alimentos que han sido cultivados, producidos, procesados o envasados utilizando técnicas de nanotecnología o herramientas a los

que fabrican los nanomateriales, es decir, cualquier material que se produce intencionalmente en la nanoescala para tener específicas propiedades o composiciones específicas, se han añadido se denomina como nano-alimentos (Morris 2007). En realidad, los nanoalimentos han sido parte de la elaboración de alimentos desde hace siglos, naturalmente existen muchas estructuras de alimentos a escala nanométrica (Shekhon 2010).

1.6.1 Definición de nanopartículas poliméricas

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, 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)

1.6.2 Nanoencapsulación

La Nanoencapsulación en alimentos es la incorporación de ingredientes en pequeñas vesículas o paredes con nano (o submicrónico) tamaños de material (Surassmo et al. 2009). La nanoencapsulación en forma de micelas, liposomas, o sistemas de soporte a base de biopolímeros ha sido utilizada para desarrollar los sistemas de suministro de aditivos y suplementos para su uso en alimentos y productos de bebidas.

La nanoencapsulación es la extensión de la microencapsulación, que ha sido utilizado por la industria de alimentos para los ingredientes alimentarios y aditivos por muchos años. Estos nanomateriales ofrecen varias ventajas, tales como la preservación de los

ingredientes y aditivos durante el procesamiento o almacenamiento, enmascarar sabores desagradables y sabores, el control de la liberación de los aditivos, mejor dispersión de agua insoluble, ingredientes alimentarios y aditivos, y una mejor absorción de los nutrientes encapsulados y los suplementos (Chen et al 2006, Weiss et al 2006; Momin et al 2013).

La protección de los compuestos bioactivos, tales como vitaminas, antioxidantes, proteínas, y lípidos, así como hidratos de carbono, se pueden conseguir utilizando esta técnica para la producción de alimentos funcionales con una mayor estabilidad y funcionalidad, mejora absorción y biodisponibilidad. Se ha abierto un amplio campo de aplicación en productos alimenticios que incorporan vitaminas de tamaño nanométrico, nutraceuticos, antimicrobianos, antioxidantes, ingredientes funcionales, etc. Después del envasado de los alimentos, la nanoencapsulación es actualmente el mayor campo de aplicación de la nanotecnología en la industria alimentaria, y el número de productos basados en la tecnología disponibles en el mercado. La nanoencapsulación puede reducir la cantidad de ingredientes activos necesarios en la formulación y en los costos de producción. (Huang et al. 2009).

1.6.3 Método de Emulsificación-Difusión

La preparación de nanocápsulas por el método de emulsificación-difusión permite la nanoemulsificación de sustancias activas tanto lipófilas hidrófilas. El procedimiento experimental realizado para conseguir esto requiere 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-Checot y col., 2008). El tamaño de las nanocápsulas preparadas por este método es aproximadamente 150-200 nm (Quintanar-Guerrero y col., 2005).

Cuando el objetivo es la nanoencapsulación de una sustancia activa lipófila, 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)

La Figura 4 representa la estructura general que muestran las nanocápsulas cuando son observadas en un microscopio electrónico de barrido, estas representan la estructura de nanocápsulas y fueron reportadas por Zambrano-Zaragoza et al. (2011) para la optimización de las condiciones de preparación de nanocápsulas de uso alimenticio, en ésta, se observa la esfera que se encuentra compuesta por una pared presumiblemente de poli- ϵ -coprolactona, mostrando el lugar donde se encuentra encapsulado el activo.

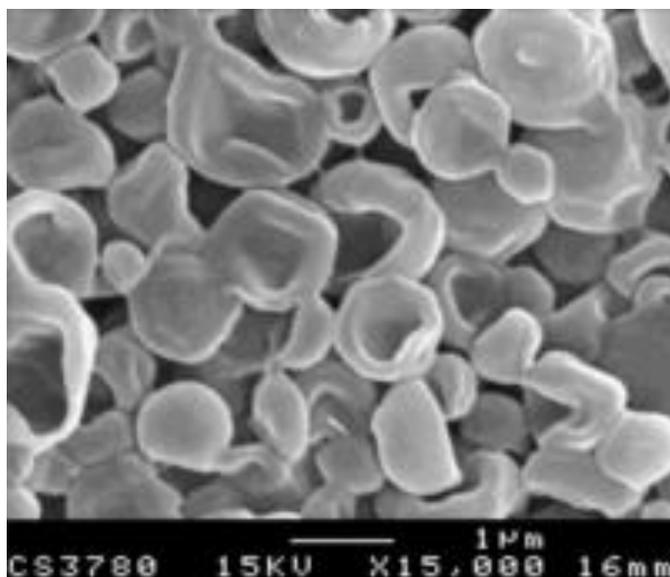


Figura 4. Morfología de nanocápsulas (Zambrano-Zaragoza et al., 2011)

1.6.4 Poly - 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, es de bajo costo en comparación con otros poliésteres biodegradables, lento para degradarse en medios acuosos, e inofensivos en el medio ambiente (Sahoo y col., 2010; Grillo y col., 2012).

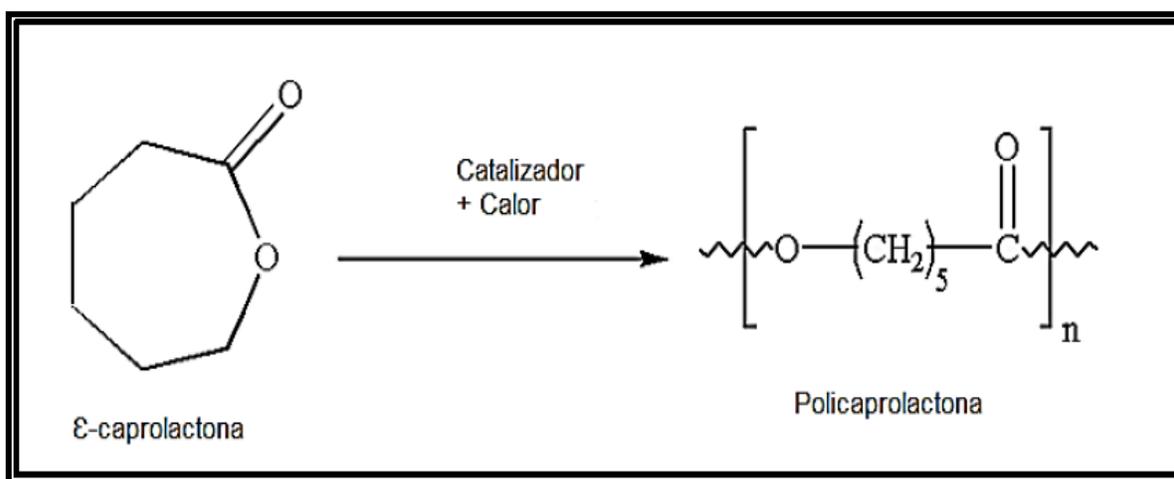


Figura 5. Polimerización de apertura de anillo de ϵ -caprolactona a Policaprolactona (Elzein y col., 2004).

La degradación de la 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.

1.6.5 Nanoemulsiones

Existe un considerable interés en la fortificación de alimentos y bebidas con vitaminas solubles en aceite con el fin de mejorar la salud y el bienestar humano (Velikov y Pelan, 2008). La vitamina E se refiere a un grupo de compuestos bioactivos solubles en aceite que incluye diversos tocoferoles y tocotrienoles (Zigoneanu, Astete, y Sabliov, 2008). Nutricionalmente la forma más importante de la vitamina E es el α -tocoferol y por lo tanto ha habido un gran interés en la incorporación de este compuesto en productos alimenticios. Sin embargo, existen numerosos desafíos asociados con la incorporación de α -tocoferol en productos de alimentos y bebidas funcionales, debido a su escasa solubilidad en agua, la inestabilidad química (al oxígeno, la luz y el calor) y biodisponibilidad oral variable. La estabilidad química pobre de α -tocoferol puede ser superado en gran medida mediante el uso de la forma esterificada, es decir, el acetato de α -tocoferol (Mayer et al., 2013 y Zigoneanu et al., 2008). Muchos de los otros retos asociados con el uso de α -tocoferol se pueden superar mediante la incorporación en los sistemas de suministro coloidales que pueden dispersarse en alimentos y bebidas de base acuosa.

Los sistemas de entrega basados en emulsión, tales como emulsiones y nanoemulsiones, son buenos candidatos para entregar compuestos bioactivos solubles en lípidos, ya que se pueden producir usando ingredientes de alimentos naturales utilizando métodos de producción simples, y pueden ser diseñados para aumentar la dispersión del agua y la biodisponibilidad (Huang, Yu, y Ru, 2010). Para aplicaciones en la industria alimentaria, los sistemas de entrega basados en emulsión deben ser estabilizados por alguna forma de emulsionante de calidad alimentaria, tales como proteínas, polisacáridos, fosfolípidos, o tensioactivos (Chu et al., 2007, Kralova y Sjoblom, 2009, McClements, 2011 y Mirhosseini et al., 2008). Cada uno de estos emulsionantes tiene sus propias ventajas y desventajas para aplicaciones particulares, y por lo tanto es importante establecer el emulsionante más apropiado para productos específicos.

Los biopolímeros en alimentos tienen diferentes capacidades emulsionantes debido a diferencias en sus estructuras moleculares que afectan a sus características de adsorción durante la homogeneización, y su capacidad para estabilizar las gotitas de la emulsión una vez formados. Por lo tanto, los principales factores que influyen en el tamaño inicial de las gotitas de aceite en nanoemulsiones en agua producidos por homogeneización a alta presión, es decir, composición de la fase de aceite, el tipo de emulsionante, y la concentración de emulsionante. Puesto que los alimentos pueden estar expuestos a duras condiciones durante el procesamiento de alimentos, almacenamiento, transporte y utilización que también examinó la influencia de diversos cambios en su estabilidad, es decir, pH, fuerza iónica, y la temperatura. Finalmente, se comparó la emulsión y propiedades estabilizantes de los dos biopolímeros (goma árabe y de suero de proteína) a dos pequeñas moléculas surfactantes (lecitina y Q-Naturale) caracterizado previamente (Ozturk et al., 2014). En esta investigación, la fase de aceite consistía en una mezcla de acetato de vitamina E y aceite de naranja, que sería adecuado para su utilización en la industria de bebidas. Este aceite de sabor se utilizó para reducir la tensión interfacial y la viscosidad, y de ese modo facilitar la formación de la emulsión (Piorkowski y McClements, 2014). Este estudio tiene implicaciones importantes para la utilización de emulsionantes naturales en el desarrollo de sistemas de administración de base de emulsión de etiqueta amigable para las vitaminas solubles en aceite y otros nutraceuticos lipofílicos. Las nanoemulsiones grado alimenticio son vehículos potenciales de compuestos lipofílicos lábiles tales como β -caroteno, pero se necesita mucho trabajo para mejorar estabilidad física y química.

1.6.6 Caracterización de sistemas de talla submicrónica

1.6.7 Tamaño de partícula e índice de polidispersión

El tamaño de partícula de un sistema de talla submicrónica puede ser determinado por diferentes métodos, siendo este un parámetro importante ya que determinará en gran medida las necesidades de preparación en ámbito de la investigación y/o

industrial de tal manera que el índice de polidispersión indica la distribución de las partículas en un medio continuo como el agua empleada en la industria de los alimentos como fase continua. (Black et al. 1996), entre más estrecha sea la distribución de partículas mejor posibilidad se tendrá de garantizar que los sistemas se comportarán en relación a la talla de partícula establecida.

De acuerdo con Mora-Huertas, (2010) tamaños de partículas de entre 10-500 nm pueden ser considerados como sistemas de talla nanométrica y la distribución de tamaño de partícula debe tener índices de polidispersión menores a 0.5 (Weiss et al., 2008).

1.6.8 Potencial zeta

El potencial zeta (ζ) es una propiedad muy importante en relación al criterio de estabilidad de sistemas coloidales, es una propiedad física que se relaciona con el grado de repulsión entre las partículas cargadas en una dispersión coloidal, el ζ puede tomar valores positivos o negativos dependiendo de la carga superficial de las partículas (Zhang et al., 2008; Zambrano-Zaragoza et al., 2011). Además, una reducción con aproximación a cero de los sistemas nanoparticulados implican una disminución de la estabilidad física del sistema. Un potencial zeta $\geq | \pm 60 |$ es indicativo de una excelente estabilidad. Sistemas con buena estabilidad se consideran aquellos con potenciales zeta $\geq | \pm 30 |$ y aquellos con valores $\geq | \pm 15 |$, son sistemas inestables ya que tienden a mostrar coalescencia. (Freitas y Müller, 1998).

1.7 Aplicaciones de la nanotecnología en la industria de alimentos

Ha habido un interés creciente en el desarrollo y las aplicaciones de la nanotecnología en los sectores alimentario. En muchas investigaciones los esfuerzos han puesto de manifiesto la posibilidad de que la nanotecnología podría utilizarse potencialmente en una amplia gama de aplicaciones de alimentos, incluyendo la elaboración de alimentos, la purificación del agua, la mejora de los suplementos, la entrega de

compuestos bioactivos, envasado de alimentos y almacenamiento, de seguridad alimentaria, desodorización, y el aumento de la variedad de texturas de alimentos, colores y sabores (Chau et al., 2007; Cushen et al., 2012;. Sanguansri y Agustín 2006; Sekhon 2010; FAO / OMS 2010). Muchas aplicaciones en los sectores de alimentos se refieren a la manipulación de nanoestructuras naturales de algunas sustancias de origen natural (por ejemplo, proteínas, almidones, lípidos y azúcares).

La investigación de la nanotecnología alimentaria podría implicar cambios en las nanoestructuras en las escalas nano y micrométricos durante el procesamiento de alimentos, la recristalización de moléculas de amilosa gelatinizados en estructuras a nanoescala, una mayor eficiencia en partículas de almidón como un adhesivo, y el estudio de la nanoestructura de las gotitas de leche homogeneizada (Sekhon 2010).

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL

2.1 Problema

Efecto protector de nanocápsulas de α -tocoferol sobre la degradación de β -caroteno de tamaño submicrónico en una bebida de fresa refrigerada.

2.2 Objetivo general

Establecer el efecto protector de nanocápsulas de α -tocoferol sobre la cinética de degradación de β -caroteno nanoencapsulado mediante la evolución en los cambios físicos y fisicoquímicos en una bebida de fresa almacenada en refrigeración que contribuyan a mantener su calidad.

2.2.1 Objetivos particulares

- 1) Analizar la cinética de degradación de β -caroteno de tamaño submicrónico mediante pruebas espectrofotométricas y colorimétricas en función de la concentración de inicial, estableciendo el efecto protector de las nanocápsulas de α -tocoferol durante el almacenamiento de jugo de fresa.
- 2) Evaluar el efecto de la incorporación de nanocápsulas de α -tocoferol y β -caroteno en jugo de fresa determinando los cambios en turbidez y color asociándolos a la estabilidad de la formulación durante 4 semanas de almacenamiento refrigerado.
- 3) Determinar los cambios fisicoquímicos y de degradación de antocianinas como indicadores de cambios de calidad en jugo de fresa durante el almacenamiento refrigerado.

2.3 Materiales y métodos

A continuación, se mostrarán los materiales y la metodología utilizada durante la realización del estudio propuesto en relación a los factores experimentales y variables de respuesta consideradas con la finalidad de evaluar el efecto del α -tocoferol en la conservación de jugo de fresa y la degradación de β -caroteno.

2.3.1 Preparación de nanoemulsiones y nanocápsulas

Las nanoemulsiones fueron preparadas empleando para ello una fase continua que contenía 2 % de alcohol polivinílico y una fase dispersa con 0.2 % de β -caroteno, con el fin de reducir el tamaño de partícula se llevó a cabo la homogenización con un sistema rotor/stator (IKA Ultra Turrax T50, USA) con útil de dispersión S 25 N-25 G, IKA, se emplearon 3 ciclos de homogenización a 10 000 rpm de 5 min cada uno.

La elaboración de las nanocápsulas de α -tocoferol y/o β -caroteno, se prepararon por el método de Emulsión - Difusión (MED), propuesto por Quintanar- Guerrero y col., 1998 y optimizado para activos alimenticios por Zambrano y col., 2011. Estos fueron proporcionados por en el Laboratorio de procesos de transformación y tecnologías emergentes en alimentos de la unidad de investigación multidisciplinaria. Estos sistemas poseían las siguientes características:

Cuadro 2. Parámetros de estabilidad de los sistemas nanoestructurados

Sistema	TP (nm)	IPD (nm)	ζ (mV)
Nanocápsulas (β - caroteno)	241 \pm 11	0.23 \pm 0.07	- 37 \pm 5
Nanocápsulas (α - tocoferol)	198 \pm 7	0.19 \pm 0.04	- 48 \pm 3
Nanoemulsión (β - caroteno)	202 \pm 9	0.29 \pm 0.09	- 52 \pm 2

2.3.2 Material biológico

La fresa fue adquirida en la central de abastos de Ecatepec, México, se seleccionó, tomando en cuenta ciertos parámetros, como lo indica la NOM-173-SCFI-2009, para una fruta sana la cual debe estar libre de enfermedades, heridas, pudriciones, daños producidos por insectos u otras plagas, libre de insectos vivos o muertos o sus larvas.

2.3.3 Extracción del jugo

Una vez seleccionada la materia prima, se lavó con agua y jabón y finalmente se desinfectó empleando una solución de plata coloidal al 0.05% como desinfectante. Para llevar a cabo la extracción del jugo se empleó un extractor marca (Hamilton Beach). Una vez obtenido el jugo, se pasó por un tamiz de acero inoxidable 100 μm , con el fin de obtener una dispersión con tamaño de partícula estandarizado. En la Figura 5, se muestra la operación realizada.

2.3.4 Formulación de las bebidas

En el Cuadro 3, se muestra la composición base de la bebida fresa empleada en este estudio, además, con el fin de tener una referencia y evaluar el efecto de incorporar nanosistemas se llevó a cabo la evaluación de los cambios en la bebida preparada sin la incorporación de ningún otro componente adicional.

Por otro lado, la adición de gomas también tiene influencia sobre la estabilidad de la dispersión que conforma la bebida por lo que se evaluaron los cambios al incorporarles sistemas nanoemulsionados o nanocáncapsulados. El Cuadro 4, muestra la composición de las bebidas de acuerdo con el diseño experimental propuesto, y que consideró la incorporación de β -caroteno en forma de nanoemulsión o nanocápsulas y goma xantana ó arábica, cabe mencionar que todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Cuadro 3. Composición base de las bebidas con jugo de fresa.

Ingredientes	Concentración
Jugo de fresa	30 %
Azúcar	3.5 %
Nanocápsulas de α -tocoferol	100 mg/mL
Ácido cítrico	0.015 %

Además, los ingredientes y/o aditivos del Cuadro 3 se utilizaron en general para todas las dispersiones, según la NOM-218-SSA1-2009 para bebidas a base de frutas y bebidas saborizadas no alcohólicas.

Cuadro 4. Porcentaje de aditivos e ingredientes que se utilizaron en las soluciones.

Tratamiento	Nanoemulsión β -caroteno (1%)	Nanocápsulas β -caroteno (1%)	Goma Xantana (0.05%)	Goma Arábica (5%)
1	-	-	-	-
2			✓	
3				✓
4	✓		✓	
5	✓			✓
6	✓		✓	✓
7		✓	✓	
8		✓		✓
9		✓	✓	✓

2.3.5 Envasado y tratamiento térmico

Una vez llevada a cabo la preparación de las bebidas, se llevó a cabo un tratamiento térmico de pasteurización con el fin reducir la carga microbiana y algunas bacterias importantes (Geankoplis, 1998). Las bebidas se calentaron a 80°C/5 min,

posteriormente el choque térmico se realizó en agua con hielo por 15 segundos, enseguida se sellaron los frascos y se mantuvieron en refrigeración de 4°C durante 4 semanas, evaluando las propiedades físicas y fisicoquímicas: color, pH, acidez, turbidez, °Brix, antocianinas, β-caroteno.

2.3.6 pH

Se determinó el pH en las bebidas pasteurizadas empleando un potenciómetro Hanna-213 (Microprocessor pH meter Portugal). Previamente se calibro el equipo con soluciones reguladoras de pH: 7 y 4. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.3.7 °Brix

Se determinaron los sólidos solubles según la NMX-F-103-1982 para alimentos, frutas y derivados, utilizando un refractómetro de la marca Hanna HI 96801, USA., calibrando el equipo con agua destilada para posteriormente tomar una pequeña muestra de la solución colocándose en el prisma realizando esto por triplicado.

2.3.8 Acidez titulable

Se determinó la acidez por medio de una titulación ácido-base con una solución de álcali estandarizada NaOH 0.1 N, expresando los resultados de la acidez titulable por 100 g ó 100 mL, como equivalente en masa de ácido cítrico (mg) Todas las mediciones se realizaron por triplicado (AOAC, 2005).

2.3.9 Colorimetría

La evaluación de color en las bebidas con 30 % de jugo de fresa se llevó a cabo utilizando un Agrocolorimetro marca Pollinare Technology, Francia. Se registraron los cambios en color RGB y se transformaron a coordenadas de L* a* y b*. Par la

determinación, se tomó una muestra de 25 mL de solución en un vaso de precipitado, todas las pruebas se realizaron por triplicado. Con los datos obtenidos se determinó el °Hue, Cromo y diferencia total de color (ΔE), de acuerdo con las ecuaciones mostradas a continuación:

$$\text{Croma} = \sqrt{a^2 + b^2} \quad \text{Ec. (1)}$$

$$^{\circ}\text{HUE} = \arctang\left(\frac{b}{a}\right) \quad \text{Ec. (2)}$$

$$\Delta E = \sqrt{(a_0 - a_t)^2 + (b_0 - b_t)^2 + (L_0 + L_t)^2} \quad \text{Ec. (3)}$$

2.3.10 Turbidimetría

Se determinó la turbidez de las bebidas pasteurizadas utilizando un turbidímetro Ratio RWGZ-200. El equipo se calibró, empleando estándares de 20 y 200 NTU para después colocar la muestra en la cubeta de medición, obteniendo de esta forma las unidades nefelométricas. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

2.3.11 Carotenoides

Los carotenoides totales se determinaron por el método de (Liao et al., 2007) con algunas modificaciones. Una muestra de bebida (25 mL) fue tomada en un embudo de separación con 50 mL de n-hexano/acetona (1:1, v/v) manteniéndose durante 5 min. Después de la separación se extrajo la fase orgánica se extrajo.

La fase acuosa se extrajo mediante el uso de 15 mL de n-hexano / acetona (1:1, v/v) hasta que se volvió incolora. Se determinaron los carotenoides totales a 450 nm utilizando un espectrofotómetro (Genesys 10S, EUA) a 25 °C por triplicado. Una curva patrón se realizó en intervalos de concentración de 20 – 100 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados se expresaron como μg de β -caroteno equivalentes/mL de jugo.

2.3.12 Antocianinas

El contenido de antocianinas de la bebida de fresa fue determinado con un método de diferencial de pH descrito por (Meyers, Watkins, Pritts y Liu 2003) con algunas modificaciones usando dos soluciones reguladoras de pH: Cloruro de potasio (0.025 M) a pH 1 y acetato de sodio (0.4 M) a pH 4.5 ajustando con ácido clorhídrico (3 N). Brevemente, 5 mL de bebida de fresa fueron aforados a 10 mL con cada solución amortiguadora para posteriormente ser centrifugados. La absorbancia del sobrenadante fue determinado utilizando un espectrofotómetro (Genesys 10S, EUA) a 510 nm y a 700 nm. El contenido de antocianinas fue expresado como pelargonidina 3 glucósido por litro de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\text{Antocianinas Totales} = \frac{[(A_{510}-A_{700})_{\text{pH } 1} - (A_{510}-A_{700})_{\text{pH } 4.5}] \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000}{\epsilon \times L} \quad \text{Ec. (4)}$$

Donde MW es el peso molecular de la pelargonidina 3 glucósido (433 g/mol), DF es el factor de dilución, L es la longitud de la celda en cm y ϵ es el coeficiente de extinción de la pelargonidina3 glucósido (22400 L/mol cm).

2.3.13 Diseño experimental

Para llevar a cabo la comparación de los tratamientos respecto a los parámetros evaluados mediante análisis de varianza de una o dos vías y se realizaron pruebas de comparación de medias para la contratación de resultados empleando una prueba de Tukey.

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Parámetros fisicoquímicos

Los cambios en aspecto físico, acidez, sólidos solubles, antocianinas, turbidez y color, son un reflejo asociado a la pérdida de calidad de una bebida incorporada con jugo de frutas como es el caso de la preparada en este estudio, razón por la que a continuación se presenta un análisis de los resultados obtenidos, haciendo énfasis en la incorporación de nanocápsulas en relación al tipo de goma empleada para dar estabilidad a la bebida.

3.1.1 Acidez titulable

La Figura 6 muestra el comportamiento en la acidez expresada como en función a los meq de ácido ascórbico. Los resultados reportados corresponden a las muestras control considerando la funcionalidad respecto a la estabilización con goma xantana o goma arábica. Las variaciones son mostradas para las 4 semanas de almacenamiento, señalando que la acidez inicial tiene un efecto significativo ($\alpha = 0.05$) en relación a la incorporación de goma CMC o xantana. De acuerdo con Yaman y Bayoindirli, (2002), la acidez titulable es uno de los parámetros más importantes en el almacenamiento de bebidas de frutas, sobre todo cuando se emplean aditivos como goma arábica o xantana y además resaltan que los cambios de acidez están en función de las condiciones de almacenamiento principalmente en relación a la degradación y/o oxidación de los ácidos orgánicos. En el caso del sistema control analizado se observó que la acidez permanece prácticamente sin variación.

La Figura 6 muestra los cambios en acidez titulable para las diferentes bebidas preparadas con goma arábica y xantana y comparadas con las bebidas control, como se había mencionado, las muestras con goma arábica y xantana no mostraron

diferencia estadísticamente en la acidez titulable, ya que no existió diferencia estadísticamente significativa con relación al tiempo de almacenamiento aunque si con respecto al tipo de goma empleada, siendo ligeramente mayor la acidez para las muestras con goma xantana

Como se había mencionado anteriormente, la acidez es un parámetro de calidad importante, se observa en el grafico que dicho porcentaje se mantiene prácticamente sin variaciones, a excepción de las bebidas que no contenían gomas como estabilizantes, las que inicialmente variaron desde 0.24 a 0.30 para estabilizarse a las 3 semanas de almacenamiento. De acuerdo con Gharibzahedi y col. (2013), las gomas arábica y xantana actúan como estabilizantes del sistema disminuyendo la velocidad a la que las gotas se mueven dentro de una emulsión, lo que es similar a la bebida preparada con jugo de fresa ya que este tiene sólidos en suspensión que con la adición de goma disminuyen su velocidad de sedimentación, lo que contribuye a distribuir homogéneamente las partículas de jugo de fresa y por ende a homogenizar la acidez.

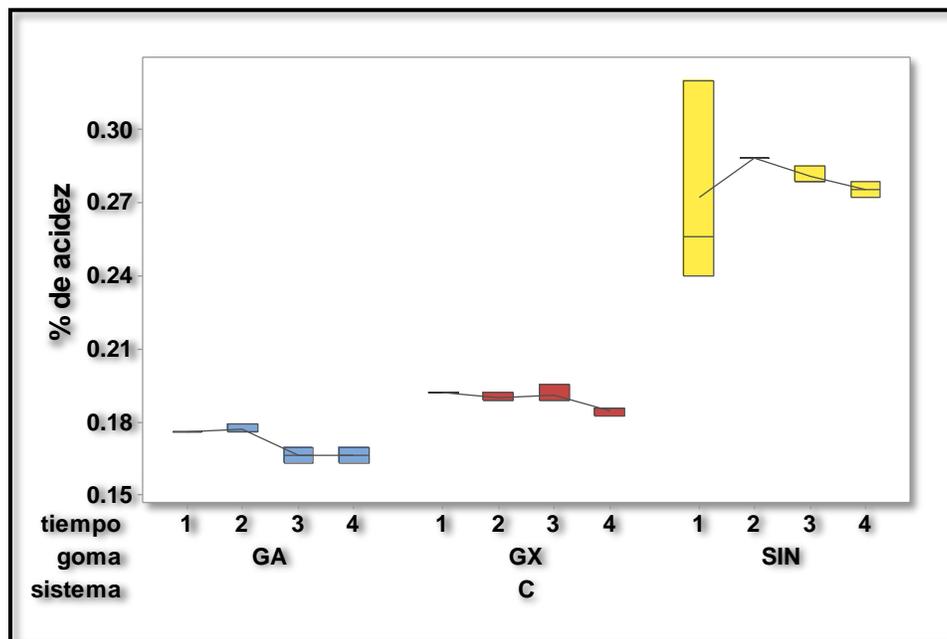


Figura 6. Cambios en el % de acidez titulable expresada como meq de ácido ascórbico en bebidas con jugo de fresa con o sin goma. GA= goma arábica, GX = goma xantana, Sin = sin gomas.

La Figura 7 muestra los cambios de acidez en las diferentes bebidas preparadas e incorporadas con el sistema de talla submicrónica correspondiente, mostrando que la mayor acidez inicial la presentaron las bebidas con goma arábica y nanocápsulas, siendo este comportamiento muy similar al de las muestras control una vez transcurridas tres semanas de almacenamiento, sin embargo, la acidez disminuyó a los mismos niveles que el resto de las muestras atribuido esto a la interacción entre la goma arábica y la poli- ϵ -caprolactona presentes en estas bebidas (Zambrano-Zaragoza et al., 2013). Por otro lado cabe mencionar que las muestras con los demás sistemas no mostraron diferencia estadísticamente significativa respecto a la acidez las primeras semanas de almacenamiento con un valor promedio de 0.13 %. Las muestras que mostraron mayor variabilidad en la acidez transcurridas tres semanas fueron aquellas con la mezcla de goma arábica-xantana e incorporadas con β -caroteno en forma de nanoemulsión con una disminución del 27.58 % durante el periodo de almacenamiento.

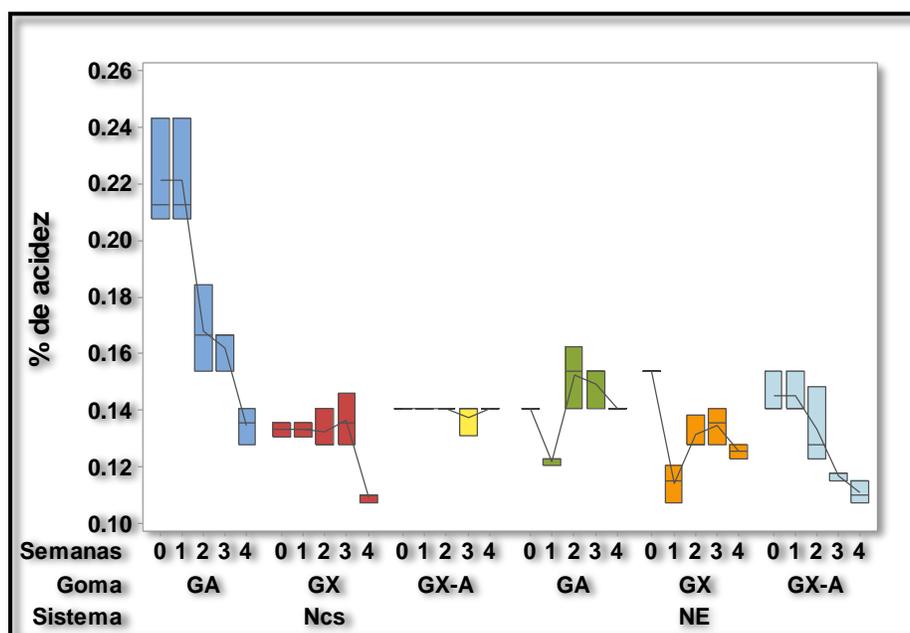


Figura 7. Cambios en el % de acidez titulable expresada como ácido ascórbico en bebidas con jugo de fresa incorporadas con sistemas de talla nanométrica. GA = Goma arábica, GX = goma xantana; GX-A = goma xantana-arábica.

3.1.2 pH

Los cambios en pH son indicativos de la degradación de los ácidos orgánicos y actividad microbiana en bebidas de frutas sometidos a tratamiento térmico. En la Figura 8 se muestra el comportamiento del pH de las bebidas control sin gomas respecto a aquellas formulaciones con goma arábica o xantana, observándose que la adición de estas gomas al sistemas contribuyó a mantener el pH del jugo con menores variaciones durante el almacenamiento refrigerado, resaltándose además, que el producto con goma arábica mantuvo variaciones de 1.5 % durante el almacenamiento, mientras que las muestras con mayor variación fueron las que no contenían goma, con variación de 6.5 % durante el periodo de almacenamiento y que tendía a incrementarse ligeramente sin que muestre diferencia significativa respecto a aquellas con gomas al final del almacenamiento.

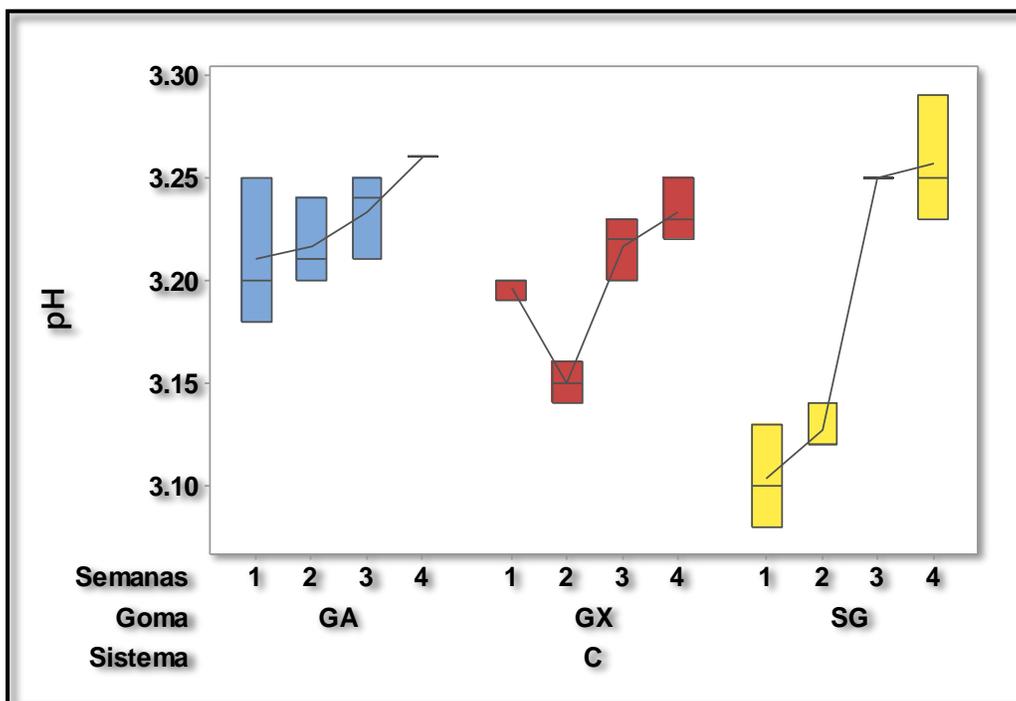


Figura 8. Cambios de pH para bebidas control con y sin gomas empleadas como estabilizantes del sistema, GA = Goma Arábica, GX = goma xantana y SG = Sin goma.

La Figura 9 muestra las variaciones en pH durante las cuatro semanas de almacenamiento de una bebida incorporada con 30 % de jugo de fresa, en esta se observa que aquellas muestras en las que se empleó β -caroteno en nanoemulsión mantuvieron prácticamente sin variación el pH durante 4 semanas, mientras que aquellas que emplearon nanocápsulas tuvieron mayores variaciones, atribuidas a las modificaciones estructurales de la poli- ϵ -caprolactona empleada como polímero pared en las nanocápsulas, aunque cabe resaltar que estas variaciones fueron mínimas ya que el pH fue de 3.1 a 3.4 y para aquellas con goma arábica fue de 3.4 a 3.7.

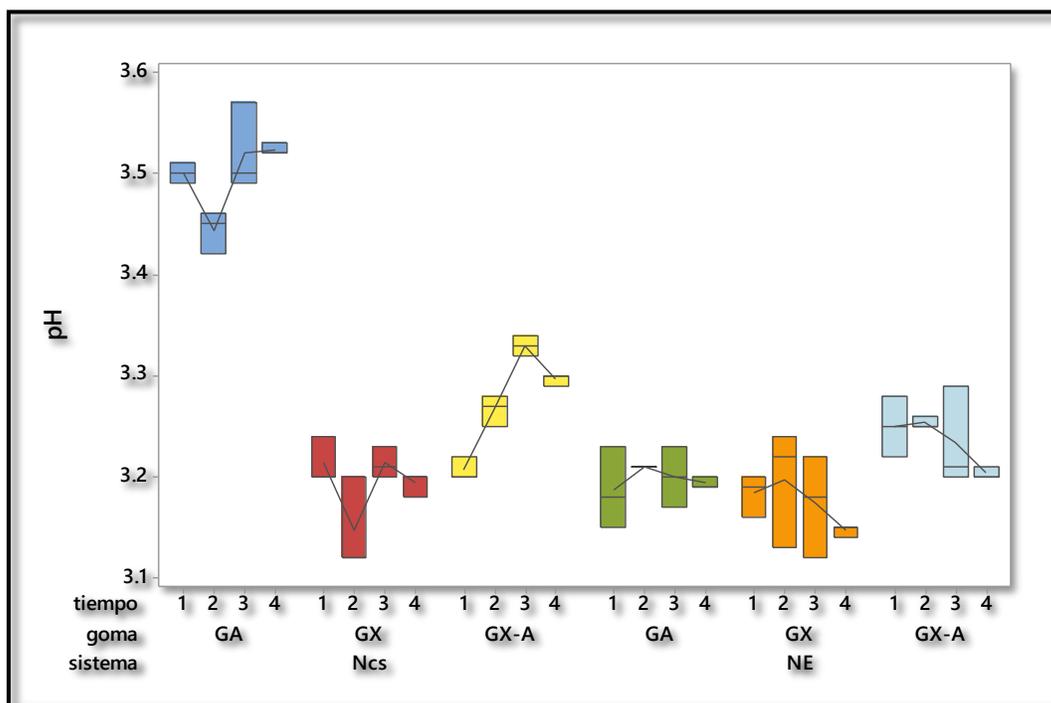


Figura 9. Comparación del comportamiento de pH en bebidas con jugo de fresa incorporados con sistemas de talla nanométrica. GA= goma arábica, GX = goma xantana, GX-A = goma xantana-arabiga, Ncs = nanocápsulas, NE = nanoemulsión.

3.1.3 °Brix

En la Figura 10 se muestran las variaciones de sólidos solubles en bebidas con 30 % de jugo de fresa, durante las 4 semanas de almacenamiento a 4 °C, observándose que en las muestras control los ° Brix se mantuvieron en un intervalo de entre 5.5 y 6.5. Sin embargo, es importante resaltar que las dispersiones que contienen goma arábica mostraron que una vez alcanzado el equilibrio tuvieron una concentración mayor de casi un grado en comparación con las otras. En un estudio reciente se reportó que los sólidos solubles pueden incrementarse significativamente al utilizar goma arábica, logrando además la estabilidad de antocianinas por el mecanismo de co-pigmentación, lo que implica la reducción de actividad de agua alrededor de las antocianinas y como resultado el incremento de azúcar de antocianinas y el aumento de los sólidos solubles (Sadilova et al., 2009).

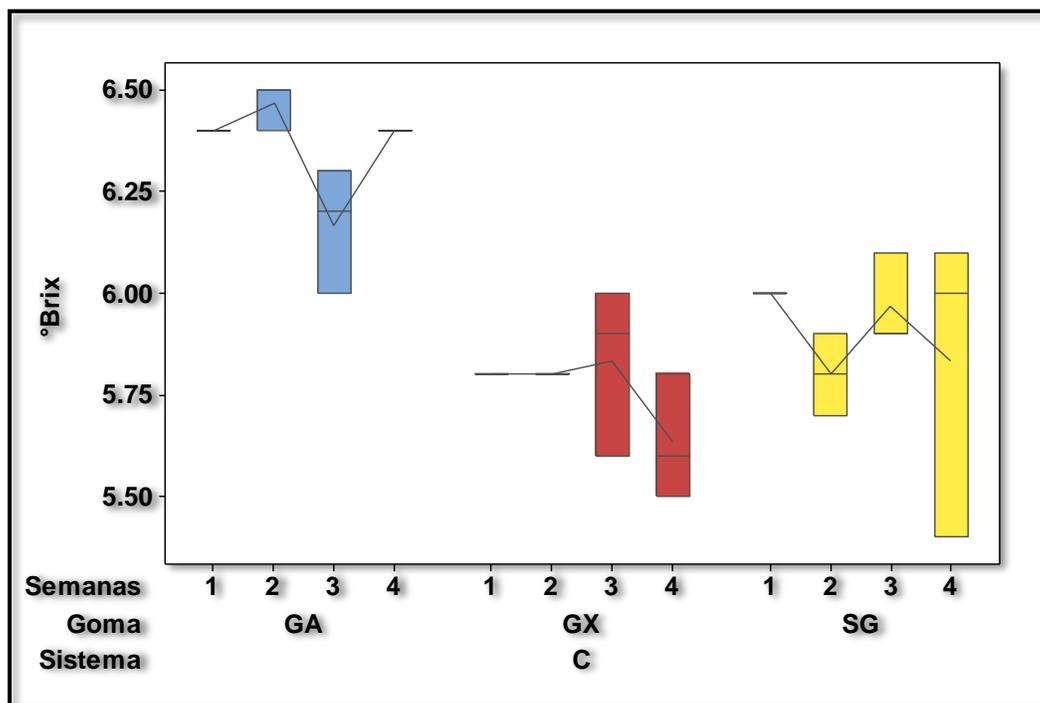


Figura 10. Cambios en Sólidos solubles (°Brix) para muestras control. GA = goma arábica, GX = goma xantana, SG = sin goma, C = Control.

Este mecanismo también puede aplicarse a goma arábica soluble en agua que mejora la conservación del color de las dispersiones de antocianina después del calentamiento. Es importante también resaltar que las muestras de bebida de fresa sin gomas, mostraron una menor estabilidad, observándose que los resultados presentaron mayor variabilidad una vez transcurrida una semana de almacenamiento, siendo mayor la diferencia en °Brix a las 4 semanas de almacenamiento. En la figura 11, muestra el comportamiento de los °Brix en función a la formulación de la bebida con jugo de fresa, observándose que las dispersiones que contienen nanocápsulas y goma arábica tienden a incrementar su contenido de sólidos solubles de hasta un 33 % con respecto al día cero, esto es atribuido al comportamiento de la goma arábica mencionado en el párrafo anterior.

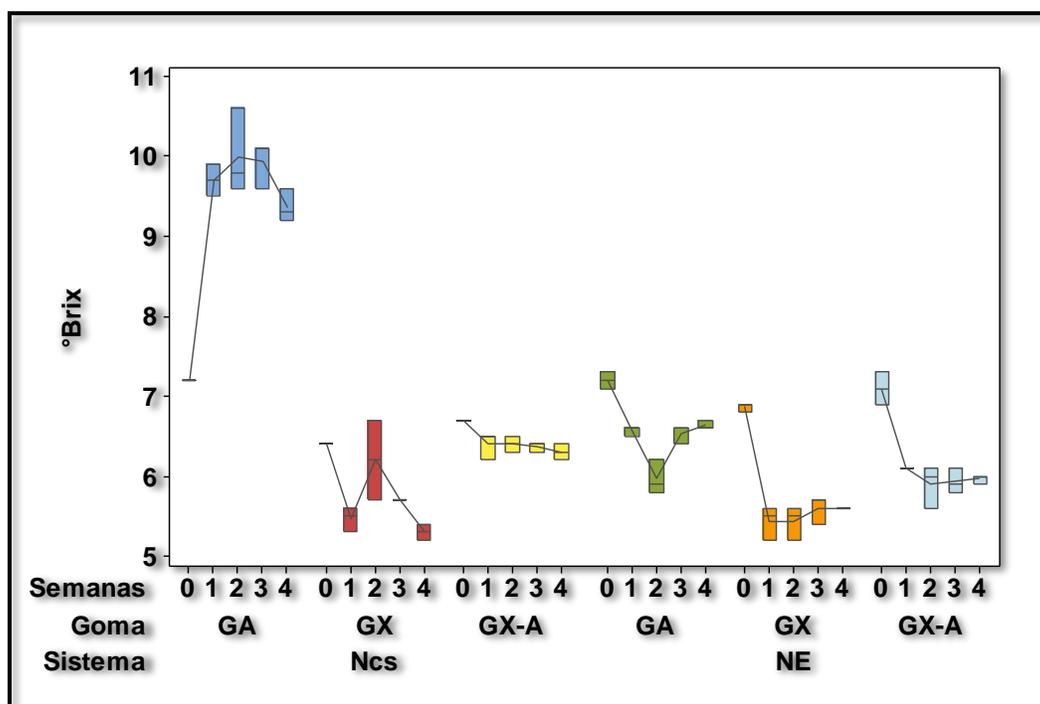


Figura 11. Cambios en °Brix en función a la composición de goma y sistemas de talla nanométrica en bebidas con 30% de jugo de fresa. GA = goma arábica, GX = goma xantana, GX-A = goma xantana-arábica, Ncs = nanocápsulas y NE = nanoemulsión.

Los sólidos solubles pueden incrementarse significativamente al utilizar goma arábica, logrando además la estabilidad de antocianinas por el mecanismo de copigmentación, lo que implica la reducción de actividad de agua alrededor de las antocianinas y como resultado el incremento de azúcar de antocianinas y el aumento de los sólidos solubles (Sadilova et al., 2009). Este mecanismo también puede aplicarse a goma arábica soluble en agua que mejora la conservación del color de las dispersiones de antocianina después del calentamiento, es importante resaltar también que las muestras que se formularon con nanoemulsión tuvieron una disminución del 28 % en el comportamiento de los sólidos solubles, pudiéndose atribuir a la menor estabilidad de los sistemas al almacenamiento, atribuido, a la interacción entre los estabilizantes empleados para la preparación de la nanoemulsión y su interacción con los polisacáridos. Por otro lado, es importante resaltar que las bebidas formuladas con mezcla goma xantana-arábica mostraron mayor estabilidad en este parámetro ya que las bebidas con nanocápsulas y nanoemulsión de β -caroteno, mostrando ser más estables aquellas con nanocápsulas en la formulación ya que no presentó variaciones estadísticamente significativas.

3.2 Parámetros físicos

3.2.1 Turbidez

El grado de la turbidez y la estabilidad de las dispersiones son parámetros importantes que reflejan la calidad de los jugos de fresa. Dietrich, Gierschner, Pecoroni, Zimmer, y Will (1996) la baja turbidez en los jugos de fresa, se debe probablemente a la presencia de almidones propios del fruto. La estabilidad de las partículas grandes en bebidas a base de frutas (> 10 micras) suspendidas en un fluido se rige por las fuerzas hidrodinámicas (Genovese, Lozano, y Rao, 2007), y el mecanismo de sedimentación se explica principalmente por la Ley de Stokes. De acuerdo con la Ley de Stokes, para partículas esféricas y rígidas, sin interacciones, dispersado en un fluido newtoniano, la velocidad de sedimentación de las partículas es directamente proporcional a su diámetro al cuadrado, la aceleración impuesta y la

diferencia entre la densidad media de las partículas y la dispersión, siendo inversamente proporcional a la viscosidad medio de dispersión. Por otra parte las muestras que contienen la mezcla de ambas gomas con nanocápsulas y todas aquellas que contienen nanoemulsión presentan una turbidez menor de 500 NTU, cabe destacar que la turbidez en estas últimas fue decreciendo con respecto al día cero.

La Figura 12 muestra los cambios asociados en NTU asociados a la turbidez de los sistemas dispersos que constituyeron la bebida con 30 % de jugo de fresa, mostrándose que la turbidez permaneció sin variación para las muestras con goma arábica, lo que implicó que este sistema contribuye a estabilizar la bebida. Se observa que la turbidez se encuentra baja, Dietrich et al., (1996) se ha encontrado, que el almidón pasando de fruta a los jugos afecta negativamente a la turbidez. Durante el almacenamiento, el almidón se hidroliza, lo que resulta en la reducción de tamaño de partículas y mejoró la estabilidad de la turbidez en el jugo.

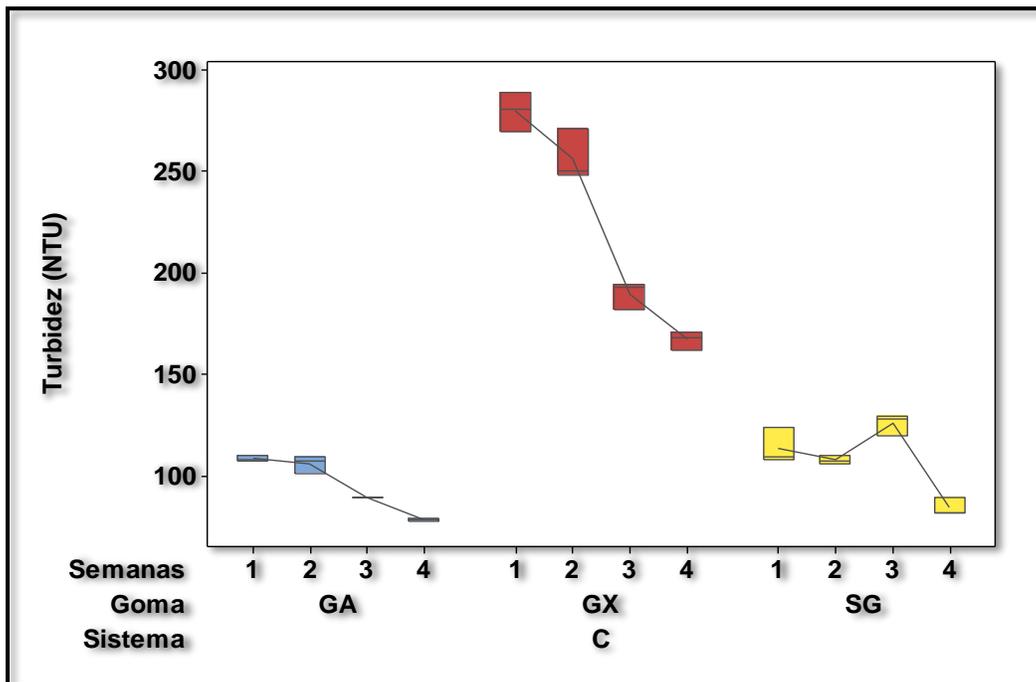


Figura 12. Cambios de turbidez en función al tiempo de almacenamiento para bebidas con jugo de fresa, muestras control. GA = goma arábica, GX = goma xantana, SG = sin goma y C = Control.

Sin embargo en la Figura 13 se observa las variaciones en las dispersiones que contienen nanocapsulas con goma arabiga o goma xantana, presentan una turbidez elevada de 1500 NTU aproximadamente. Por otra parte las muestras que contienen la mezcla de ambas gomas con nanocapsulas y todas aquellas que contienen nanoemulsión presentan una turbidez menor de 500 NTU, cabe destacar que la turbidez en estas ultimas fue decreciendo con respecto al dia cero, de acuerdo a Tan (1997) y Tse y Reineccius (1995) las emulsiones en bebidas tienen un alto grado de estabilidad. Para este caso tambien la combinacion de las gomas y las nanocapsulas presentaron dicha estabilidad.

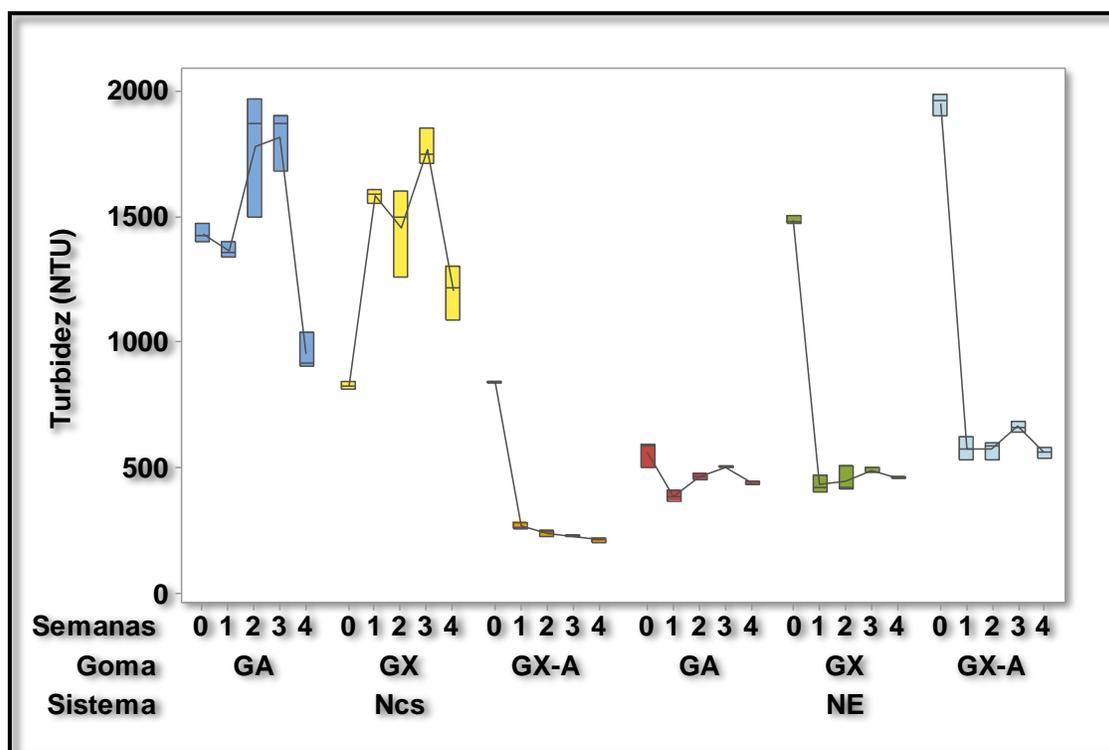


Figura 13. Cambios en turbidez para bebidas incorporadas con sistemas de talla nanométrica, GA = goma arábica, GX = goma xantana GX-A = goma xantana-arábica

3.2.2 Color

El color tiene una gran influencia en la aceptación del consumidor de alimentos. Es un parámetro de gran importancia. Por lo tanto, las mediciones de color son de gran interés tanto para los científicos de alimentos y la industria alimentaria. Las antocianinas son responsables del color rojo atractivo de jugo de granada, fresa, etc., así como muchos otros zumos de frutas de color rojo (Li, Pan, Cui, y Duan, 2010).

En el espacio de color en tres dimensiones, el valor L^* es una medida de la luminosidad de un objeto y se cuantifica en una escala tal que un negro perfecto tiene un valor L^* de 100. El valor a^* es una medida de la tonalidad roja (a^* positivo) o tonalidad verde (a^* negativo). El valor b^* es una medida de la tonalidad amarilla (positivo b^*) o coloración azul (negativo b^*). Los a^* , b^* y coordenadas se aproximan a cero para los colores neutros (blanco, grises) y aumento de la magnitud de los colores más saturados o intensos.

La ventaja del sistema CIE-Lab es que las diferencias de color pueden ser expresadas en unidades que pueden estar relacionados con la percepción visual. El cálculo de la variación de color ΔE^* entre dos posiciones de color de los valores obtenidos antes y después de algún tratamiento, en el tridimensional (3-D) $L^* a^* b^*$.

3.2.3 Luminosidad

La Figura 14 muestra las variaciones en luminosidad para las muestras control, entre las que se incluye aquellas que fueron adicionadas únicamente con todos los ingredientes a excepción de las gomas arábica y xantana, esto con el fin de destacar la funcionalidad de las gomas seleccionadas en la estabilidad del sistema.

Se aprecia que dicho parámetro fue incrementando, con respecto al tiempo de almacenamiento, esto debido a la separación de fases de ingredientes y componentes del jugo como las pectinas, los azúcares

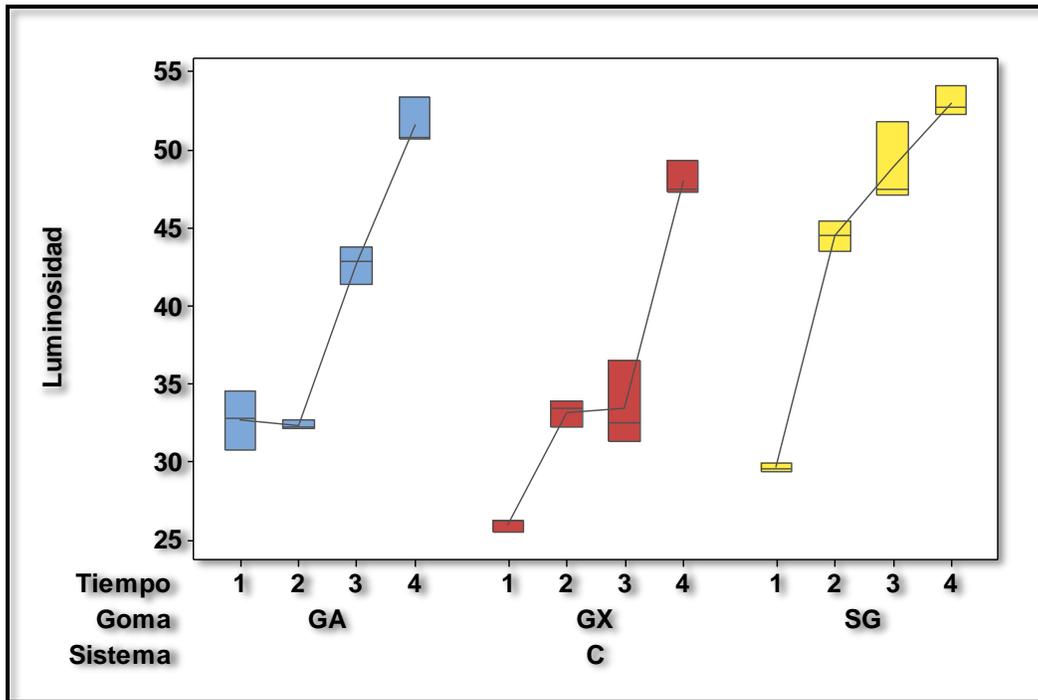


Figura 14. Cambios en luminosidad asociados al empleo de gomas y aquellas formulaciones sin la adición de esta. GA = goma arábiga, GX = goma xantana, SG = sin gomas y C = control.

La Figura 15 muestra las variaciones de luminosidad L^* con respecto a las diferentes formulaciones y al tiempo de almacenamiento. En el caso de los jugos adicionados con nanocápsulas (GX y GA) se observa un aumento significativo ($p < 0.05$) de L^* debido a la separación de fases causada por la sedimentación de compuestos pécticos, este efecto se vio potencializado con respecto al tiempo de almacenamiento, por otra parte las bebidas con la mezcla de GX-A y adicionadas con NC's presentan un incremento de la luminosidad hasta la semana 3, posteriormente L^* disminuye, esto es debido a que a partir de esta semana la compatibilidad de ambas gomas se modificó de tal manera que se podía apreciar la formación de aglomerados en estas bebidas. Para el caso de

las muestras adicionadas con NE, aquellas que contenían GA presentan un aumento de la luminosidad aun mayor que el registrado para la bebida GA-NC's. Las muestras que contenían GX-NE tuvieron un comportamiento constante de L* con respecto al tiempo de almacenamiento, esto indica que la estabilidad de dicha bebida no presento cambios significativos. Por último, aquellas muestras que contenían ambas gomas (GX-A) y NE presentaron una disminución de dicho parámetro, resultado similar al observado para las bebidas GX-A-NC's.

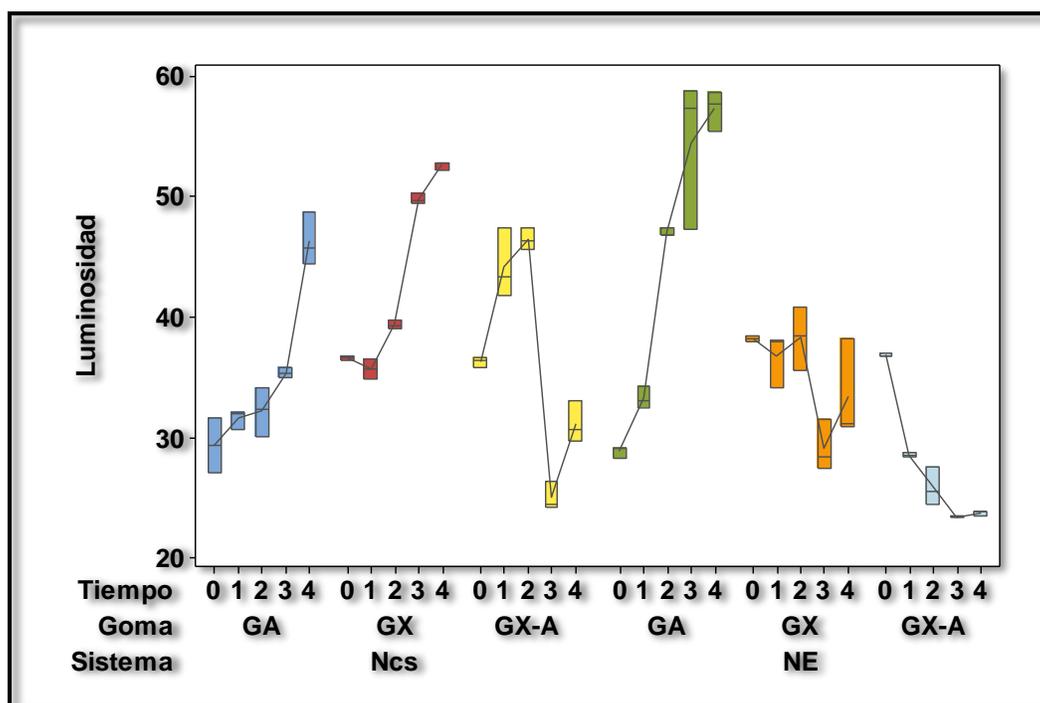


Figura 15. Cambios en luminosidad en muestras incorporadas con sistemas de talla submicrónica Ncs = nanocápsulas, NE = nanoemulsión, GA = goma arábica, GX = goma xantana, GX-A = goma xantana-arabiga.

3.2.4 Cromaticidad

Durante el almacenamiento de jugos y bebidas, estos presentan modificaciones en su aspecto físico relacionados con los cambios de estabilidad, reacciones enzimáticas y degradación de algunos componentes orgánicos. La saturación de color

(cromaticidad) es un parámetro importante a medir durante el almacenamiento de jugos pues a través de este se puede inferir que se están llevando a cabo reacciones fisicoquímicas así como una pérdida de estabilidad, mismas que ocurren durante el tiempo de vida útil de las bebidas y finalizan cuando el producto ya no cuenta con la calidad para ser ingerido.

La Figura 16 muestra el comportamiento de cromaticidad para las muestras control (GA, GX y SG), la bebida elaborada con GA presenta una disminución del croma del 38% aproximadamente mientras que las muestras con GX presentan una disminución del 30% en promedio, cabe destacar que la disminución de cromaticidad para estas muestras se dio principalmente a partir de la tercera semana de almacenamiento. En cuanto a la muestra control sin goma (SG) hubo una disminución de cromaticidad del 37% aproximadamente, sin embargo, la disminución de dicho parámetro fue evidente a partir de la segunda semana de almacenamiento.

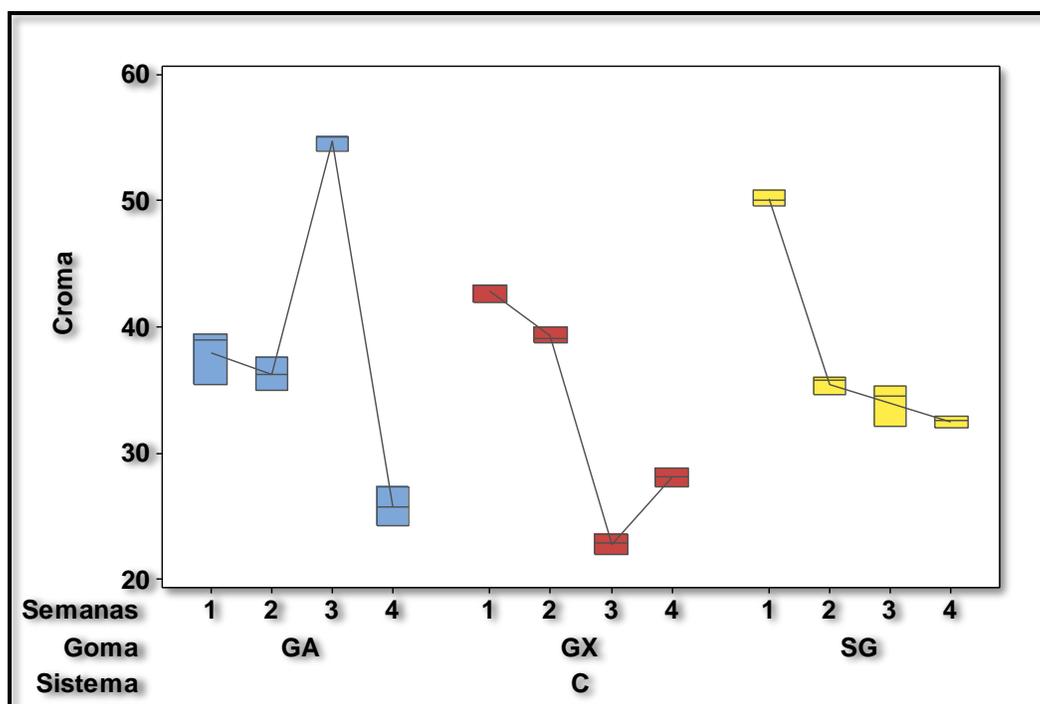


Figura 16. Cambios de cromaticidad en bebidas control. GX: goma xantana, GA: goma arábigo, GX-A: goma xantana-arábigo y C: control.

Se observa que las bebidas con sistemas de talla submicrónica presentan una mayor cromaticidad que las muestras control en función al tiempo de almacenamiento, esto es asociado a la liberación de β -caroteno en el sistema el cual aporta tonalidades naranja-amarillas, que al interactuar con la bebida proporcionan una tonalidad (tonalidad roja-naranja) resulta en un incremento de la cromaticidad. El color es un marcador esencial para la calidad de los alimentos, la investigación cada vez más se lleva a cabo con el fin de mejorar la estabilidad de los colores naturales (GHI Douche et al., 2013 y Jespersen et al., 2005). Los carotenoides son pigmentos responsables de los colores amarillos, naranjas y rojos que se encuentran en muchas frutas y verduras, así mismo cuando este antioxidante y colorante es agregado artificialmente a un alimento para brindar características deseadas o funcionales. Muchas algas y hongos se utilizan para producir las fuentes comerciales de carotenoides se obtienen de *Dunaliella salina*, un micro-alga verde que se encuentra en los campos de sal.

De acuerdo a los resultados de las bebidas elaboradas con goma arábica y nanocápsulas, mostraron un aumento en los valores de cromaticidad hasta la semana 4, después de este tiempo la saturación de color comienza a disminuir. Las bebidas elaboradas con GX-Nc's y GX-A-Nc's presentan el mismo comportamiento, pero la disminución de cromaticidad se observa a partir de la semana 3. En cuanto a las muestras que contenían NE, aquellas elaboradas con GA presentan un comportamiento constante y es a la semana 4 cuando la cromaticidad disminuye. Las bebidas que contenían GX-NE y GX-A-NE presentan un aumento de la cromaticidad hasta la semana 2, después de este tiempo la cromaticidad disminuye.

En la figura 17 se muestran las variaciones en el croma para las diferentes formulaciones de bebidas por efecto de la incorporación de sistemas de talla submicrónico adicionados con β -caroteno y α -tocoferol. Garzón y Wrolstad, 2002 y Holzwarth et al., 2012 reportan que en los productos de fresa, su color rojo brillante atractivo es debido principalmente a la presencia de compuestos fenólicos, antocianinas específicamente. Sin embargo, estos compuestos son inestables y

fácilmente susceptibles a la degradación durante el almacenamiento, incluso en aquellos productos que han sido pasteurizados previamente. Aparte del deterioro microbiano, las pérdidas de color pueden ser producidos por la oxidación enzimática y reacciones de oscurecimiento no enzimático. Las oxidaciones enzimáticas son catalizadas por oxidorreductasas, tales como la polifenoloxidasas (PPO) o peroxidasa (POD), entre otros, que degradan compuestos fenólicos a amarillo indeseable, marrón, o pigmentos negros, responsables de la decadencia del color. Por otra parte, las antocianinas también están involucradas en asociaciones complejas, incluyendo reacciones de co-pigmentación, la auto-asociación, y de polimerización que producen pigmentos derivados y cambios de color durante el almacenamiento.

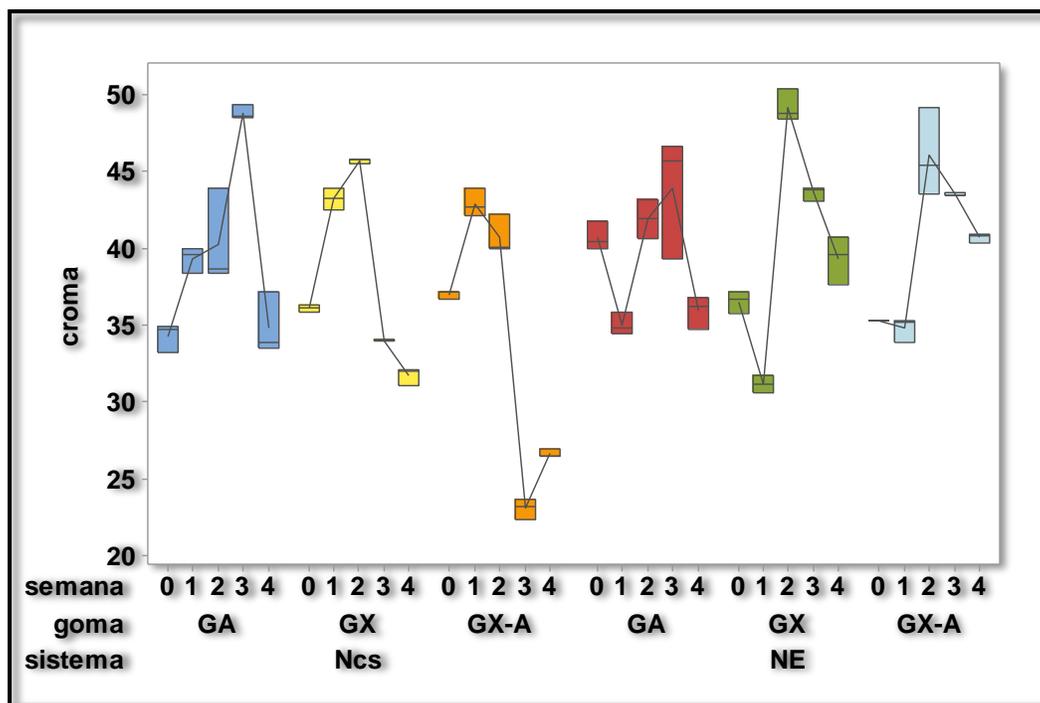


Figura 17. Cambios de cromaticidad asociados a la incorporación de sistemas de talla submicrónica. GA: goma arábica, GX: goma xantana, GX-A: goma xantana-arábica, Ncs: nanocápsulas, NE:nanoemulsión.

Cao et al., (2011), indica que el cambio cromático en bebidas de fresa depende fuertemente de alguna presión aplicada, aunque sea relativamente baja y al tiempo de

almacenamiento, pH, concentración de antocianinas, y la presencia de otros compuestos fenólicos, flavonoides, iones metálicos, ácido L-ascórbico y enzimas, entre otros, que pueden afectar los mecanismos de degradación del pigmento. Todos estos parámetros son fuertemente dependientes de las características de la materia prima y las etapas de procesamiento que llevan a cabo para obtener el producto final y por lo tanto, una considerable variación en los parámetros del color.

3.2.5 Cambio total de color

La diferencia total de color representa el cambio de color que experimentan las bebidas durante el tiempo de almacenamiento con respecto a una referencia que en este caso fue el color inicial de cada bebida. La diferencia total de color puede ser medida a través de la escala siguiente: $\Delta E = 0-0.5$ diferencia mínima, $\Delta E = 0.5-1.5$ diferencia pequeña, $\Delta E = 1.5-3.0$ diferencia notable, $\Delta E = 3.0-6.0$ diferencia apreciable, $\Delta E = 6.0-12.0$ diferencia importante y $\Delta E = >12$ diferencia obvia (Goyeneche et al. 2014), esta escala puede ser relacionada con la calidad de la bebida, ya que al ser mayor la ΔE , la calidad del producto disminuye.

La Figura 18 muestra la diferencia total de color para las muestras control. La bebida elaborada con GA y GX tienen las mayores diferencias totales de color (>12), esto es debido a que las gomas aportan su coloración característica y opacidad. La muestra sin gomas presentó una ΔE menor a 12 lo cual indica una diferencia importante de color.

La Figura 19, muestra la diferencia total de color para las muestras con nanocápsulas y nanoemulsión. En cuanto aquellas bebidas elaboradas con Nc's, las muestras que contenían GA y GX presentan los mayores cambios de ΔE , los cuales son >12 , esto indica que existió una diferencia obvia del color con respecto a las 4 semanas de almacenamiento. Las muestras elaboradas con GA-X presenta una diferencia total de color < 6 respecto al día 0 y semana 4 de almacenamiento, esto indica que hubo una diferencia apreciable, esta última bebida presento la menor diferencia total de color.

Las bebidas elaboradas con NE y GA presentan la mayor variación en la diferencia total de color con respecto a todas las formulaciones. Las bebidas elaboradas con GX-NE y GX-A-NE no presentan cambios significativos en la diferencia total de color después de la tercera semana de almacenamiento.

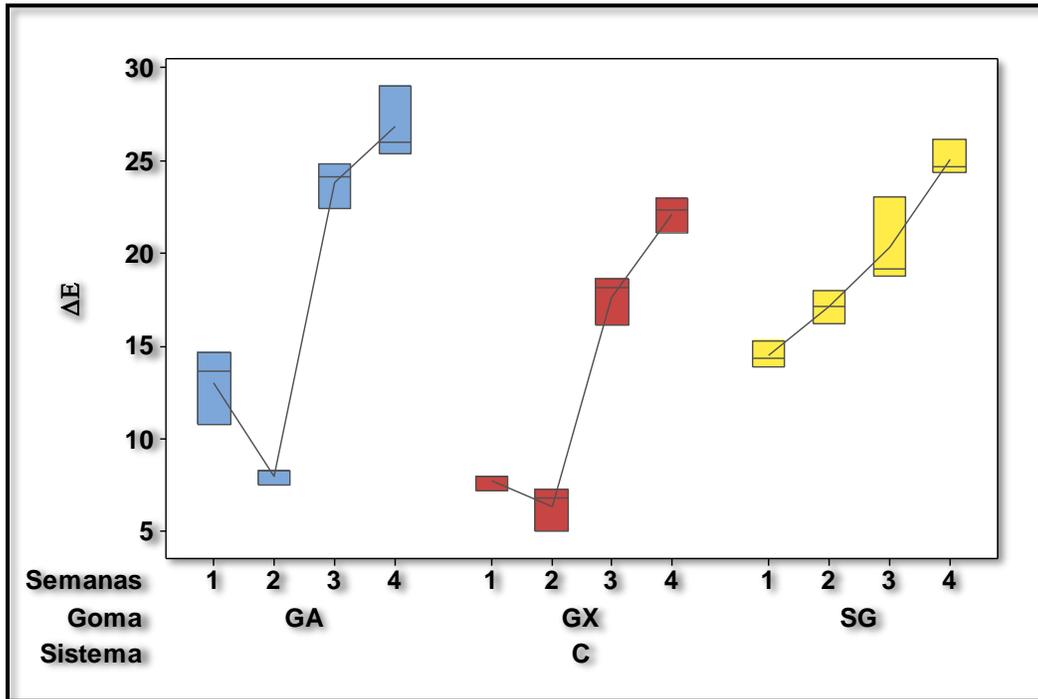


Figura 18. ΔE , asociada a la formulación y tiempo de almacenamiento para las muestras control. GA =goma arábica, GX = goma xantana, SIN = sin goma, C = control.

Todos los resultados corresponden a tres repeticiones.

El color es uno de los atributos sensoriales más importantes en los alimentos porque esta propiedad visual es el primer parámetro evaluado por los consumidores. En productos a base de fresa, su color rojo brillante atractivo se debe principalmente a la presencia de compuestos fenólicos, las antocianinas más específicamente. Sin embargo, estos compuestos son inestables y fácilmente susceptibles a la degradación durante el almacenamiento, incluso en aquellos productos que han sido pasteurizados previamente (Garzon encendido y Wrolstad de 2002); (Holzwarth et al., 2012b). Aparte del deterioro microbiano, los cambios de color pueden ser producidos por la

oxidación enzimática y no enzimática reacciones de pardeamiento. Oxidaciones enzimáticas son catalizadas por oxidorreductasas, tales como polifenol-oxidasa (PPO) o peroxidasa (POD), entre otros, que degradan compuestos fenólicos para colores indeseable como amarillos, marrones o pigmentos negros, responsables de la descomposición del color. Por otra parte, las antocianinas, también están involucradas en el complejo, incluyendo copigmentación, libre asociación, y la polimerización reacciones que producen pigmentos de color y derivados deformaciones durante su almacenamiento.

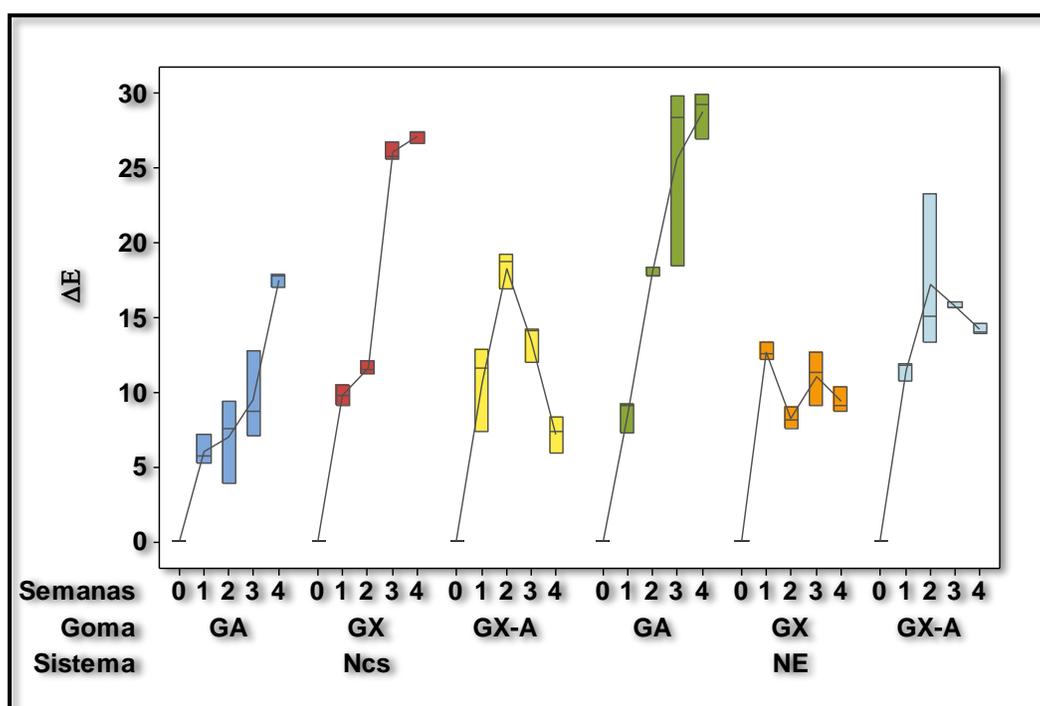


Figura 19. ΔE para muestras incorporadas con sistemas de talla submicrónica. GA = goma arábica, GX = goma xantana, GX_A= goma xantana-arábica, Ncs = nanocápsulas, NE = nanoemulsión.

3.3 Antioxidantes

3.3.1 Degradación de β -caroteno durante el almacenamiento

La Figura 20 muestra el β -caroteno residual en las bebidas con jugo de fresa, mostrándose que después de llevado a cabo el tratamiento térmico, estas tuvieron una concentración de 50 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, cabe aclarar que este comportamiento se debió a que la pasteurización se llevó a cabo por inmersión en agua caliente por 5 minutos y no como se reportó en el caso del empleo de un intercambiador de superficie raspada donde se reportaron pérdidas menores al 30 % de β -caroteno (González-Reza et al., 2015).

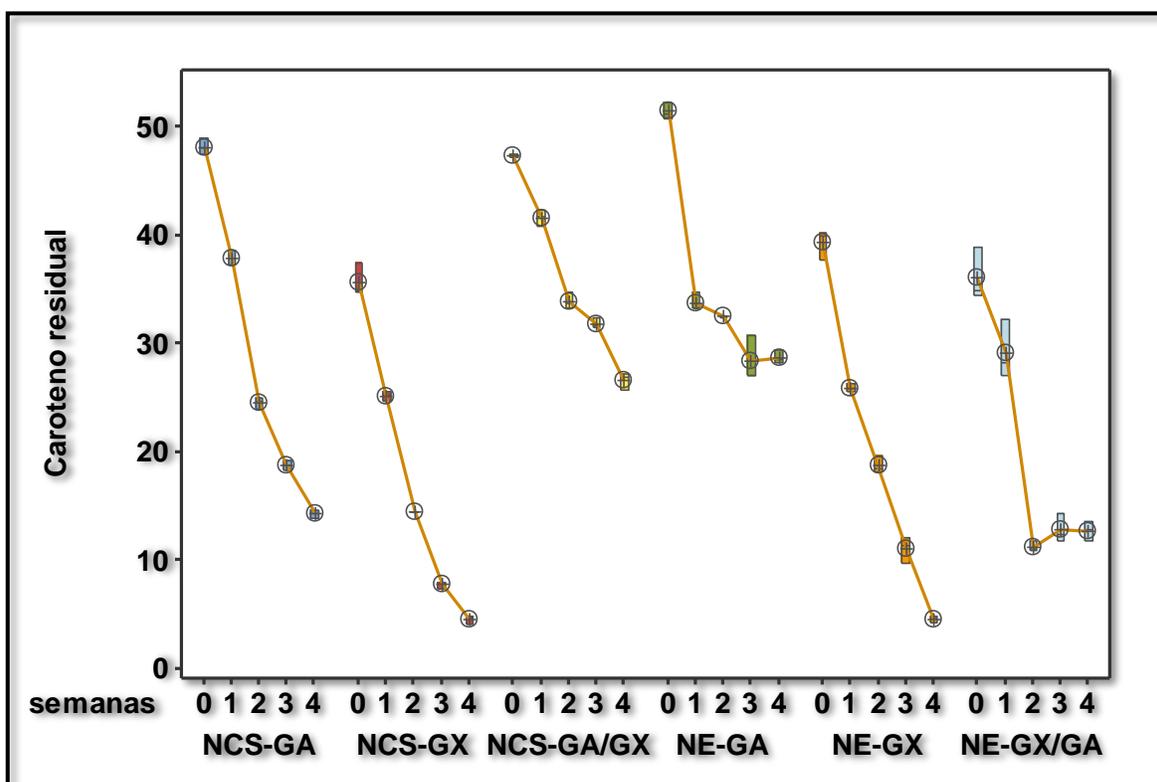


Figura 20. Caroteno residual cuantificado en bebida con 30 % de jugo de fresa. GA = goma arábica, GX = goma xantana, GX_A= goma xantana-arábica, Ncs = nanocápsulas, NE = nanoemulsión.

Las muestras que contienen NCS-GA/GX y NE-GA mostraron la menor pérdida de caroteno con respecto al tiempo, con una proporción de entre 28 y 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$,

mostrándose además que el β -caroteno tuvo mayores pérdidas con aquellas muestras que contenían NCS-GX y NE-GX, con una proporción menor a los 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, seguidas de las muestras que contenían NCS-GA Y NE-GX/GA, con una proporción final de entre 13 y 14 $\mu\text{g}/\text{mL}$, aproximadamente. Cabe destacar que aunque esta última, aunque al final muestra un comportamiento prácticamente constante la concentración del β -caroteno, (12 $\mu\text{g}/\text{mL}$) también se tiene una degradación muy baja, mostrando una mayor concentración las primeras descritas anteriormente.

La nanoencapsulación proporciona un efecto protector adicional que impide la degradación de compuestos termolábiles en un proceso térmico. Estos hallazgos indican que el uso de la nanotecnología puede mejorar la retención de β -caroteno en los procesos térmicos, y que el uso potencial de nanoencapsulación se puede aplicar fácilmente a otros agentes antioxidantes para otros procesos (por ejemplo, escaldado, esterilización, UHT, etc. (González-Reza y col. 2015). Como ya se había mencionado antes, las dispersiones fueron sometidas a pasteurización, se puede observar en la Figura 20 la disminución de la concentración de β -caroteno es mínima, según (Gonzales-Reza et al., 2015). Sugiere que a temperaturas de entre 80 y 93 °C el biopolímero (poli- ϵ -caprolactona) usado en la formación de las Nc's, confieren resistencia térmica para el β -caroteno, que se correlaciona con la mostrada en la cinética de degradación.

En el cuadro 5 se muestran los resultados del ANOVA para la retención de β -caroteno en la bebida adicionada con jugo de fresa al 30 %, mostrándose que tanto el tiempo de almacenamiento como el tratamiento representado por la forma en que el β -caroteno se incorporó a la bebida mostraron un efecto significativo en relación al comportamiento de retención de caroteno.

Cuadro 5. Análisis de Varianza para la retención de Caroteno en bebida con 30% de jugo de fresa.

Factor	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Suma de cuadrados medias	F-Value	P-value
Semanas	1	8814.6	8814.6	893.45	0.000
Tratamiento	5	4728.9	945.78	95.86	0.000
Semanas*tratamiento	5	391.3	78.27	7.93	0.000
Error	78	769.5	9.87		
Total	89	14704.3			

R²-ajustada = 0.9288

En el Cuadro 6 se muestran las constantes cinéticas de orden cero para la degradación de β -caroteno durante el periodo de almacenamiento, mostrándose que con excepción de las muestras incorporadas con nanoemulsión-goma arábica (NE-GA) que tuvo una R²-ajustada < 0.85, los demás tratamientos se ajustaron a un modelo lineal que explica el comportamiento cinético en relación al comportamiento del β -caroteno. Cabe destacar que la degradación del β -caroteno de una concentración inicial, disminuyó drásticamente hasta llegar a valores menores del 50% de dicha concentración, esto lo podemos atribuir al tratamiento térmico “pasteurización”. Es un proceso de tratamiento térmico que inactiva las enzimas endógenas naturales (pectilmetilesterasa, peroxidasa, etc.) y microorganismos a través de calentamiento a temperaturas inferiores a 100 ° C (Demirdoven y Baysal, 2015). Este tratamiento, asociada con la acidez del jugo de cítricos, inhibe el desarrollo de la flora patógena resistente al calor y permite el almacenamiento a temperatura ambiente en envasado herméticamente sellado.

Cuadro 6. Constantes cinéticas de orden cero para degradación de β -caroteno.

Tratamiento	Ordenada	K (sem⁻¹)	R²-adj
NCS-GA	46.10	-8.69	0.958
NCS-GX	32.46	-7.96	0.902
NCS-GX/GA	47.89	-6.043	0.975
NE-GA	43.66	-4.610	0.709
NE-GX	36.78	-8.43	0.974
NE-GX/GA	34.72	-6.243	0.927

Los tratamientos térmicos están asociados con el agotamiento de la calidad debido a la destrucción de vitaminas y daños en los componentes de sabor. Los carotenoides, por ejemplo, son sensibles a la luz, la temperatura y la exposición a sustancias químicas (metales, oxígeno) durante el procesamiento (Amaya, 2001). A medida que el calor puede alterar las propiedades nutritivas y organolépticas, las mejoras en las tecnologías de proceso se buscan reducir al mínimo la exposición al calor jugo. Este problema se satisface la demanda de los consumidores para mejorar el sabor y productos menos procesados-(más cerca de jugo fresco). Los jugos mínimamente procesados ahora tienen una cuota de mercado significativa (Johnson, 2000).

El β -caroteno es ahora ampliamente utilizado como un aditivo en la industria alimentaria para mejorar el color de ciertos alimentos y bebidas. Los estudios muestran que tiene alta actividad antioxidante, además de las funciones beneficiosas para la salud, tales como la prevención y / o protección contra el cáncer, enfermedades cardiovasculares y adenomas colorrectales (Qiu, Chen, y Li, 2009; Ramoneda, Ponce Cevallos, Buera, y Elizalde, 2011; Yuan, Gao, Mao, y Zhao, 2008) debido a su estructura altamente insaturada, carotenoides son propensos a la degradación por la temperatura durante el procesamiento y almacenamiento (Achir, Randriana toandro, Bohuon, Laffargue, y Avallone, 2010). La demanda actual de alimentos funcionales es y el aumento de los beneficios proporcionados por este tipo

de ingredientes, incluido el aumento de las funciones fisiológicas, tener efectos positivos impactos sobre la salud humana y las implicaciones comerciales. Específicamente, nanoemulsiones y las partículas coloidales (por ejemplo, nanocristales, nanopartículas, etc.) utilizados como sistemas de micronutrientes y ciertos productos nutracéuticos, están teniendo efectos importantes en el desarrollo de mejores productos y sistemas multifuncionales (Lesmes y McClements, 2009; Onwulata, 2013).

3.3.2 Antocianinas residuales

La Figura 21 muestra el comportamiento de las antocianinas durante el periodo de almacenamiento de la bebida con jugo de fresa, consideradas como muestras control a las que no se les incorporó β -caroteno. Cabe destacar que, la goma arábica es ampliamente utilizada en los sistemas de alimentos y bebidas como emulsionante (Bénech de 2008, Dluzewska et al., 2014 y Williams y Phillips, 2009), y por lo tanto es un buen candidato para la investigación sobre su potencial para inhibir la degradación de antocianinas en la presencia de ácido ascórbico. En la Figura 21 se aprecia que, la mayor variabilidad en la determinación de antocianinas totales la presentaron las muestras sin ningún tratamiento, atribuido a que no existió un sistema de estabilización como son las gomas lo que no permitió una distribución homogénea de los componentes lo cual tuvo influencia en las determinaciones de antocianinas ya que se mostraron valores de hasta 600 Unidades.

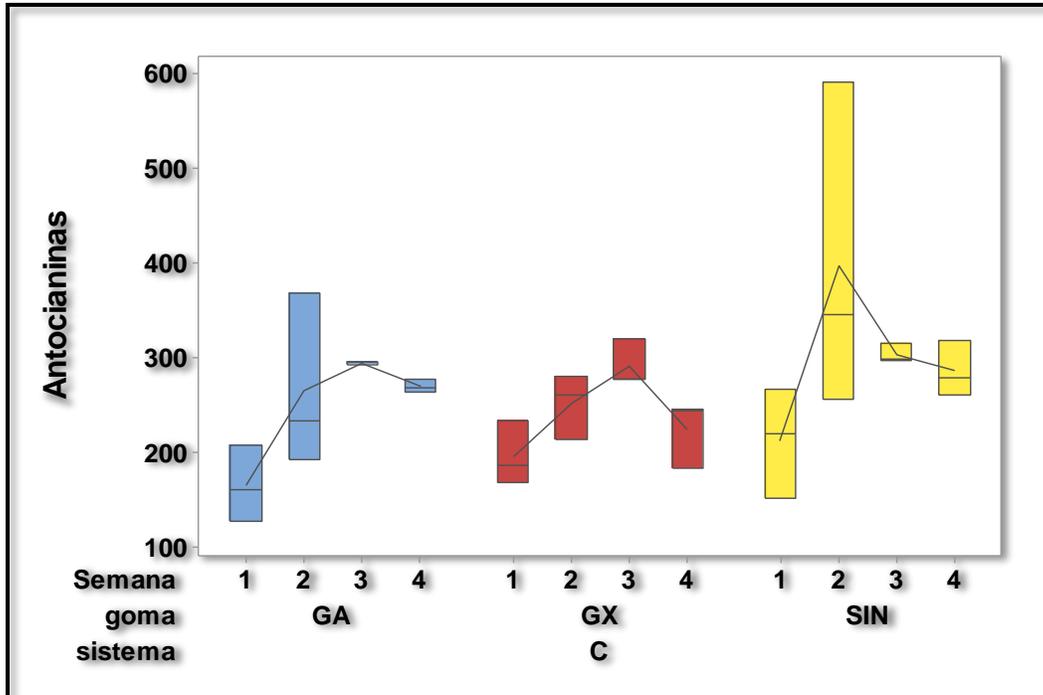


Figura 21. Cambios en el contenido de antocianinas totales para las muestras control en bebidas con 30 % de jugo de fresa, sin β -caroteno.

La Figura 22 por otra parte muestra el comportamiento de las antocianinas en aquellas bebidas que contenían nanocápsulas o nanoemulsión con β -caroteno. Se observa en el gráfico las variaciones de las antocianinas, se hace referencia a una concentración inicial de entre 600 y 700 unidades de antocianinas, la disminución de estas a partir de la 2 semana de almacenamiento, enseguida se mantienen constantes entre 150 y 200 unidades, esta disminución la podemos atribuir al tratamiento térmico (pasteurización), que se le dio a la bebida, a la exposición a la luz y oxígeno, para cuando se hacían las mediciones en las muestras cada semana.

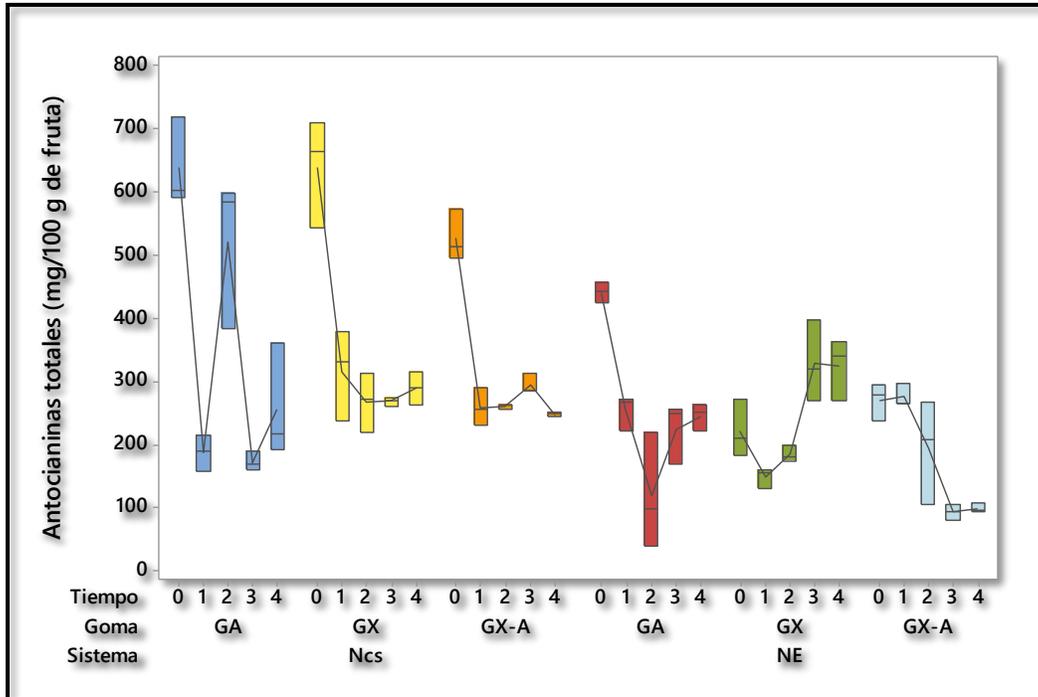


Figura 22. Comportamiento de las antocianinas totales durante el almacenamiento de bebidas con 30 % de jugo de fresa e incorporadas con sistemas de talla submicrónica con β -caroteno

Se ha demostrado el potencial de la utilización de biopolímeros como la goma árabe, la poli- ϵ -caprolactona y compuestos fenólicos para mejorar la estabilidad de las antocianinas mediante la formación de complejos no covalentes (Brenes et al., 2005, Buchweitz et al., 2013A, Buchweitz et al., 2013b, Ferrari et al., 2013, Hernández-Herrero y Frutos, 2015 y Sari et al., 2012). Por ejemplo, se ha demostrado que las antocianinas interactúan con pectinas a través de enlaces de hidrógeno o interacciones hidrófobas, lo que resulta en una mayor estabilidad de las antocianinas (Buchweitz et al., 2013A y Fernandes et al., 2014).

La estabilidad de las antocianinas en alimentos está influenciada por un gran número de factores, incluyendo las condiciones de procesamiento y almacenamiento (Temperatura, oxígeno, luz), las propiedades físicas y químicas de los alimentos (actividad enzimática, el pH y el contenido de azúcar etc.) (Jackman et al., 1987;

Romero y Bakker, 2000; Kirca et al., 2007). La temperatura es el factor más importante que afecta la estabilidad de las antocianinas en el procesamiento y almacenamiento de alimentos. Aunque la mayor parte de alimentos se puede consumir en forma natural y sin ningún tipo de procesamiento, la demanda del mercado mundial de estos exige una profunda transformación, para extender la vida útil. El tratamiento térmico es el más común y método eficaz para la conservación de los alimentos, pero puede resultar significativa pérdida de calidad, en su mayoría relacionados con la degradación rápida de compuestos fenólicos y /o bioactivos (Sadilova et al, 2007; Patras et al, 2010).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La adición de goma xantana y/o arábica contribuyeron a mantener una turbidez homogénea y estable durante el tiempo almacenamiento el producto, siendo las muestras con nanocápsulas las que mantuvieron mejor las características; las formulaciones con goma arábica fueron las que presentaron menor variación en la acidez y pH en comparación de las muestras control. La adición de goma arábica afecto también los ° Brix los que una vez alcanzado el equilibrio aumentaron en un ° Bx sin que por ello se viera afectada su estabilidad al almacenamiento.

La nanoencapsulación proporciono un efecto protector adicional a los compuestos presentes (antocianinas y carotenoides) a estos compuestos que son propensos a la degradación y que son importantes en la composición química del jugo, así como en el aspecto y la calidad misma del alimento, se concluyó que las sistemas que contenían nanocápsulas y la mezcla de gomas, además del sistema con nanoemulsión y goma arábica, fueron quien presentaron una menor perdida de β -caroteno. Aunque ya se mencionaron algunas causas de la degradación de compuestos, podemos apreciar cambios favorables que se le atribuyen a las nanocápsulas y/o a la nanoemulsión, como son el aumento de la luminosidad, para las muestras que contenían nanocápsulas y goma xantana-arabiga, y el aumento de la cromaticidad.

Se recomienda utilizar un tratamiento no térmico para reducir la carga microbiana en la bebida a base de fresa y así conservar las antocianinas y otros compuestos termolábiles que representen un beneficio al consumidor como lo son los nutraceuticos. Así mismo, utilizar diferentes tipos de polisacáridos que favorezcan la estabilidad coloidal del sistema y así favorezca la luminosidad y turbidez de las muestras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.O.A.C. (1995). *Official Methods of Analysis*. 16th edition Arlington Virginia: Association of Official Analytical Chemists International. E.U.A.
- A.O.A.C. (2005). Official Method 942.15. Acidity (Titratable) of Fruit Products. Official method of Analysis of AOAC International, ed. 18, Cap. 37, p.10.
- Abid, S., Jabbar, B., Hu, M.M., Hashim, T., Wu, S. Lei. (2014). Thermosonication as a potential quality enhancement technique of apple juice.
- Achir, N., Randrianatoandro, V. A., P., Laffargue, A., & Avallone, S. (2010). Kinetic study of b-carotene and lutein degradation in oils during heat treatment. *European Journal of Lipid Science and Technology*.
- Angulo C.R. 2003. "Frutales Exóticos de Clima Frío". BayerCropScience S.A. Bogotá. El cultivo de la Mora. 99-118.
- Barbosa, M.L.M., Borsarelli, C.D. y Mercadante, A.Z. (2005). Light stability of spraydried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations. *Food Research International*.
- Black, D. L., McQuay, M. Q., & Bonin, M. P. (1996). Laser-based techniques for particle-size measurement: a review of sizing methods and their industrial applications. *Progress in energy and combustion science*, 22(3), 267-306.
- Brenes, C.H. Brenes, D. del Pozo-Insfran, S.T. Talcott, (2005). Stability of copigmented anthocyanins and ascorbic acid in a grape juice model system *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (1) (2005), pp. 49–56.
- Brigelius-Flohe and Traber, R. Brigelius-Flohe, M.G. Traber (1999). Vitamin E: Function and metabolism *Faseb Journal*, 13 (1999), pp. 1145–1155.
- Britton, G., & Khachik, F. (2009). Carotenoids in Food. In G. Britton, H. Pfander, & S. Liaaen-Jensen (Eds.), *Carotenoids* (vol. 5, pp. 45–66). Basel: Birkhäuser.
- Buchweitz, M. Buchweitz, M. Speth, D.R. Kammerer, R. Carle (2013). Stabilisation of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) anthocyanins by different pectins *Food Chemistry*, 141 (3) (2013), pp. 2998–3006.

- Cao, X., Zhang, Y., Zhang, F., Wang, Y., Yi, J., Liao, X. (2011). Effects of high hydrostatic pressure on enzymes, phenolic compounds, anthocyanins, polymeric color and color of strawberry pulps. *J. Sci. Food Agric.* 91 (5), 877-885.
- Chanamai, R., McClements, D.J. (2002). Comparison of gum arabic, modified starch, and whey protein isolate as emulsifiers: Influence of pH, CaCl₂ and temperature *J. Food Sci.*, 67 (1) (2002), pp. 120–125.
- Chaudhry Q, Scotter M, Blackburn J, Ross B, Boxall A, Castle L, Aitken R, Watkins R (2008) Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. *Food Addit Contam* 25 (3):241–258.
- Chen H, Weiss J, Shahidi F (2006a) Nanotechnology in nutraceuticals and functional foods. *Food Technol* 3:30–36.
- Chen L, Remondetto GE, Subirade M (2006b) Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends Food Sci Technol* 17:272–283.
- Chu, B.S. Chu, S. Ichikawa, S. Kanafusa, M. Nakajima (2007). Preparation and characterization of beta-carotene nanodispersions prepared by solvent displacement technique *J. Agric. Food Chem.*, 55 (16) (2007), pp. 6754–6760.
- Collado-Fernández M, M.L. Gonzalez-Sanjosé & R. Pino-Navarro. (2000). Evaluation of turbidity: correlation between kerstex turbidimeter and nephelometric turbidimeter *Food Chem.*, 71:563-566.
- Constantinides, P.P. Constantinides, J. Han, S.S. Davis (2006). Advances in the use of tocopherols as drug delivery vehicles *Pharm. Res.*, 23 (2006), pp. 243–255.
- Coronel P. Coronel, J. Simunovic, K.P. Sandeep (2003). Temperature profiles within milk after heating in a continuous-flow tubular microwave system operating at 915 MHz.
- Coronel, P. Coronel, J. Simunovic, K.P. Sandeep, G.D. Cartwright, P. Kumar (2008). Sterilization solutions for aseptic processing using a continuous flow microwave system *Journal of Food Engineering*, 85 (4) (2008), pp. 528–536.
- Cushen M, Kerry BJ, Morrisc M, Cruz-Romerob M, Cumminsa E (2012) Nanotechnologies in the food industry and recent developments, risks and regulation. *Trends Food Sci Technol* 24:30–46.

- Di Mattia, C.D. Di Mattia, G. Sacchetti, D. Mastrocola, P. Pittia (2009). Effect of phenolic antioxidants on the dispersion state and chemical stability of olive oil O/W emulsions *Food Research International*, 42 (2009), pp. 1163–1170.
- F. Vaillant, A. Millan, M. Dornier, M. Decloux, M. Reynes Strategy for economical optimisation of the clarification of pulpy fruit juices using crossflow microfiltration *Journal of Food Engineering*, 48 (1) (2001), pp. 83–90.
- FAO/WHO (2010) FAO/WHO expert meeting on the application of nanotechnologies in the food and agriculture sectors. Potential food safety implications. Meeting report. FAO and WHO, Rome.
- Ferrari, C.C. Ferrari, S.P.M. Germer, I.D. Alvim, J.M. de Aguirre (2013). Storage stability of spray-dried blackberry powder produced with maltodextrin or gum Arabic *Drying Technology*, 31 (4) (2013), pp. 470–478.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAOSTAT). 2011. Base de datos estadísticos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO).
- Fossen, T., Cabrita, L., & Andersen, Ø. M. (1998). Color and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. *Food Chemistry*, 63, 435–440.
- Foster, T., Vasavada, P. (2003). Beverage Quality and Safety. *Institute of Food Technologists*: 15-28.
- G.A. Garzón, R.E. Wrolstad (2002). Comparison of the stability of pelargonidin-based anthocyanins in strawberry juice and concentrate.
- Garcia Viguera, C 1994. The effect of pH on the formation of coloured compounds in model solutions containing anthocyanins, catechin and acetaldehyde: 33, 37-40.
- Geankoplis C. J., “Procesos de Transporte y Operaciones Unitarias”, 3a ed., Compañía Editorial Continental, México, (1998), pp. 647-651.
- Gharsallaoui, A. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research*.
- Giuliani, R. Giuliani, A. Bevilacqua, M.R. Corbo, C. Severini (2010). Use of microwave processing to reduce the initial contamination by *Alicyclobacillus*

- acidoterrestris in a cream of asparagus and effect of the treatment on the lipid fraction *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11 (2), 328–334.
- Goyeneche, R., Agüero, M. V., Roura, S., & Di Scala, K. (2014). Application of citric acid and mild heat shock to minimally processed sliced radish: color evaluation. *Postharvest Biology and Technology*, 93, 106–113.
- Grillo, R., Pereira dos Santos, N.Z., Maruyama, C.R., Rosa, A.H., Lima, L., Fraceto, L.F. (2012). Poly-caprolactones nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. *Journal of Hazardous Materials* (231-232),1-9.
- Haftel, L., Berkovich, Z., & Reifen, R. (2015). Elevated milk b-carotene and lycopene after carrot and tomato paste supplementation. *Nutrition*, 31(3), 443–445.
- Hall RH (2002) Biosensor technologies for detecting microbiological food borne hazards. *Microbes Infect* 4:425–432.
- Huang QR, Yu HL, Ru QM. (2009) Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. *J Food Sci Epub*. Online 10 Dec 2009.
- Institute of Food and Agricultural Science (IFAS) Agriculture Business Center, 2008.
- Jackman, R.L., Yada, R.Y., Tung, M.A., Speers, R.A., 1987. Anthocyanins as food colorants - a review. *J. Food Biochem*. 11 (3), 201-247.
- Jaffe, H., Giang, P.A., Hayes, D.K., Miller, J.A. (1981). Stroud BH. Controlled release pesticides and pharmaceuticals. New York: Plenum. 303.
- Kralova and Sjoblom, 2009 I. Kralova, J. Sjoblom Surfactants used in food industry: A review *J. Dispersion Sci. Technol.*, 30 (9) (2009), pp. 1363–1383.
- Lopez,T.M. (2011). Introducción a la nanotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. México.
- Mannino S, Scampicchio M (2007) Nanotechnology and food quality control. *Vet Res Commun* 31(1):149–151.
- Marquart, L. C. (1835). Die Farben der Blüten, Eine chemisch-physiologische Abhandlung (p. 92). Habicht, Bonn.
- McClements, D.J. McClements (2010). Edible nanoemulsions: Fabrication, properties, and functional performance *Soft Matter*, 7 (6) (2011), pp. 2297–2316.

- Mellado-Ortega, E., & Hornero-Méndez, D. (2016). Carotenoid evolution during short-storage period of durum wheat (*Triticum turgidum* conv. durum) and tritordeum (*Tritordeum* Ascherson et Graebner) whole-grain flours. *Food Chemistry*, 192, 714–723.
- Mirhosseini, C.P. Tan, N.S.A. Hamid, S. Yusof (2008). Effect of Arabic gum, xanthan gum and orange oil on flavor release from diluted orange beverage emulsion *Food Chem.*, 107 (3) (2008), pp. 1161–1172.
- Miyazaki, K., Islam N. (2007) Nanotechnology systems of innovation- An analysis of industry and academia research activities.
- Moinard-Checot, D., Chevalier Y., Briancon 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.
- Mora-Huertas, C.E., Fessi, H., & Elaissari, A. (2010). Polymer based nanocapsules for drugdelivery. *International Journal of pharmaceutics*, 385 (1-2), 113-142.
- Muller and Peters, 1998 R.H. Muller, K. Peters Nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs. I. Preparation by size-reduction technique *Int. J. Pharm.*, 160 (1998), pp. 229–237.
- Ne Cheong et al., 2008 J. Ne Cheong, C. Ping Tan, Y.B. Che Man, M. Misran α -Tocopherol nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation *J. Food Eng.*, 89 (2008), pp. 204–209.
- NMX-F-103-1982. Alimentos frutas y derivados determinación de grados brix.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-173-SCFI-2009, Jugos de frutas preenvasados- Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba.
- Osipenko, S.B., Lesnikov, S.E., (2008). Soybean paste 2C and method for preparing thereof. Patent application US 20090181151-A1. Priority from 16.07.2009.
- Ozturk et al., 2014 B. Ozturk, S. Argin, M. Ozilgen, D.J. McClements Formation and Stabilization of Nanoemulsion-Based Vitamin E Delivery Systems using Natural Surfactants: Quillaja Saponin and Lecithin *J. Food Eng.*, 142 (2014), pp. 57–63.
- Phan-Thi, H., Durand, P., Prost, M., Prost, E., & Waché, Y. (2016). Effect of heatprocessing on the antioxidant and prooxidant activities of b-carotene from

- natural and synthetic origins on red blood cells. *Food Chemistry*, 190, 1137–1144.
- Pinto-Reis, Neufeld, R. J., Ribeiro, A.J, Veiga F. (2008). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology Biology and Medicine*, Volume 2 Issue 1, 8- 21
- Piorkowski and McClements, 2014 D.T. Piorkowski, D.J. McClements Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications *Food Hydrocolloids*, 42 (2014), pp. 5–41.
- Pitt, C.G, Marks, T.A. Schindler, A. (1980). Controlled release of bioactive materials. New York: Academic Press.19. *Process Eng.* 37 (6), 609e618. processing technology. *J. Food Eng.* 152 (1), 8e16.
- Proyecto de norma oficial mexicana proy-nom-173-scfi-2008, jugos de frutas pre envasados- denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba.
- Qiu, D., Chen, Z., & Li, H. (2009). Effect of heating on solid β -carotene. *Food Chemistry*, 112(2), 344-349.
- R. Charoen, A. Jangchud, K. Jangchud, T. Harnsilawat, O. Naivikul, D.J. McClements Influence of biopolymer emulsifier type on formation and stability of rice bran oil-in-water emulsions: Whey protein, gum arabic, and modified starch *J. Food Sci.*, 76 (1) (2011), pp. E165–E172.
- Ranganna S., *Handbook of “Analysis and Quality Control for Fruit and Vegetables Products”* second edition (1977), pp. 879-881.
- Richardson, P. (2004). *Improving the thermal processing of foods*. Cambridge England: CRC Press.
- Sadilova, E., Carle, R., Stintzing, F.C., 2007. Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Mol. Nutr. Food Res.* 51 (12), 1461-1471.
- Sadilova, E., Stintzing, F. C., Kammerer, D. R., & Carle, R. (2009). Matrix dependent impact of sugar and ascorbic acid addition on color and anthocyanin stability of black carrot, elderberry and strawberry single strength and from concentrate

- juices upon thermal treatment. *Food Research International*, 42(8), 1023e1033
- Sangamithra A, Thirupathi V (2009) Nanotechnology in food.
- Satanina, V., Kalt, W., Astatkie, T., Havard, P., Martynenko, A., 2014. Comparison of anthocyanin concentration in blueberries processed using hydrothermodynamic
- Sen Gupta, B., Masterson, F., Magee, T.R.A., 2005. Inactivation of *E. coli* in cranberry juice by a high voltage pulsed electric field. *Eng. Life Sci.* 5 (2), 148-151.
- Shahidi and Zhong, 2011 F. Shahidi, Y. Zhong Revisiting the polar paradox theory: A critical overview *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (2011), pp. 3499–3504.
- Siller. M. F., Cepeda R. N. et al., 2002 Estudio de la polimerización de antiocianinas provenientes de la fresa ananassa: p 345-398.
- Surassmo S, Min SG, Bejrappa P, Choi MJ (2009) Effects of surfactants on the physical properties of capsicum-oleoresin-loaded nanocapsules formulated through the emulsion-diffusion method. *Food Research Int* 43(1):8–17.
- Tan and Nakajima, 2005 C.P. Tan, M. Nakajima β -Carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation *J. Food Chem.*, 92 (2005), pp. 661–671.
- Tan, 2004 C.T. Tan Beverage emulsions S. Friberg, K. Larsson, J. Sjoblom (Eds.), *Food Emulsions* (4th ed.), Marcel Dekker, New York (2004), pp. 485–524.
- Velikov and Pelan, 2008 K.P. Velikov, E. Pelan Colloidal delivery systems for micronutrients and nutraceuticals *Soft Matter*, 4 (10) (2008), pp. 1964–1980.
- W. Guo, Y. Liu, X. Zhu, S. Wang Temperature-dependent dielectric properties of honey associated with dielectric heating *Journal of Food Engineering*, 102 (3) (2011), pp. 209–216.
- Warad HC, Dutta J (2005) Nanotechnology for agriculture and food systems – a view.
- Williams and Phillips, 2009 P.A. Williams, G.O. Phillips *Gum Arabic Handbook of Hydrocolloids* (vol. 173) (2nd ed.) (2009), pp. 252–273.
- Wrolstad, R.E. 2001. Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC. *Current Protocols in Foods Analytical Chemistry*. Copyright 2001 44p 66.

- 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.
- Zhang, Y., Yang, M., Portney, N. G., Cui, D., Budak, G., Ozbay, E., & Ozkan, C. S. (2008). Zeta potential: a surface electrical characteristic to probe the interaction of nanoparticles with normal and cancer human breast epithelial cells. Biomedical microdevices, 10(2), 321-328.