

Tesis Doctoral

Efecto de la trehalosa sobre la encapsulación de aromas cítricos por secado spray

Sosa, Natalia

2012-07-02

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Sosa, Natalia. (2012-07-02). Efecto de la trehalosa sobre la encapsulación de aromas cítricos por secado spray. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Sosa, Natalia. "Efecto de la trehalosa sobre la encapsulación de aromas cítricos por secado spray". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012-07-02.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Industrias

Efecto de la trehalosa sobre la encapsulación de aromas cítricos por secado spray.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Industrial

Natalia Sosa

Directora de tesis: Dra. Carolina Claudia Schebor

Director asistente: Dr. Oscar Edgardo Pérez

Consejera de estudios: Dra. Stella Maris Alzamora

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2012

Resumen

Efecto de la trehalosa sobre la encapsulación de aromas cítricos por secado spray

El objetivo fue estudiar la aplicación del azúcar trehalosa en la encapsulación de aromas apuntando a mejorar la calidad sensorial y la estabilidad física de aromas encapsulados por secado spray.

Se prepararon formulaciones conteniendo trehalosa, sacarosa, mezclas de los azúcares con maltodextrina y almidones. Los volátiles fueron: etanol, citral y aceite esencial de naranja. Para los volátiles hidrofóbicos se prepararon emulsiones y se analizaron propiedades reológicas y de estabilidad. Se evaluaron propiedades físicas de los polvos. Se cuantificó la retención de volátiles y se realizó la evaluación sensorial de los aromas cítricos.

La retención de citral encapsulado fue la misma para todas las formulaciones. Por el contrario, el perfil de volátiles obtenido en el caso del aceite de naranja fue muy diferente para las formulaciones conteniendo sacarosa o trehalosa. Estos resultados indican la importancia del azúcar seleccionado para el desarrollo de aromas encapsulados y la posibilidad de diseñar aromas en polvo diferentes a partir de un mismo aroma.

El uso de la trehalosa como matriz en la encapsulación generó ventajas respecto al uso de la sacarosa, tales como incremento de la T_g del producto, y la capacidad de conservar el aroma característico del aceite de naranja en el almacenamiento.

Palabras claves: trehalosa, encapsulación, secado spray, análisis sensorial, propiedades físicas.

Abstract

Effect of trehalose on citric aroma encapsulation by spray-drying

The objective of the present work was to study the application of the sugar trehalose on the encapsulation of aromas, aiming on improving the sensorial quality and the physical stability of the spray-dried aromas.

The formulations contained trehalose, sucrose, mixtures of sugars with maltodextrin and modified starches. The volatiles were: ethanol, citral and orange essential oil. In the case of hydrophobic volatiles, emulsions were prepared. Rheological properties and stability were analyzed. Physical properties of the powders were evaluated. Volatiles were quantified and sensorial evaluation was done for citric aromas.

The encapsulated volatiles were retained differentially in the different. Citral retention was the same in all the analyzed formulations. The volatiles profile obtained for orange oil was very different for trehalose and sucrose formulations. These results indicate the relevance of the sugar selection for the development of encapsulated aromas, and the possibility of designing different powdered aromas from a single aroma.

Also, we found that the use of trehalose as part of the carrier matrix for encapsulation showed advantages as compared to sucrose, higher T_g values were obtained, and the characteristic aroma of orange essential oil was maintained during storage.

Keywords: trehalose, encapsulation, spray-drying, sensorial analysis, physical properties.

Agradecimientos

A todos los que de una manera u otra hicieron posible la realización de esta tesis.

A mi directora la Dra. Carolina Schebor por su invaluable aporte durante el trabajo de investigación y escritura de mi tesis, por su constante guía, apoyo, comprensión, confianza y calidez humana. Valoro mucho el trabajo diario que realizo junto a ella.

Al mi director asistente el Dr. Oscar Pérez por sus aportes científicos y humanos indispensables para realizar este trabajo de tesis.

A la Dra. Clara Zamora por su enseñanza, apoyo científico, y sobre todo por su comprensión e inmensa calidez humana a lo largo de estos años. Al Dr. Jorge Chirife por su aporte profesional. A las integrantes del laboratorio: Cristi, Rosa, Caro y Virginia por los lindos momentos. En especial a Mara por los aportes a mi trabajo y por ser una gran amiga. Y a todos los panelistas quienes, prestaron su tiempo para llevar a cabo las evaluaciones.

A la Dra. Catalina van Baren por su enseñanza, apoyo en todo momento y por permitirme aprender y trabajar con el cromatógrafo. A Paola y Daiana por su amabilidad y guía en el uso de los equipos.

Al CONICET y la ANPCyT por las becas otorgadas y a las instituciones que aportaron el lugar de trabajo: FCEN-UBA, Facultad de Ciencias Agrarias-UCA y FFyB-UBA.

A la Dra. Pilar Buera y a mis compañeros de laboratorio: Flor, Betty, Silvi, Abel, Cristina, Mario, Pato, Christian y Mariela por toda la ayuda que me brindaron y por los lindos momentos compartidos. En especial a Peggy, Analí, Vero, Marce, Sole, Jaime, Lore y Paula por las largas horas de estudio y los momentos inolvidables que juntos compartimos dentro y fuera del laboratorio.

A mis compañeras del departamento de química orgánica: Lali, Gabriela y en especial a Graciela por acompañarme en todo momento.

A Daniela, Andrea, Eli, Lore y Silvio por los trabajos realizados en conjunto.

A los integrantes del laboratorio de la Dra. Pilosof, Juli, Victor, Kari, Caro, Edith, Fede, Mariana y Paula quienes siempre estuvieron dispuestos a ayudarme y por los festejos compartidos. En especial a Nerina a quien siempre recordaré por su inmensa ayuda en este trabajo y por las hermosas charlas que teníamos a diario.

A la Dra. Lía Gerschenson por permitirme utilizar el agitador de su laboratorio.

A quienes además me apoyaron emocionalmente y siempre están a mi lado.

A mi esposo Alejandro y mi hijo Atilio a quienes amo con todo mi corazón, por su amor, aliento, compañía y apoyo en todas las decisiones y proyectos emprendidos.

A mis padres y mis hermanos por su amor, comprensión y por ser mi apoyo incondicional en todas mis elecciones. Mi tía María y Priscila por acompañarme en siempre con tanto cariño. Mi suegra Graciela, por su presencia en todo momento.

A mis amigas; Daniela, Mariana, Nadia y Rosalba (quien me introdujo en la investigación), por la hermosa amistad que compartimos.

A mi esposo Alejandro,
a mi hijo Atilio.

I. INTRODUCCIÓN.....	10
I.1 Aromas en los alimentos.....	11
I.1.1 Aromas cítricos.....	12
I.2 Encapsulación de aromas.....	15
I.2.1 Métodos generales de encapsulación	16
I.2.1.1 Secado spray.....	18
I.2.1.2 Extrusión.....	21
I.2.1.3 Recubrimiento en lecho fluidizado.....	23
I.2.1.4 Liofilización	24
I.2.1.5 Coacervación compleja.....	27
I.2.1.6 Complejos de inclusión.....	28
I.2.1.7 Atrapamiento en liposomas	29
I.2.2 Materiales “carrier” para encapsulación.....	30
I.2.2.1 Maltodextrinas.....	32
I.2.2.2 Almidones modificados.....	32
I.2.2.3 Sacarosa	34
I.2.2.4 Trehalosa	35
I.3 Emulsiones	39
I.3.1 Emulsiones aceite-agua	39
I.3.1.1 Mecanismos físicos de desestabilización de emulsiones	42
I.3.2 Procesos de formación de emulsiones.....	45
I.3.2.1 Homogeneización primaria y secundaria.....	45
I.3.2.2 Procesos críticos durante la formación de emulsiones	46
I.3.2.3 Equipos de homogeneización.....	48
I.3.3 Evaluación de la eficiencia en la homogeneización	50
I.3.3.1 Métodos basados en la dispersión de luz.....	50
I.3.3.2 Distribuciones de tamaño de partícula.....	52
I.4 Sistemas deshidratados	56
I.4.1 Propiedades físicas de sistemas deshidratados	56
I.4.1.1 Actividad de agua e isothermas de sorción de agua	56

I.4.1.2 Estado vítreo y estabilidad.....	58
I.4.2. Cambios influenciados por los procesos de secado	67
I.4.2.1 Reacciones bioquímicas.....	70
I.4.2.2 Transformaciones físicas	71
I.4.2.3 Estabilidad del aroma encapsulado durante el almacenamiento	74
II. OBJETIVOS	79
II.1 Objetivo general	80
II.2 Objetivos específicos	81
III. MATERIALES Y MÉTODOS	83
III.1 Elección de los sistemas.....	84
III.2 Preparación de los sistemas.....	84
III.2.1 Encapsulación de etanol	84
III.2.1.1 Preparación de las soluciones.....	85
III.2.1.2 Secado de las soluciones	85
III.2.1.2.a Secado spray	85
III.2.1.2.b Liofilización.....	86
III.2.1.3 Almacenamiento	87
III.2.2 Encapsulación de aceites cítricos.....	88
III.2.2.1 Preparación de emulsiones frescas	88
III.2.2.1.a Emulsiones conteniendo citral	88
III.2.2.1.b Emulsiones conteniendo aceite de naranja	89
III.2.2.2 Secado spray de las emulsiones	90
III.2.2.3 Almacenamiento	91
III.2.2.4 Preparación de emulsiones reconstituidas.....	91
III.3 Determinaciones.....	91
III.3.1 Caracterización y estabilidad de emulsiones.....	91
III.3.1.1 Reometría.....	91
III.3.1.2 Estabilidad	94
III.3.1.3 Movilidad molecular.....	97
III.3.1.4 Análisis estadístico	100

III.3.2 Caracterización de los polvos	100
III.3.2.1 Contenido de agua	100
III.3.2.2 Transiciones vítreas.....	101
III.3.2.3 Movilidad molecular	103
III.3.2.4 Microscopía electrónica de barrido.....	104
III.3.2.5 Análisis estadístico	104
III.3.3 Análisis de volátiles	104
III.3.3.1 Determinación de etanol.....	104
III.3.3.2 Determinación de citral.....	106
III.3.3.2.a Cromatografía gaseosa	106
III.3.3.2.b Evaluación sensorial	108
III.3.3.3 Determinación de aceite esencial de naranja.....	110
III.3.3.3.a Cromatografía gaseosa	110
III.3.3.3.b Evaluación sensorial	118
IV. RESULTADOS	125
IV.1 Capítulo I: Encapsulación de etanol.....	126
IV.1.1 Caracterización de los polvos.....	126
IV.1.1.1 Propiedades de sorción de agua	127
IV.1.1.2 Transiciones térmicas.....	128
IV.1.1.3 Movilidad molecular	130
IV.1.2 Retención de etanol.....	132
IV.1.3 Resultados relevantes.....	138
IV.2 Capítulo II: Encapsulación de aceites cítricos	140
IV.2.1 Citral	140
IV.2.1.1 Caracterización de las emulsiones.....	140
IV.2.1.1.a Reometría	140
IV.2.1.1.b Distribución y tamaño de gota	143
IV.2.1.1.c Movilidad molecular	146
IV.2.1.2 Estabilidad de las emulsiones	148
IV.2.1.3 Caracterización de los polvos conteniendo citral encapsulado	151
IV.2.1.3.a Propiedades de sorción de agua.....	152

IV.2.1.3.b Transiciones térmicas y movilidad molecular	153
IV.2.1.4 Retención de citral	155
IV.2.2 Aceite esencial de Naranja	158
IV.2.2.1 Caracterización de las emulsiones	158
IV.2.2.1.a Reometría	158
IV.2.2.1.b Distribución y tamaño de gota	162
IV.2.2.1.c Movilidad molecular	166
IV.2.2.2 Estabilidad de las emulsiones	166
IV.2.2.3 Caracterización de los polvos conteniendo aceite esencial de naranja encapsulado	170
IV.2.2.3.a Propiedades de sorción de agua	170
IV.2.2.3.b Transiciones térmicas y movilidad molecular	171
IV.2.2.3.c Microscopía electrónica de barrido (SEM)	173
IV.2.2.4 Retención de aceite esencial de naranja	174
IV.2.2.4.1 Análisis por cromatografía gaseosa	175
IV.2.2.4.2 Evaluación sensorial	183
IV.2.2.4.3 Comparación de datos cromatográficos y sensoriales	187
IV.2.3 Resultados relevantes	191
V. CONCLUSIONES	193
VI. BIBLIOGRAFÍA	197

I. Introducción

I.1 Aromas en los alimentos

El aroma es una propiedad organoléptica que viene dada por diferentes sustancias volátiles presentes en los alimentos, de manera natural u originada durante su procesamiento. El aroma es un aspecto que puede alterarse con facilidad. Durante el procesado o el almacenamiento de los alimentos se desarrollan muchas reacciones y en cada una de ellas se sintetizan o destruyen componentes directamente relacionados con el aroma final. El aroma es la impresión combinada de olor y sabor sobre los órganos sensoriales. Al consumir un alimento, la interacción de las sensaciones sápidas, olorosas y de la textura produce la sensación global que se describe mediante el término inglés "flavour" (Belitz y Grosch, 1987). Aunque el estímulo del sabor es importante, la parte del flavor que aprecia diferencias entre alimentos puede atribuirse ampliamente a moléculas volátiles aromáticas pequeñas detectadas a nivel retronasal, cuando el alimento es introducido en la boca (Land, 2006).

En los alimentos se detecta un gran número de compuestos aromáticos volátiles, pero no todos contribuyen al aroma de los mismos. Se han descrito diferentes técnicas para determinar los volátiles que son potencialmente capaces de contribuir a la percepción aromática dependiendo de la concentración en que se encuentren y de sus umbrales de percepción sensorial (Reineccius, 2006). Si bien el gusto juega un papel importante en la descripción de un alimento o bebida, es el aroma el que contribuye en mayor medida a la percepción del sabor, el número de sensaciones olorosas que se pueden percibir es muy amplio, siendo imposible describir el mundo oloroso en términos de componentes primarios (Calviño, 1995).

I.1.1 Aromas cítricos

Las frutas cítricas principalmente se procesan como jugo, pero el aceite de la capa externa de la cáscara juega un rol importante en la obtención de aromas cítricos.

En la **Figura 1** se presentan los constituyentes de un fruto cítrico. Como puede observarse en la **Figura 1a** se ven partes bien diferenciadas: el flavedo o cáscara que presenta vesículas conteniendo las glándulas generadoras de aceites esenciales y pigmentos, el mesocarpio o albedo una capa esponjosa blanca interna y el endocarpio constituido por varios segmentos o gajos que contienen las vesículas repletas de jugo y donde están también las semillas (Russeff y col., 2009). Una sección microscópica del flavedo que contiene las glándulas oleosas de la fruta se muestra en la **Figura 1b** (Dugo y col., 2002).

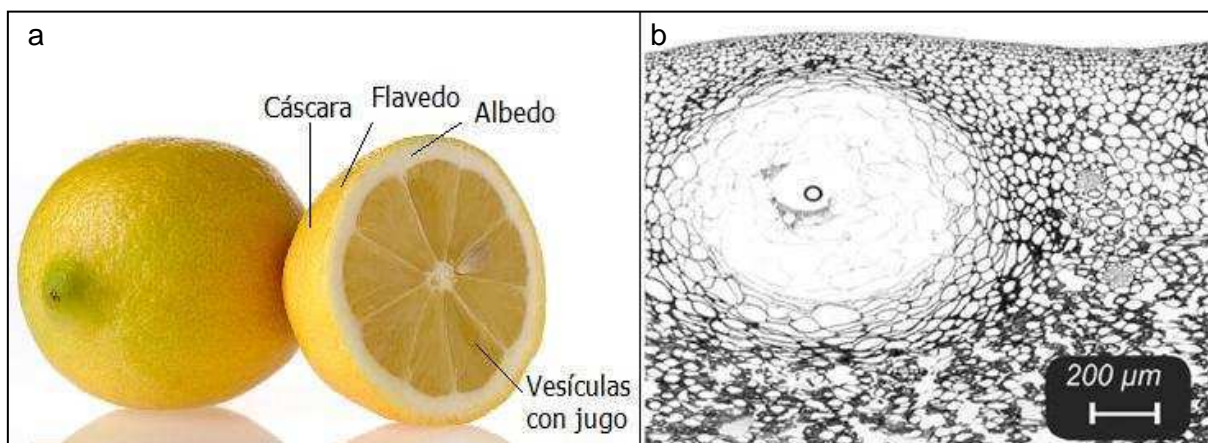


Figura 1. Sección transversal de un fruto cítrico (a). Micrografía mostrando la sección de la cáscara conteniendo el aceite esencial en las cavidades circulares (Dugo y col., 2002).

Los aromas cítricos derivados de fuentes naturales se presentan en un amplio rango que va desde el aroma ácido picante distintivo de las limas, pasando por el pungente del limón, hacia el aroma agradable de la naranja. Muchos de estos

aromas pertenecen a una familia de compuestos conocidos como terpenos y terpenoides. Como se puede ver en la **Figura 2**, los terpenos son moléculas pequeñas de hidrocarburos orgánicos, que pueden ser cíclicas o acíclicas, saturadas o insaturadas. Los terpenoides son derivados oxigenados de terpenos, que pueden contener grupos hidroxilos o grupos carbonilos.

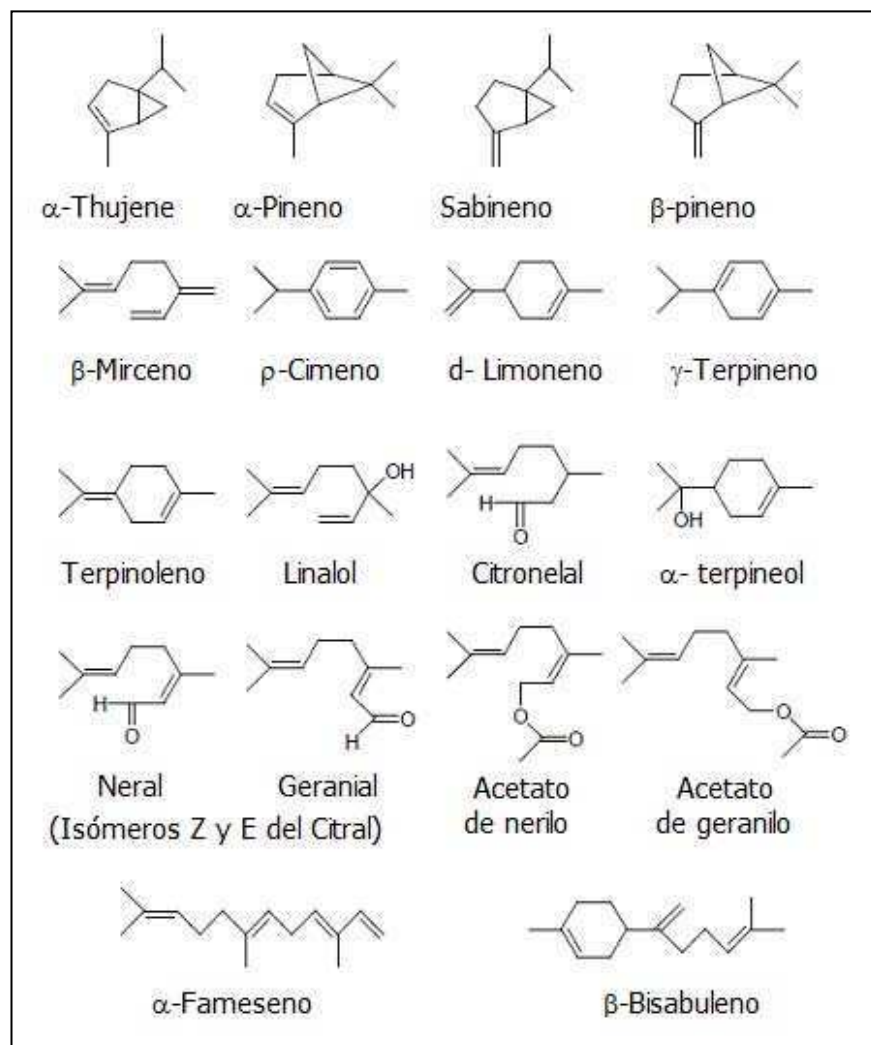


Figura 2. Estructuras de los terpenos y terpenoides presentes en las frutas cítricas. Adaptado de Smith y col. (2001).

A pesar de su diversidad estructural, los terpenos y terpenoides comparten ciertas similitudes. Los terpenos, como el limoneno y los terpenoides, tales como

neral o geranial se encuentran en abundancia en los sacos oleosos del flavedo en las cortezas de los cítricos. Estos aromas pueden ser fácilmente aislados a través una variedad de métodos, tales como prensado en frío, destilación por arrastre de vapor, o extracción (Smith y col., 2001).

El aroma de naranja es el más reconocido y apreciado en todo el mundo y se ha utilizado para dar sabor a una gran cantidad de alimentos y bebidas. El aceite esencial de naranja obtenido de la cáscara de la naranja, es una mezcla compleja de diversos componentes químicos, mayoritariamente de naturaleza terpénica. El componente más abundante es el limoneno (**Figura 2**), su concentración oscila entre el 79 y el 83% del total de los volátiles (Ikeda y col., 1962; Weiss, 1997). También los compuestos linalol, mirceno, α -pineno y sabineno, se han caracterizado por su contribución al aroma del aceite esencial de naranja (Arctander, 1969; Selli y col., 2003; Mazid y col., 2011).

El aroma de limón es el segundo en popularidad. El citral o 3,7-dimetil-2,6-octadienal o lemonal de fórmula molecular $C_{10}H_{16}O$, es el componente más importante del aroma de limón. Está compuesto por un par de terpenoides, los dos compuestos son isómeros de doble enlace. El isómero *trans* se conoce como *geranial* o citral A. El isómero *cis* se conoce como *neral* o citral B (**Figura 2**). El geranial tiene un fuerte olor a limón, mientras que el neral tiene un olor a limón menos intenso, pero más dulce. Su proporción en la cáscara de limón es de aproximadamente 40% neral y 60% geranial.

Los volátiles de cítricos se han estudiado ampliamente y varios autores han resumido los datos de composición y concentración que existen hasta el momento

(Nagy y Shaw, 1990; Chamblee y col., 1993; Tamura y col., 1993; Smith y col., 2001; Jordán y col., 2001, Dugo y col., 2002; Rouseff y col., 2009).

I.2 Encapsulación de aromas

La encapsulación es un proceso mediante el cual ciertas sustancias bioactivas de los alimentos (sabores, vitaminas o aceites esenciales) se introducen en una matriz o se encierran en una pared con el objetivo de impedir su pérdida, para protegerlos de la reacción con otros compuestos presentes en el alimento o para impedir que sufran reacciones de oxidación debido a la luz o al oxígeno. Una ventaja adicional es que un compuesto encapsulado se puede liberar gradualmente del compuesto que lo ha englobado o atrapado. Además, la encapsulación de ciertos compuestos permite obtener productos alimenticios con mejores características sensoriales y nutricionales (Dziezak, 1988; Jackson y Lee, 1991; Reineccius, 1991; Popplewell y col., 1995).

La utilización de microcápsulas abarca un amplio campo: la liberación controlada de sabores, colores, aromas, perfumes, drogas, etc. (Popplewell y col., 1995). Las aplicaciones de esta técnica se han ido incrementando en la industria alimentaria para proteger a los materiales de factores tales como el calor y la humedad, permitiendo mantener su estabilidad y características. Las microcápsulas también funcionan como barreras contra malos olores o sabores y ayudan a que los materiales frágiles resistan condiciones de procesamiento y empaque mejorando el sabor, aroma, estabilidad, valor nutritivo y apariencia de sus productos. Mediante la encapsulación de aromas, se reduce su volatilidad o se previenen reacciones indeseables en el alimento aun cuando se almacena por un periodo prolongado.

1.2.1 Métodos generales de encapsulación

Al momento de seleccionar un proceso de encapsulación deben considerarse factores tales como el tamaño partícula requerido, propiedades fisicoquímicas del agente encapsulante y la sustancia a encapsular, aplicaciones para el material microencapsulado, mecanismo de liberación deseado y el costo.

La encapsulación de aromas se puede dividir en dos grandes grupos de acuerdo a la función principal elegida: 1) la protección del aroma durante el almacenamiento, y 2) la liberación controlada del aroma durante el procesamiento del alimento, en la matriz alimentaria y durante el consumo del producto. En el primer caso, se trata de encapsulación en matrices en estado vítreo constituidas principalmente por carbohidratos. El segundo caso es mucho más complejo, tanto en composición de las matrices como en las tecnologías de preparación de los encapsulados. La morfología que se obtiene con los principales métodos de encapsulación de aromas se muestra en la **Figura 3** para el primer caso y en la **Figura 4** para el segundo caso.

En la **Tabla 1** se presentan diferentes métodos de encapsulación de aromas y los tamaños de partículas que se pueden obtener.

Tabla 1. Tamaños de partícula obtenidos por algunos métodos de encapsulación de aromas.

Métodos de encapsulación de aromas		Tamaño de partícula (μm)
Químicos	Coacervación simple	20-200
	Coacervación compleja	5-200
	Inclusión molecular	5-50
Mecánicos	Secado spray	1-50
	Extrusión	200-2000
	Lecho fluidizado	> 100

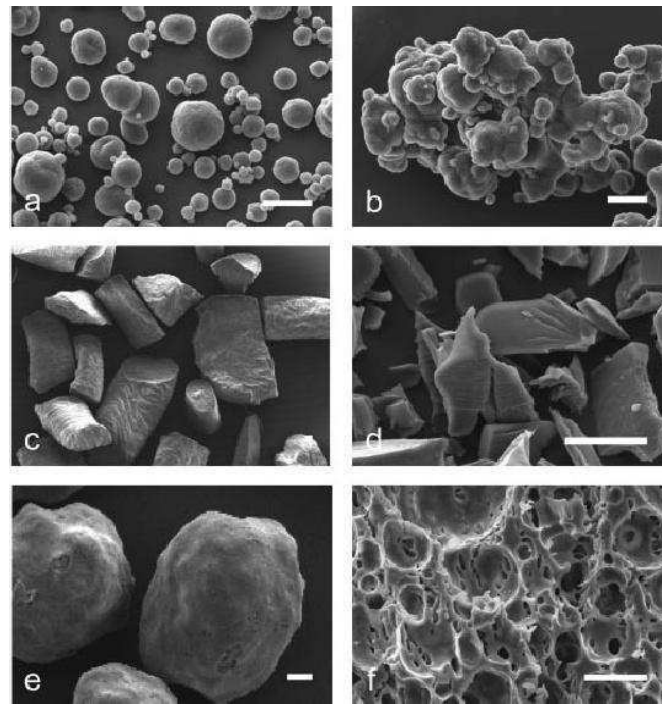


Figura 3. Morfología de los principales sistemas de encapsulación de aromas mediante la formación de vidrios. Secado spray (a), secado spray-aglomerado (b), extrudado (c), secado al vacío (d), lecho fluidizado (e), liofilizado (f). La barra representa 100 μm . Adaptado de Ubbink y Schoonman (2003).

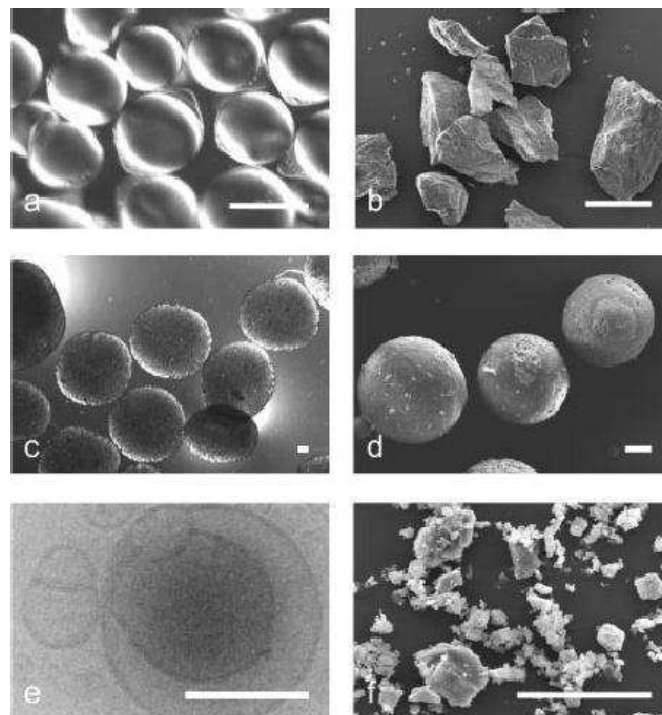


Figura 4. Morfología de los principales sistemas de encapsulación empleados para lograr liberación controlada de flavors. Coacervado (a), polímero extrudado (b), cápsula de alginato (c), atomización/enfriamiento (d), emulsión (e), complejos con ciclodextrinas (f). La barra representa 100 μm (en "e" corresponde a 100 nm). Adaptado de Ubbink y Schoonman (2003).

En la **Tabla 2** se muestran las aplicaciones de distintos métodos de encapsulación de aromas utilizados en la industria alimentaria. Los dos procesos industriales que más se usan son: el secado spray y la extrusión seguidos de las técnicas de inclusión molecular, coacervación y adsorción (Beristain y col., 1996; Goubet y col., 1998).

Tabla 2. Métodos de encapsulación de aromas empleados en la industria alimentaria. Adaptado de Madene y col., 2006.

Métodos	Productos obtenidos	Área de aplicación
Coacervación	Pasta/polvo/cápsula	Goma de mascar, alimentos horneados
Inclusión molecular	Polvo	Bebidas instantáneas, snacks
Secado spray	Polvo	Productos de confitería, leche en polvo, postres instantáneos, aromas, bebidas instantáneas
Extrusión	Polvo/granulado	Bebidas instantáneas
Lecho fluidizado	Polvo/granulado	Productos de confitería
Liofilización	Polvo	Sopas instantáneas, café, postres, etc.

A continuación se describen brevemente los diferentes métodos de encapsulación de mayor aplicación en alimentos:

1.2.1.1 Secado spray

Este método es capaz de transformar una disolución, emulsión, suspensión o dispersión líquida en un producto totalmente seco y estable. En la industria de alimentos se emplea en lácteos y sucedáneos de la leche, cereales, almidones, carbohidratos, café instantáneo, aromas, y en la industria farmacéutica se lo utiliza para obtener suero humano estéril, extracto de hígado, enzimas, etc.

En general el proceso consiste en la dispersión de la sustancia que se desea encapsular en un material de soporte o de pared (carrier), esta mezcla (que puede ser una emulsión, suspensión o dispersión) se atomiza en millones de gotas individuales por una boquilla o una rueda giratoria en una cámara de secado. Las microcápsulas resultantes se transportan a un separador ciclón para su recuperación (Dziezak, 1988; Watanabe y col., 2002). En la **Figura 5** se presenta el diagrama de proceso de secado spray.

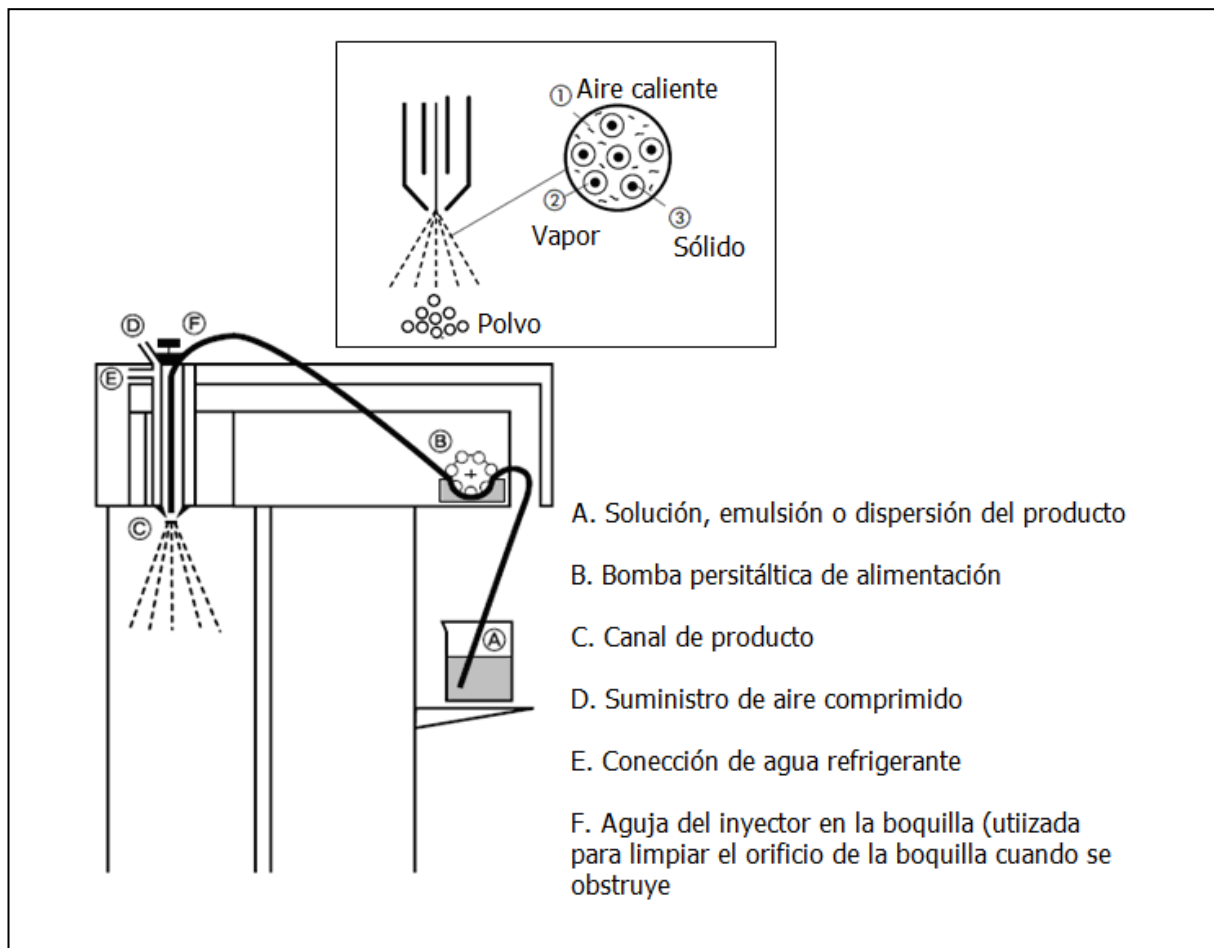


Figura 5. Diagrama de flujo del producto y la boquilla en un equipo de secado spray. Adaptado de Rosemary Hoegger; BÜCHI Labor Technik AG1997, 1998.

Una solución acuosa del producto (A) se rocía en forma de finas gotas (C) en el secador. El disolvente que rodea al producto se evapora de inmediato generando una

nube de vapor que protege al producto de las influencias térmicas. Poco después el disolvente en la superficie, así como en el interior se evapora, originando los poros correspondientes. El producto final es un material fino, amorfo. El secado de una solución altamente concentrada proporciona un producto final más poroso que el proveniente del secado de una solución con un menor contenido de sólido.

El secado spray es un proceso comercial ampliamente utilizado en la producción de aromas encapsulados y sustancias volátiles a gran escala (Deis, 1997).

En la **Figura 6** se presenta el diagrama de proceso de microencapsulación de un aceite por el método de secado spray. El procedimiento es el siguiente: se obtiene una emulsión a partir del producto líquido a encapsular (aceite), una sustancia carrier como la maltodextrina y una solución de goma arábica en agua. Esta emulsión se homogeniza en pequeñas gotas y se pulveriza. El solvente se evapora mientras se construye una capa seca en la superficie quedando el disolvente atrapado en el espacio interior de la gota creando una burbuja de vapor. A medida que el proceso de secado continúa, la presión en las burbujas aumenta hasta que la gota experimenta una explosión, creando una pequeña abertura. Como resultado las gotitas del aceite quedan incluidas en la matriz. Este procedimiento protege al aceite de las influencias ambientales, como la oxidación o la pérdida de aroma y también convierte al producto líquido en un "sólido estable".

La retención de los volátiles durante la encapsulación por secado spray depende de las propiedades fisicoquímicas del carrier y de los volátiles, del contenido de sólidos, la temperatura de procesamiento y también de la naturaleza y el rendimiento del encapsulado. Además es importante la capacidad de estabilizar la

emulsión logrando una baja viscosidad a una concentración elevada (Goubet y col., 1998; Teixeira y col., 2004).

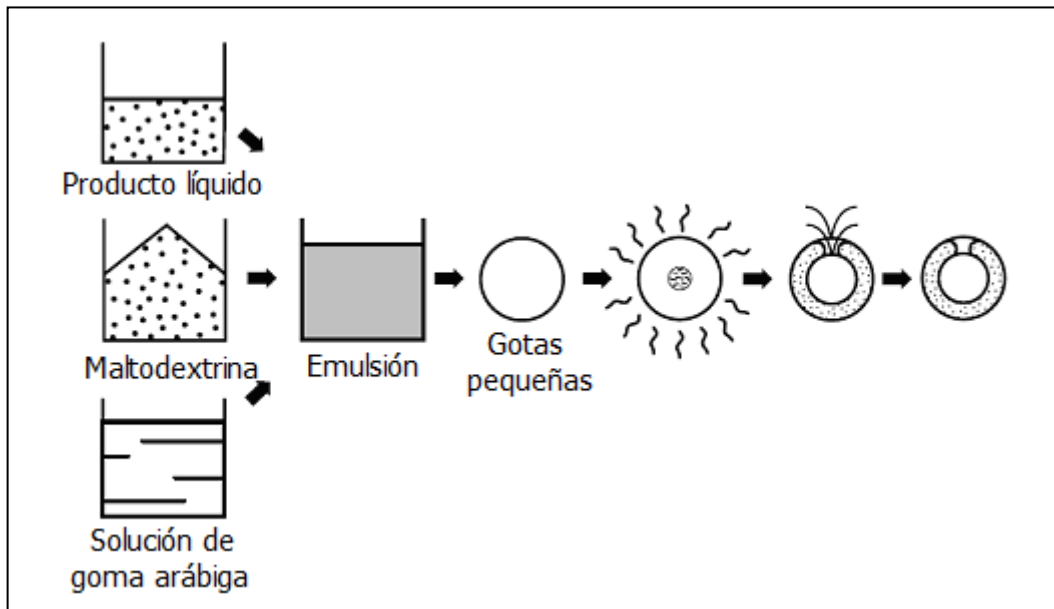


Figura 6. Diagrama del proceso de microencapsulación. Adaptado de Rosemary Hoegger; BÜCHI Laborotechnik AG 1997, 1998.

Este proceso posee como ventajas: la disponibilidad de equipos, los bajos costos del proceso, la gran variedad de carriers sólidos, la buena retención de los volátiles, la buena estabilidad del producto terminado, y la producción en gran escala del modo continuo (Reineccius, 1989 ;Teixeira y col., 2004).

1.2.1.2 Extrusión

El proceso de extrusión de alimentos consiste en forzar una mezcla alimenticia (bajo condiciones de calentamiento y cizalla) a través de una matriz diseñada para formar y/o fragmentar los productos. Las extrusoras de alimentos son dispositivos que operan a altas temperaturas (180-190 °C) durante un corto tiempo (20-40 segundos), transformando una gran variedad de materias primas en productos

intermedios y terminados (Riaz, 2006). En la industria de alimentos se emplea en bebidas, pastelería, gelatinas, postres, aromas, cereales, snacks, etc.

La microencapsulación de aromas por extrusión (**Figura 7**) es el segundo proceso más utilizado después del secado spray (Yáñez Fernández y col., 2005). Este proceso descrito por Risch (1988) se inicia formando una solución de la matriz seleccionada compuesta por hidratos de carbono. Esta solución se calienta y a continuación se dispersa el aroma a encapsular agitando a gran velocidad. Inmediatamente esta mezcla se fuerza a pasar a través de una placa conteniendo numerosas perforaciones ubicada dentro de un baño de isopropanol frío donde solidifica en una estructura amorfa en forma de varilla que luego se parte en trozos pequeños que se secan bajo vacío y se envasan. El producto obtenido es muy estable al deterioro por oxidación.

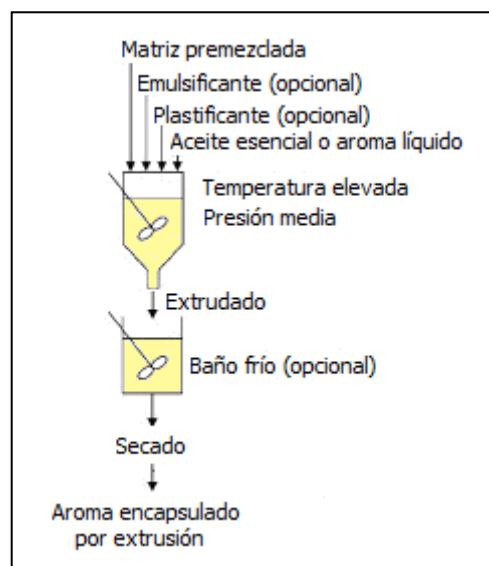


Figura 7. Esquema de encapsulación de aromas por extrusión.

Los avances en tecnología de procesamiento de productos mediante extrusión ofrecen las ventajas de obtener varias formas, texturas, color, sabor de los productos

terminados. Además, se obtienen productos de buena calidad que contienen ingredientes sensibles al calor ya que la cocción se realiza en un tiempo muy corto. Es un proceso eficiente y de bajo costo en comparación con otros procesos. Actualmente, la mayoría de de las extrusoras están automatizadas, lo que permite aumentar la productividad (Riaz, 2006).

1.2.1.3 Recubrimiento en lecho fluidizado

Esta técnica consiste en suspender partículas de material activo dentro de una cámara con temperatura y humedad controlada, donde se atomiza el material de pared. Algunos alimentos fortificados y mezclas nutricionales contienen ingredientes encapsulados por lecho fluidizado; algunos ejemplos son: ácidos cítrico, láctico y sórbico; bicarbonato de sodio utilizado en productos de panificación (Yáñez Fernández y col., 2005).

Este procedimiento la microencapsulación mostrado en la **Figura 8** se produce al suspender las pequeñas partículas que forman el material activo en un lecho de aire, u otro gas, al mismo tiempo que se dispersa sobre ellas, en forma de fina lluvia, una disolución del material de recubrimiento. La película se forma por evaporación del disolvente el cual a su vez, es separado por el aire o el gas que abandona el sistema. El equipo consiste en una columna vertical, estrecha en la parte inferior y más ancha en la superior. La microencapsulación se realiza introduciendo una corriente de aire desde el fondo; la velocidad del aire en la parte más estrecha de la columna es considerable, de tal manera, que las partículas que van entrando en esta zona, son de inmediato levantadas hacia la parte superior. En la parte más ancha de la columna, la velocidad del aire disminuye notablemente haciendo que el aire no sea

capaz de sostener las partículas en suspensión, provocando la caída de éstas hacia la zona central o región de trabajo. La velocidad de la corriente de aire en la zona de trabajo puede ser regulada mediante toberas colocadas a una cierta altura (Hellman, 2000).

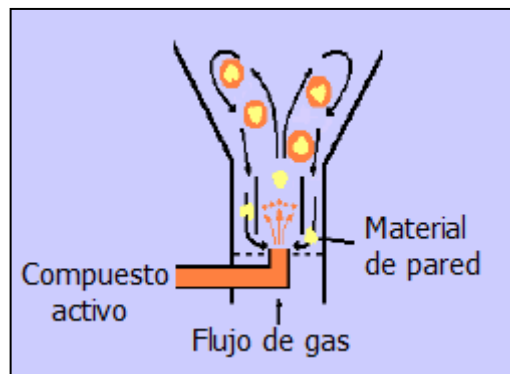


Figura 8. Recubrimiento en lecho fluidizado

1.2.1.4 Liofilización

La Liofilización es un proceso de secado en el que se elimina el agua por congelación del producto húmedo y posterior sublimación del hielo en condiciones de vacío. Se utiliza frecuentemente con el fin de reducir pérdidas de componentes volátiles o termosensibles. En la industria alimentaria la liofilización se emplea para obtener sopas instantáneas, café, postres, etc. También se usa en el área farmacéutica para mantener estable en el almacenamiento ciertos antibióticos, vacunas, sueros, vitaminas, fórmulas maternizadas, etc.

En el proceso de liofilización el material congelado se coloca en bandejas o recipientes. Se produce vacío en una cámara hermética para que comience la sublimación del hielo, el flujo de vapor pasa a través de la cámara al condensador. El

calor es suministrado a través de platos o placas calefactoras, por conducción o radiación.

El proceso de liofilización consta de dos etapas: 1) congelación y 2) secado. En la **Figura 9** se presentan las etapas del secado por liofilización en el tiempo y en un diagrama de fases del agua.

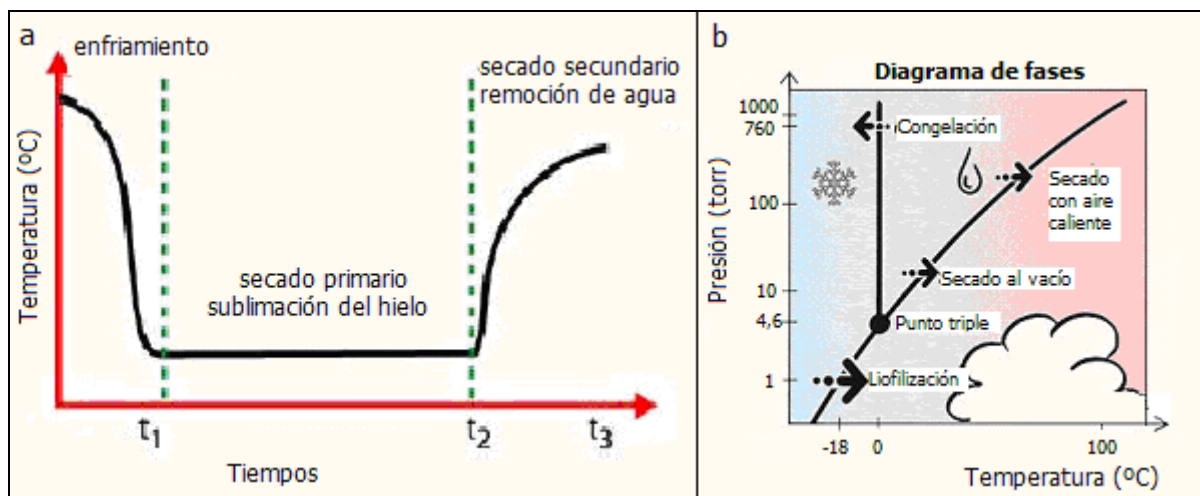


Figura 9. Evolución de la temperatura en el proceso de liofilización (a). Diagrama de fases del agua mostrando las etapas del proceso. Adaptado de Barbosa-Cánovas y Vega-Mercado (1996).

Congelación

Cada producto debe congelarse de manera tal que garantice que sufrirá pocas alteraciones en el proceso posterior de sublimación (Ibarz y Barbosa-Cánovas, 2005).

Secado

Cuando se realiza el secado mediante la liofilización se distinguen tres fases o etapas que se esquematizan en la **Figura 10** (Ibarz y Barbosa-Cánovas, 2005).



Figura 10. Fases de secado en el proceso de liofilización. Adaptado de Barbosa-Cánovas y Vega-Mercado (1996).

- Fase 1: llamada etapa conductiva. Inicialmente la velocidad de sublimación crece rápidamente hasta llegar a un máximo, debido al calentamiento de la muestra. El tiempo para agotar esta fase es relativamente corto; en ella se lleva a cabo la mayor parte de remoción de agua del producto (entre un 75-90 %), siendo el mecanismo preponderante la transferencia de calor por conducción.
- Fase 2: Primera etapa difusiva. Muestra un descenso importante de la velocidad de sublimación debido a la formación de una capa porosa de material seco que opone resistencia creciente al flujo de calor y al vapor a medida que procede el secado.
- Fase 3: Segunda etapa difusiva. La velocidad continúa decreciendo de forma que se aproxima a cero. Esto debido a que el calor necesario para retirar el agua ligada es muy alto. En esta etapa el agua se remueve por desorción. Puesto que la difusividad de los aromas disminuye sensiblemente cuando la humedad es pequeña, en esta etapa es posible incrementar la temperatura

de la calefacción y del producto hasta valores del orden de 50 °C, dependiendo del material que se trate.

La técnica de liofilización es uno de los procesos más útiles para el secado de sustancias termosensibles que son inestables en soluciones acuosas. El empleo de bajas temperaturas permite aumentar la estabilidad del producto y disminuir la pérdida de sustancias volátiles. El producto final liofilizado posee alta porosidad y una rápida y completa solubilización. Por último cabe destacar el empleo de vacío disminuye la oxidación.

1.2.1.5 Coacervación compleja

La coacervación compleja es el proceso de separación de fases que tiene lugar de forma espontánea cuando en un medio acuoso se mezclan dos o más coloides que presentan carga opuesta (policación y polianión), como consecuencia de la atracción electrostática que sufren. En los procedimientos de microencapsulación por coacervación compleja se utilizan generalmente combinaciones de una proteína y un polisacárido, en general gelatina y goma arábiga respectivamente. La gelatina es una proteína anfotérica que deriva del colágeno y resulta muy adecuada para la coacervación debido a que su especial configuración facilita la oclusión de una considerable cantidad de agua. La goma arábiga presenta carga negativa en todo el rango de pH. En consecuencia, a pH inferiores a su pI, la gelatina está cargada positivamente e interacciona con las moléculas de goma arábiga, con lo que se produce una neutralización de cargas y una desolvatación de la mezcla polimérica, que se separa en una fase líquida o coacervado complejo.

En el caso de la gelatina y la goma arábica se preparan dos disoluciones acuosas. A una de ellas se adiciona el producto que va a formar el material activo y sobre ésta se adiciona la otra disolución (**Figura 11**). La temperatura debe ser mayor que el punto de gelificación de la gelatina, se ajusta el pH y se mantiene una agitación continua en todo el proceso. El sistema se enfría, la capsula coacervada gelifica y se endurece añadiendo glutaraldehido. Finalmente las microcápsulas se lavan, se secan y recogen (Hellman, 2000).



Figura 11. Microencapsulación por coacervación compleja usando gelatina y goma arábica.

I.2.1.6 Complejos de inclusión

Los complejos de inclusión, también conocidos como encapsulación molecular, utilizan beta-ciclodextrinas para el atrapamiento de moléculas. Las ciclodextrinas poseen un centro hidrofóbico y la superficie exterior hidrofílica.

El principal mecanismo de las ciclodextrinas involucra la formación de complejos por inclusión de analitos: permiten un equilibrio dinámico en el cual el agua u otro compuesto, son reemplazados en la cavidad de la molécula de ciclodextrina (**Figura**

12). La estabilidad de estos complejos depende de la estructura, la hidrofobicidad de la molécula, el pH, el disolvente orgánico, la temperatura y la concentración de ciclodextrina. Los complejos de inclusión obtenidos son sólidos cristalinos y pueden adicionarse a alimentos secos con un mínimo de degradación o pérdida del compuesto huésped durante el almacenamiento. Las ciclodextrinas protegen el aroma, sabor y otros ingredientes sensibles al calor que se adicionan a los alimentos extrudidos. Los aromas de ajo, cebolla y las vitaminas A, E y K son acomplejados por las ciclodextrinas (Yáñez Fernández y col., 2005).

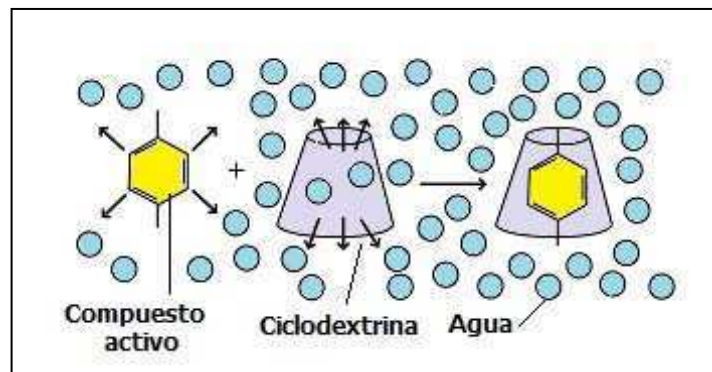


Figura 12. Representación esquemática de la formación de un complejo de inclusión.

1.2.1.7 Atrapamiento en liposomas

Los liposomas son vesículas que se forman cuando se dispersan fosfolípidos en un medio acuoso. Estructuralmente existen tres tipos de liposomas: multilamelares, vesículas de un compartimiento y macrovesículas. La sonicación permite la formación de vesículas de un solo compartimiento, mientras que las macrovesículas se forman por inyección de soluciones de lípido en soluciones tampón. Los liposomas pueden tener cargas positivas por la adición de aminas o cargas negativas por la adición de fosfatidil serina o diacetil fosfato. Los liposomas pueden atrapar materiales hidrofílicos e hidrofóbicos. Los compuestos hidrofílicos se disuelven en agua y se

mezclan con una película lipídica para formar liposomas, mientras que los materiales hidrofóbicos son embebidos en una delgada película de lípido (**Figura 13**). La liberación del principio activo se realiza por difusión a través de la bicapa, por destrucción de la vesícula, por medio de una concentración crítica de iones calcio o por un cambio de pH. Los liposomas presentan un tipo de cápsula con propiedades más versátiles y de menor fragilidad que aquellas hechas de grasa. La permeabilidad, estabilidad, actividad superficial y afinidad pueden variar con el tamaño y la composición del lípido. El colesterol y los tocoferoles pueden incorporarse para reducir la permeabilidad de la membrana e incrementar la estabilidad de los lípidos en la bicapa. Las sustancias activas solubles en agua presentan una mejor eficiencia de encapsulación que las hidrófobas. Los liposomas se usan con éxito en la encapsulación de sistemas enzimáticos (Schrooyen y col., 2001; Yañez Fernández y col., 2005).

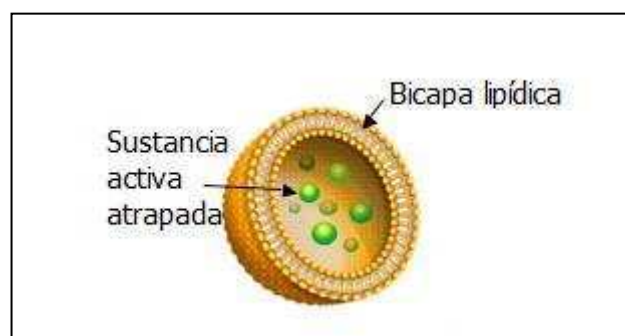


Figura 13. Atrapamiento en liposomas.

I.2.2 Materiales "carrier" para encapsulación

Existe una amplia variedad de materiales que pueden ser usados para encapsular compuestos aromáticos. Las microcápsulas más simples constan de un núcleo que puede estar rodeado por una pared de espesor uniforme o no uniforme,

compuesta de sólo uno o varios tipos de ingredientes tales como proteínas, carbohidratos, lípidos, celulosa, etc., (Brazel, 1999).

En el caso de realizar emulsiones, el material carrier empleado en la encapsulación de aromas no debe reaccionar con el material del núcleo, debe presentar baja viscosidad a altas concentraciones y debe asegurar una buena estabilización de la emulsión (Trubiano y Lacourse, 1988; Shahidi y Han, 1993).

De acuerdo al carrier empleado, los compuestos encapsulados presentarán diversas formas (películas, esferas, partículas irregulares), distintas estructuras (porosas o compactas) y diversas características físicas (sólido amorfo o cristalino) que tendrán influencia sobre la difusión de aromas, sustancias externas (oxígeno, disolventes), así como también en la estabilidad del producto durante el almacenamiento (Madene y col., 2006).

En la **Tabla 3** se presentan las características de los materiales utilizados con mayor frecuencia en la encapsulación de aromas y a continuación se detallan los carriers utilizados en la encapsulación de aromas del presente trabajo.

Tabla 3. Carriers utilizados en la encapsulación de aromas.

Carrier	Función
Maltodextrina (DE < 20)	Formadora de película
Almidón modificado	Muy buen emulsionante
Goma arábica	Emulsionante, formadora de película
Celulosa modificada	Formadora de película
Gelatina	Emulsionante, formadora de película
Ciclodextrinas	Emulsionante, encapsula
Lecitina	Emulsionante
Proteínas del suero de leche	Buen emulsionante
Aceites hidrogenados	Barrera del agua y el oxígeno

I.2.2.1 Maltodextrinas

Las dextrinas se forman por calentamiento del almidón, en presencia de ácido o base, o por vía enzimática formando polímeros de glucosa con alto grado de ramificación. Los polímeros de glucosa producidos pueden variar en longitud y en peso molecular. Comparadas con almidones no modificados, tienen mejores características de solubilidad y viscosidad. Sus viscosidades son inferiores a las de la goma arábica y no presentan grupos lipofílicos, por lo que sus propiedades emulsificantes son pobres (Kenyon y Anderson, 1988; Shahidi y Han, 1993). Sus ventajas incluyen sabor tenue, es posible su uso a altas concentraciones de sólidos y mejoran la vida de almacenamiento de aceites esenciales de cítricos (Madene, 2006).

I.2.2.2 Almidones modificados

Los almidones modificados son muy útiles como ingredientes alimentarios y se encuentran en abundancia en el mercado. Presentan características funcionales deseables, tales como solubilidad, textura, adherencia, dispersión, afinidad por los aceites esenciales hidrofóbicos y tolerancia al calor (Kim y col., 1999).

Las modificaciones que se realizan a los almidones modificados pueden ser químicas o físicas. Las químicas comprenden hidrólisis ácida, entrecruzamiento, sustitución o estabilización y conversión (Thomas y Atwell, 1999b). Las modificaciones físicas producen almidones pregelatinizados, obtenidos por calentamiento con control de la humedad, capaces de adsorber agua fría.

El procedimiento de modificación empleado en la práctica, consiste en secar suspensiones acuosas de almidón conteniendo 30 - 40 % sólidos. Los grupos hidroxilos del almidón se pueden sustituir o pueden reaccionar con varios grupos

funcionales. Las principales reacciones involucradas son esterificación y eterificación. Los principales sustituyentes son: acetato de hidroxipropil y n-octenilsuccinato. Generalmente los almidones modificados se preparan mediante combinaciones de dos, tres y en ocasiones cuatro procesos.

Cualquier almidón puede ser modificado, sin embargo las modificaciones más significativas en la práctica son las que se le realizan a los almidones de maíz y papa (Ayala y Montes, 2004).

En la **Tabla 4** se presentan las características principales de algunos almidones modificados recomendados para utilizarse como agentes encapsulantes, se resalta la importancia que están adquiriendo estos almidones y el impacto que tienen sobre el producto final.

Tabla 4. Almidones modificados empleados en la encapsulación de productos alimenticios. Características, funciones y beneficios. Adaptada de Aguilar Chávez, 2007.

Almidón modificado	Dosis	Características y funciones	Beneficios
CAPSUL	30 - 40% sólidos	Poseen baja viscosidad. Recomendados en un 20% para encapsular aceites críticos y saborizantes.	Alto contenido de sólidos facilita el secado. Buena estabilidad de emulsiones. Alta retención del aceite.
NEDEX 722	20 - 35% sólidos		
N – LOK	30 - 40% sólidos	Soluble en agua fría. Baja viscosidad. Recomendado en un 40% para aceite volátil.	Retiene excelentemente los aceites. Preserva el sabor. Estable en el secado spray.
SERIE HI - CAP	30 - 40% sólidos	Soluble en agua fría. Baja viscosidad. Recomendado en un 40% para aceite volátil.	Retiene excelentemente los aceites. Preserva el sabor. Estable en el secado spray.
ENCAPSUL 855 SERIE CRISTALTEX	20 - 40% sólidos	Baja viscosidad. Buen vehículo para sabores y especias. Emulsificante.	Buena retención del aceite. Reduce costos de producción y envasado.
HYLON VII	10 - 40% sólidos	Alto contenido de amilosa que brinda plasticidad y formación de película.	Alto potencial de encapsulación.

I.2.2.3 Sacarosa

La sacarosa (β -D-fructofuranosil- α -D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor formado por glucosa y fructosa. La sacarosa se usa en los alimentos por su poder endulzante, es el edulcorante más utilizado en el mundo industrializado.

Durante los proceso de encapsulación de aroma se pierden volátiles modificando el perfil sensorial del aroma una vez reconstituido (Beristain y col., 2002). Los disacáridos pueden encapsular ciertos volátiles importantes para el perfil aromático donde la maltodextrina no es efectiva. Por esta razón en la industria se utilizan mezclas de maltodextrinas y sacarosa. Estudios realizados en sistemas modelos deshidratados, mostraron que en general la sacarosa es efectiva para retener volátiles (Flink y Karel, 1970). La **Tabla 5** muestra que el orden de retención de volátiles en sistemas deshidratados fue: sacarosa > maltosa \geq lactosa > glucosa >> dextrina, para cinco compuestos volátiles. Sin embargo, la sacarosa actúa en detrimento de la estabilidad física del aroma encapsulado debido al su bajo valor de T_g y a su relativa reactividad química (Levi y Karel, 1995; Chirife y Karel, 1973).

Tabla 5. Retención de volátiles en sistemas modelos deshidrtados. Adaptado de Flink y Karel (1970).

Volátiles orgánicos	Retención de volátiles*				
	Glucosa	Maltosa	Sacarosa	Lactosa	Dextrina
Acetona	0,99	2,01	2,30	1,83	0,03
Acetato de metilo	0,67	2,29	2,51	2,20	0,04
2-propanol	2,11	2,71	3,02	2,71	0,30
n-butanol	1,26	2,27	2,83	2,50	0,70
tert-butanol	1,93	3,10	3,27	3,10	2,96

* Todos los sistemas tienen la composición inicial (% en peso): solutos no volátiles: 18,1; volátiles orgánicos: 0,75; agua: 80,45.

I.2.2.4 Trehalosa

Origen, estructura y propiedades

La trehalosa es un disacárido de glucosa (α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranósido) no reductor (**Figura 14**).

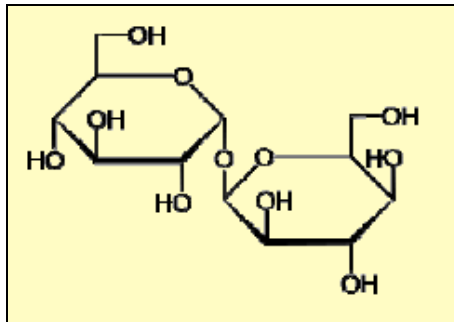


Figura 14. Molécula de trehalosa.

En la **Tabla 6**, se presentan las propiedades físicas de la trehalosa en comparación con las de sacarosa (disacárido de peso molecular idéntico), con el objeto de resaltar las propiedades principales que diferencian a estos azúcares (Ohtake y Wang, 2011).

En la naturaleza la trehalosa se puede encontrar en hongos y levaduras. Por ejemplo, las esporas y macroquistes del *Dictyostelium mucoroides* pueden contener hasta un 7% de trehalosa en base seca (Clegg y Filosa, 1961). También se la puede encontrar en levadura cervecera y de panadería, variando su concentración en relación a la edad de las células (Elbein y col., 2003). Está presente en diferentes bacterias de las familias *Streptomyces*, *Mycobacterias*, *Corynobacterias*, y en *Escherichia coli*, *Rhizobium sp.* y *Sulfdolobus acidocaldarius* (Kaasen y col., 1994). Además se la encuentra en el reino animal, en la hemolinfa de ciertos insectos y larvas. Sus funciones en la naturaleza son amplias: como fuente de energía, como

componente estructural; pero lo que más llama la atención de los investigadores es su capacidad para estabilizar proteínas, enzimas y membranas celulares tanto en la deshidratación como en la congelación (Crowe y col., 1983; Crowe y col., 1984). El mecanismo por el cual la trehalosa cumple esta función estaría estrechamente relacionado con su estructura química.

Tabla 6. Comparación de las propiedades de trehalosa y sacarosa. Adaptada de Ohtake y Wang, 2011.

Propiedades	Trehalosa	Sacarosa	Referencias
Solubilidad (g/100 g H ₂ O, a 20 °C)	40,6–68,9	200	Miller y col., 1997; Kubota, 2005.
Temperatura de fusión	210–215	188	Birch, 1963; Kubota, 2005.
Temperatura de transición vítrea (T _g , °C)	110-120	65-75	Saleki-Gerhardt y Zografi, 1994; Crowe y col., 1996; Sussich y col., 1998.
Viscosidad relativa	1,85	1,30	Takeuchi y Banno, 1998; Sola-Penna y Meyer-Fernandes, 1998.
Coefficiente de difusión (cm ² /s)	1,91 × 10 ⁻⁸	5,89 × 10 ⁻⁸	Ekdawi-Sever y col., 2003.
Densidad (g/cm ³ , a 25 °C y 85 °C)	1,58 y 1,41	1,59 y 1,37	Conrad y de Pablo, 1999; Ekdawi-Sever y col., 2001.
Estabilidad en pH extremo (% remanente)	>99%	0% a pH 3-4	Takeuchi y Banno, 1998; Kubota, 2005.
Poder endulzante respecto de la sacarosa	45%	100%	Kubota, 2005.

La unión de los monómeros de la trehalosa es más flexible que la de la sacarosa y la maltosa pudiendo formar uniones con grupos polares de macromoléculas como fosfolípidos, permitiendo una mejor interacción (Villareal y col., 2004). Esta propiedad es muy importante tanto durante la desecación como en la congelación de biomembranas, ya que la trehalosa formaría fuertes uniones con los grupos polares reemplazando al agua, impidiendo la agregación de las moléculas de la membrana (Crowe y Crowe, 1992). Por otra parte, la eficiencia para preservar membranas

biológicas durante la congelación parecería estar relacionada con la capacidad que tiene el azúcar de "acomodarse" a la red de uniones tetraédricas del agua reduciendo la cantidad disponible para ser congelada (Patist y Zoerb, 2005).

Proceso de obtención

La producción de trehalosa ha progresado a lo largo de los años a través del desarrollo de nuevas técnicas para su síntesis.

Inicialmente se obtuvo a través de un proceso de extracción a partir de un cultivo de levadura, pero dado que los costos de producción eran exorbitantes, su uso se limitó sólo a ciertos cosméticos y productos químicos. En 1994, Hayashibara, un fabricante de almidón azucarado en la prefectura de Okayama, Japón, descubrió un método de producción masiva de trehalosa a partir de almidón que era de bajo costo. Al año siguiente, Hayashibara comenzó a fabricar trehalosa mediante la activación de dos enzimas, la enzima productora glucosiltrehalosa que cambia el extremo reductor de almidón en una estructura de trehalosa, y la enzima liberadora de trehalosa que separa esta estructura de trehalosa. Como resultado, una trehalosa de alta pureza a partir de almidón puede producirse en masa a un precio muy bajo (Higashiyama, 2002).

Aplicación y efecto como aditivo en la industria alimentaria

Japón fue el primer país en aprobarla para su uso en alimentos en 1996, y actualmente está presente en diversos productos alimenticios. En la actualidad se estima una producción de 25000-30000 toneladas por año (Richards y col., 2002; Kubota, 2005). Posteriormente fue aprobada como un ingrediente alimenticio en

Corea y Taiwán en 1998, sin límites de uso. Poco después, en el año 2000, recibió en Estados Unidos el status de aditivo GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro) y en el año 2001 la Food and Drug Administration (FDA) la aprobó como nuevo ingrediente alimentario y la introdujo en la Comunidad Europea Europa, desde entonces se utiliza cada vez más como aditivo multifuncional en alimentos (Ohtake y Wang, 2011).

La trehalosa está presente en más de 8.000 productos de consumo masivo como bebidas, vegetales y frutas procesadas, productos de panadería, pescados y mariscos procesados, productos alimenticios congelados y productos refrigerados (Richards y col., 2002). La popularidad de trehalosa puede ser debida a su menor dulzor y mayor persistencia en comparación con la sacarosa (Portmann y Birch, 1995).

La adición de trehalosa antes del secado de productos alimenticios frescos ayuda a protegerlos de la desnaturalización, y evita la pérdida de volátiles aromáticos que le confieren a estos productos su aroma y sabor característico (Colaco y Roser, 1995). Por ejemplo, purés de banana fresca, mango, fresa, manzana y frambuesa, secaron a 25-50 °C en presencia de trehalosa demostrando que no había cambios detectables en el color u otras propiedades durante el almacenamiento prolongado, pero los polvos secos no presentaron aroma. Sin embargo, después de la reconstitución, el color, la viscosidad y textura de los purés frescos se restauraron y unos minutos después de la rehidratación de los purés se advirtió el aroma único de la fruta fresca. La preservación de volátiles aromáticos se puede entender por la diferencia de hidrofiliidad entre la trehalosa vítrea y los componentes aromáticos; la trehalosa vítrea e hidrófilica no es miscible con compuestos aromáticos volátiles

hidrófobos tales como los ésteres (Roser, 1991; Colaco y Roser, 1995). Debido a esta incompatibilidad, los volátiles aromáticos quedan atrapados dentro del material vítreo y sólo se liberan después de la reconstitución. Contrariamente al material vítreo, estable, no permeable producido por la trehalosa, otros azúcares en estado vítreo cuando cristalizan se convierten en porosos y permeables a compuestos aromáticos volátiles, y por lo tanto, pierden el aroma de los productos frescos con el tiempo (Roser, 1991).

En relación a alimentos Whelan y col. (2008) investigaron como la T_g influye sobre la vida útil de helados de crema utilizando trehalosa en lugar de sacarosa como ingrediente, analizando la formación de cristales. En otro campo de aplicación dentro de la industria de alimentos, Busso Casati y col. (2007) estudiaron la estabilidad física de aromas encapsulados en una matriz con trehalosa en lugar de sacarosa, encontrando una mayor inhibición de los fenómenos de apelmazamiento y colapso. Komes y col. (2003, 2005) estudiaron la influencia de la adición de trehalosa sobre la retención de volátiles en purés industriales de damasco y de frutillas deshidratados por liofilización y por secado en espuma. Este estudio les permitió encontrar que el uso de trehalosa favorecía la retención de los volátiles característicos de la fruta.

I.3 Emulsiones

I.3.1 Emulsiones aceite-agua

La emulsión es un sistema de dos fases que consta de dos líquidos inmiscibles, uno de los cuales es dispersado en el otro en forma de gotas. La fase dispersa, discontinua o interna es el líquido desintegrado en gotas. El líquido circundante es la

fase continua o externa. En la mayoría de las emulsiones los dos líquidos involucrados son el agua y el aceite, aunque en raras ocasiones se encuentran puros. La fase acuosa puede consistir de soluciones de sales, azúcares, colorantes y materiales coloidales hidrofílicos. La fase oleosa puede consistir de mezclas de aceites esenciales, hidrocarburos, ceras, resinas y en general de materiales hidrofóbicos. Para formar una emulsión estable es necesario el incluir un tercer componente denominado agente emulsificante. Al mezclarse el aceite con el agua pueden formarse dos tipos de emulsiones: a) si el aceite se dispersa con el agua se tiene una emulsión de aceite-en-agua (O/W). Alternativamente si el agua es la fase dispersa se tiene una emulsión de agua-en-aceite (W/O) (**Figura 15**).

Las emulsiones tienden a exhibir la mayoría de las propiedades del líquido que forma la fase continua. Entre los factores que afectan el tipo de emulsión formada cuando se mezclan aceite y agua están:

- a) Las proporciones relativas de las fases.
- b) El tipo y concentración de los agentes emulsificantes
- c) El método de preparación de la emulsión.

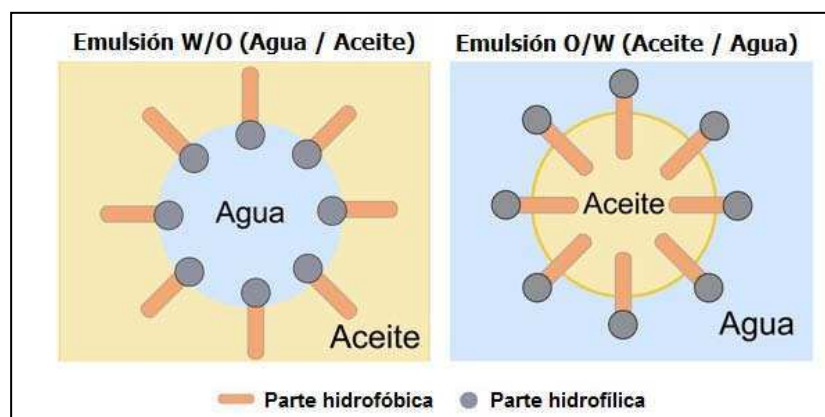


Figura 15. Tipos de emulsiones.

A pesar de ser los coloides más importantes en la vida diaria y de encontrarse en numerosas aplicaciones, las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables debido al contacto desfavorable entre las gotas de aceite y la fase acuosa. Esto se debe a que el aceite y la fase acuosa tienen densidades diferentes, y por lo tanto van a separarse en fases con el transcurso del tiempo (Moreau y col., 2003).

Un desafío al formular emulsiones es lograr que posean estabilidad física durante el tiempo de interés. Los requerimientos para que una emulsión sea estable en el tiempo deseado son que no haya cambios en la distribución de tamaños de las gotas o en su estado de agregación (Karlberg y col., 2005). Esto se puede obtener por un control adecuado de los procesos de desestabilización como el cremado, la floculación y la coalescencia. Muchas veces, estos procesos se presentan simultáneamente y se pueden retardar mediante un aumento en la barrera de energía que hace que las gotas se acerquen e interactúen. Existen dos formas de lograr un aumento en la energía: 1) por repulsión electrostática mediante la creación de una capa cargada (surfactantes iónicos), y 2) por repulsión estérica debido a la adsorción de surfactantes no iónicos o polímeros. El proceso de floculación también se puede prevenir si se aumenta la viscosidad de la fase continua ya que se reduce la velocidad de acercamiento de las gotas.

En una emulsión, los agentes emulsificantes promueven la formación de la emulsión y la estabilidad en el corto tiempo mediante su adsorción y acción en la interfase. Los estabilizantes, en cambio, brindan a la emulsión estabilidad a largo plazo.

En una emulsión alimentaria, los almidones modificados tienen un rol principal como emulsificantes y los polisacáridos se emplean principalmente como

estabilizantes pero existen algunos polisacáridos que actúan también como agentes emulsificantes (Karlberg y col., 2005).

I.3.1.1 Mecanismos físicos de desestabilización de emulsiones

Desde el momento en que se forma una emulsión, inmediatamente después de la homogeneización (y a veces durante), comienza el proceso de desestabilización, el cual tiende a disminuir el área interfacial y llegar al estado termodinámico más estable, las fases separadas. Existen distintos mecanismos que contribuyen simultánea y sinérgicamente a la desestabilización y son la consecuencia de distintos fenómenos físicos, los cuales se relacionan con la diferencia de densidad de las fases continua y dispersa, las interacciones coloidales entre las gotas y la estructura y viscoelasticidad del film interfacial (McClements, 1999).

En el caso particular de las emulsiones alimenticias, los cambios producidos por la desestabilización deben controlarse para que las características de la emulsión se mantengan dentro de un rango de valores estrechos, fuera del cual ya no sería posible su utilización o comercialización (Wagner, 2000).

El cremado y la sedimentación se conocen conjuntamente como fenómenos de separación gravitacional. El cremado describe el movimiento ascendente de las gotas debido a la menor densidad de la fase dispersa respecto a la de la fase continua, mientras que la sedimentación describe el movimiento de las gotas en sentido contrario, precisamente también por un efecto de diferencia de densidad. En general (aunque no de manera exclusiva) el cremado es más común en emulsiones o/w y la sedimentación, en emulsiones w/o. Durante el proceso de cremado se forma una

fase inferior o suero, la cual está empobrecida en gotas y una fase superior enriquecida en gotas, la fase crema (**Figura 16**).

La floculación y la coalescencia son mecanismos de desestabilización que surgen como consecuencia de un fenómeno de agregación entre las gotas. En el primer caso, las gotas mantienen su integridad individual, mientras que en la coalescencia el proceso de agregación entre dos gotas culmina con la formación de una gota de mayor tamaño y por lo tanto implica la ruptura de la película interfacial. Si la coalescencia se da en mayor extensión, puede conducir eventualmente a la formación de una capa de aceite libre en la parte superior de la emulsión (Friberg, 1997). Este fenómeno se conoce en inglés, como "oiling off" y culmina con la separación total de las fases constituyentes del sistema (**Figura 16**).

El transporte difusivo de la fase dispersa desde las gotas más pequeñas a las más grandes en una emulsión se denomina desproporción de Ostwald. El efecto es el crecimiento de las gotas más grandes a expensas de las más pequeñas. En la práctica, es muy difícil distinguir este proceso del de coalescencia. La presencia de sustancias hidrosolubles en la fase oleosa dispersa (alcoholes, ácidos grasos de cadena corta) puede inducir en las emulsiones un cierto grado de desproporción (Friberg, 1997; McClements, 1999).

Cuando una emulsión se almacena en condiciones estacionarias, con excepción de que se haya elegido un método de homogeneización ineficiente o un agente emulsificante inadecuado, la coalescencia es un mecanismo de desestabilización más lento que el cremado y la floculación (Britten y Giroux, 1991). Para que este proceso ocurra, las gotas deben estar lo suficientemente cercanas entre sí. Este hecho es

más probable que se dé en emulsiones que presentan un alto grado de floculación o cuando se ha formado la fase crema (Damodaran, 2005).

La inversión de fase es un proceso en el cual se produce un cambio desde una emulsión aceite en agua (o/w) a una emulsión agua en aceite (w/o) y viceversa. Este mecanismo de desestabilización es muy importante en la manufactura de algunos productos alimenticios, como la margarina y la manteca (Dickinson y Stainsby, 1982; McClements, 1999). La base de este fenómeno es muy compleja, y se cree que involucra aspectos fisicoquímicos de la floculación, coalescencia, coalescencia parcial (cuando las gotas son semicristalinas) y formación de emulsiones. Después de la inversión de fase, las propiedades de la emulsión pueden cambiar considerablemente.

Los mecanismos de desestabilización no ocurren de manera separada o aislada. Una emulsión puede desestabilizarse simultáneamente por distintos mecanismos, dependiendo de la viscosidad de la fase continua, el tipo de agente emulsificante empleado y su concentración inicial en la fase acuosa (u oleosa), la adición de componentes (sales, azúcares), el pH y la aplicación de distintos tratamientos, como trabajo mecánico, ciclos de temperatura y congelación.

Además de los mecanismos físicos descritos, las emulsiones también se pueden desestabilizar por mecanismos químicos como por ejemplo por procesos tales como la oxidación lipídica o alteración por crecimiento microbiano. Los cambios químicos en algunos componentes de la emulsión pueden favorecer la desestabilización de una emulsión por mecanismos físicos (McClements, 1999).

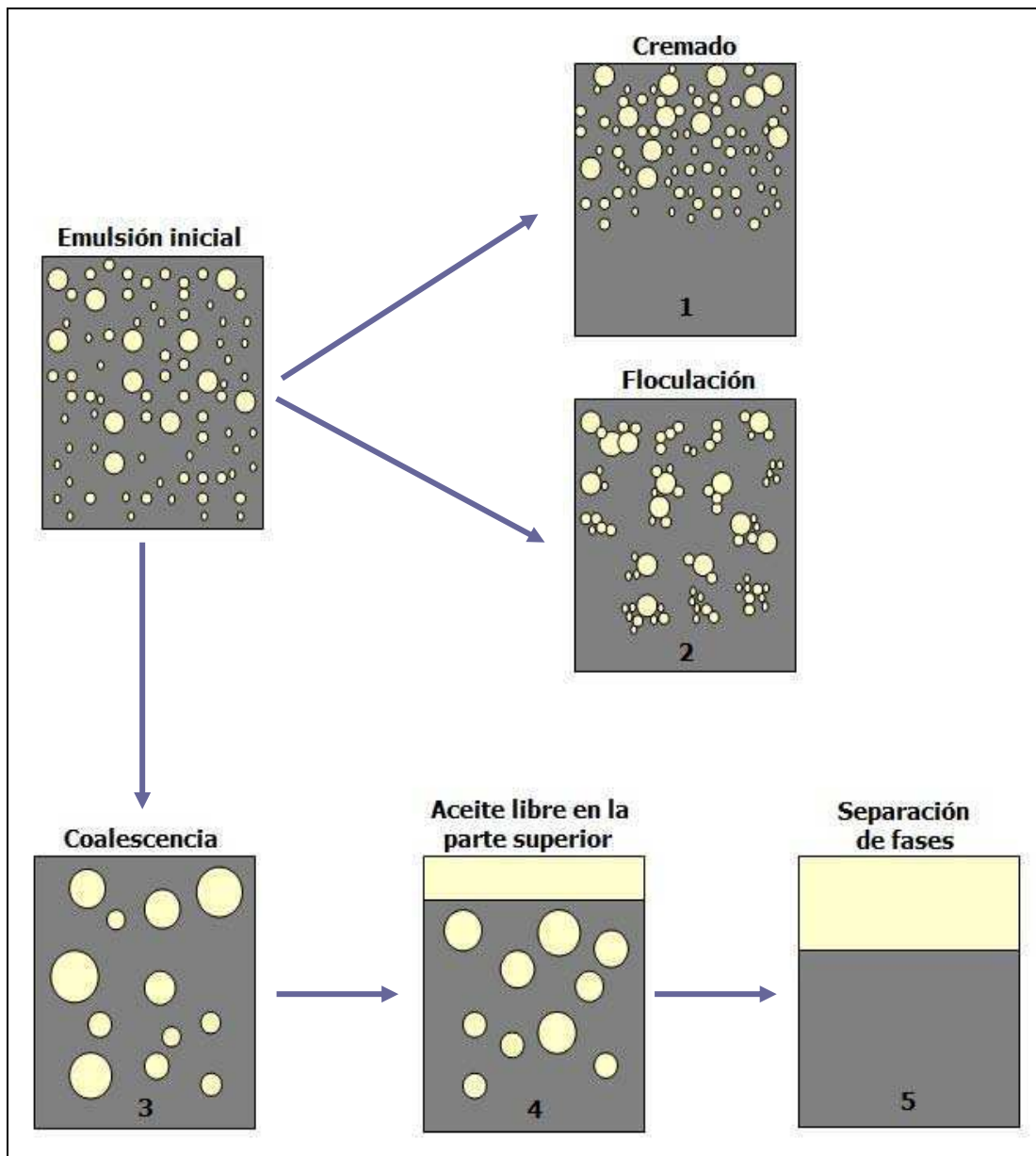


Figura 16. Mecanismos de desestabilización de una emulsión aceite en agua (o/w): Cremado (1); Floculación (2); Coalescencia (3). Si el proceso de coalescencia continúa en el tiempo, se forma una capa de aceite libre en la parte superior de la emulsión (4), que culmina con la separación total de fases (5). Adaptado de Palazolo, 2006.

1.3.2 Procesos de formación de emulsiones

1.3.2.1 Homogeneización primaria y secundaria

El proceso de convertir dos líquidos inmiscibles en una emulsión se denomina homogeneización. Para realizar una distinción según la naturaleza de los materiales de partida es conveniente clasificar a la homogeneización en dos categorías. La

creación de una emulsión a partir de dos fases líquidas separadas se denomina homogeneización primaria, mientras que el proceso de reducir el tamaño de las gotas en una emulsión ya existente se denomina homogeneización secundaria (**Figura 17**). La creación de un tipo particular de emulsión puede involucrar una homogeneización primaria, secundaria o una combinación de ambas (McClements, 1999).

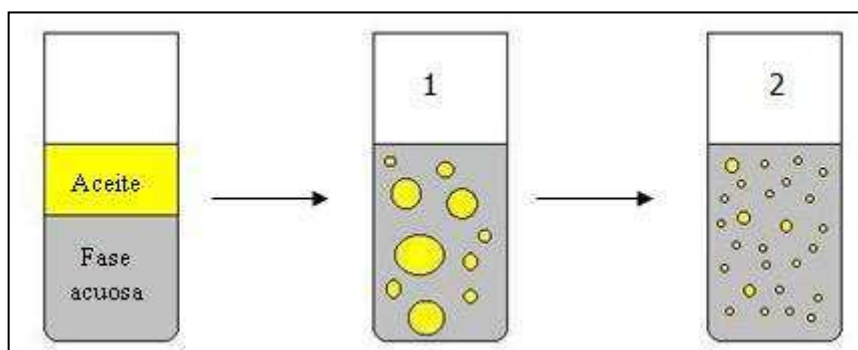


Figura 17. Representación esquemática del proceso de homogeneización para una emulsión aceite en agua mostrando la homogeneización primaria (1) y la homogeneización secundaria (2). Adaptado de Palazolo, 2006.

1.3.2.2 Procesos críticos durante la formación de emulsiones

La formación de gotas en una emulsión es un proceso que requiere energía, la cual es suministrada por el homogeneizador. Durante el proceso de homogeneización primaria, la interfase entre las dos fases líquidas inmiscibles se deforma en tal extensión, que comienzan a producirse gotas, en su mayoría, de tamaño muy grande. Estas gotas deben deformarse y romperse para formar gotas de menor tamaño, por fuerzas de ruptura. Las gotas de un líquido en otro que es inmiscible, tienden a adoptar una forma esférica para minimizar la energía libre interfacial. La fuerza responsable de la forma esférica está dada por la ecuación de Laplace:

$$\Delta P_L = \frac{4 \cdot \gamma}{D}$$

Ecuación 1

Donde:

□ P_L es la diferencia de presión entre el interior y el exterior de la gota

□ es la tensión interfacial

D es el diámetro de la gota.

Las fuerzas interfaciales ejercen una presión hacia el interior, que es mayor cuanto menor es el diámetro de las gotas y mayor la tensión interfacial. El agente emulsificante es necesario para la formación de la emulsión y para ello debe adsorberse en la interfase, disminuyendo la tensión interfacial, disminuyendo la presión de Laplace (**Ecuación 1**), lo cual facilita la deformación y en consecuencia, la ruptura en gotas de menor tamaño. Además, la formación del film interfacial evita la coalescencia de las gotas recién formadas.

El transporte de las moléculas del agente surfactante hacia la interfase durante el proceso de homogeneización no está determinada por difusión sino por convección (Walstra, 1983). Por lo tanto, es sumamente importante que el agente emulsificante recubra la interfase creada en una escala de tiempo similar a la del proceso de homogeneización. En caso de que la adsorción sea muy lenta en comparación con la capacidad del homogeneizador de generar área interfacial, se produce el proceso de coalescencia de las gotas recién formadas. Esto determina que el proceso de formación de la emulsión no sea eficiente (Ford y col., 1997).

I.3.2.3 Equipos de homogeneización

Existen muchos tipos diferentes de homogeneizadores para la producción de emulsiones alimentarias. La elección de un homogeneizador particular depende del volumen de emulsión que se desea preparar, la naturaleza de los materiales a emulsificar, el tamaño de gota deseado y el costo (McClements, 1999). La intensidad de agitación mecánica se atribuye a la densidad de energía en el líquido (ϵ), la cual es la cantidad de energía mecánica disipada por unidad de volumen y por unidad de tiempo (o la potencia por unidad de volumen). La cantidad total de energía mecánica suministrada debe ser extremadamente grande, debido a la oposición de la presión de Laplace (**Ecuación 1**) (Walstra, 1983; Ford y col., 1997). La mayoría de la energía suministrada actúa en un tiempo muy corto y localmente, disipándose como calor. Por tal motivo, la temperatura del sistema debe controlarse, especialmente en los dispositivos de alta ϵ .

La **Tabla 7** muestra los principales tipos de homogeneizadores utilizados a escala industrial y de laboratorio. Los homogeneizadores de baja (≈ 3000 r.p.m.) y de alta velocidad (hasta 25000 r.p.m.) son adecuados para producir emulsiones a partir de las fases líquidas separadas. Al tener baja densidad de energía producen emulsiones de tamaño de gota relativamente grande. Los homogeneizadores que tienen diseño rotor/estator de alta velocidad son más efectivos que los de diseño a cuchilla. Debido al número elevado de revoluciones del rotor, las fases líquidas a procesar se aspiran axialmente y se presiona a través de las ranuras del conjunto rotor/estator. El movimiento de alta velocidad a través de las ranuras produce el esfuerzo de corte responsable de la ruptura de las gotas.

Tabla 7. Principales dispositivos de homogeneización y sus características como la densidad de energía (A= alta, M= media y B= baja); el modo de operación (C= continuo, D= discontinuo o batch); el mecanismo de ruptura (L= flujo laminar, T= flujo turbulento y C= cavitación); el tamaño de gota (tamaño de gota máximo, en promedio) y la viscosidad de las muestra (B= baja, M= mediana o A= alta). Adaptado de Palazolo (2006).

Homogeneizador	Densidad de energía (□)	Modo de operación	Mecanismo de ruptura	Tamaño de gota (□m)	Viscosidad de muestra
Homogeneizadores de baja velocidad (sistemas cuchilla)	B	D	L, T	5	B - M
Homogeneizadores de alta velocidad (sistema cuchilla y rotor/estator)	B	D	L, T	2	B - M
Molino coloidal	I	C	L, T	1	M - A
Homogeneizador a válvula de alta presión	A	C	T, C	0,1	B - M
Homogeneizador ultrasónico	A	D	T, C	0,1	B - M
Homogeneizador de membrana	A	C	T	0,1	B - M

Los *molinos coloidales* son adecuados para la homogeneización de emulsiones de alta viscosidad y tienen un diseño rotor/estator al igual que los homogeneizadores de alta velocidad.

Los *homogeneizadores a válvula de alta presión* son sólo eficaces en reducir el tamaño de gota de una emulsión preexistente y por ende, realizan una homogeneización secundaria. A través de una bomba, la pre-emulsión es forzada a pasar a través de una válvula a presión elevada (entre 10 y 50 MPa).

En los *homogeneizadores de membrana*, la fase dispersa se hace pasar forzosamente a través de una membrana porosa de vidrio o cerámica. El pasaje forzado a través de los pequeños orificios de la membrana produce el esfuerzo de corte necesario mientras el agente emulsificante disperso en la fase acuosa se

adsorbe en la superficie de las gotas generadas. El tamaño de gotas producido depende de la rapidez con la que el agente emulsificante se adsorbe en la interfase. La principal característica de la homogeneización con membranas es la formación de emulsiones de distribución de tamaño monomodal.

En los *homogeneizadores ultrasónicos*, la fuente convierte el voltaje suministrado (energía eléctrica) en ondas ultrasónicas (hasta 20 kHz) que se transmiten al seno del líquido y producen millones de cavidades microscópicas. El colapso de estas cavidades genera ondas de choque que producen deformación y ruptura de las gotas. La temperatura dentro de las cavidades es extremadamente alta y la presión, superior a 500 atmósferas. Sin embargo los tiempos de vida media de las cavidades están en el orden de los microsegundos, con lo cual la energía liberada por cada cavidad es mínima. La alta densidad de energía de este dispositivo de homogeneización se atribuye al efecto acumulativo del gran número de cavidades generadas. Hay distintos diseños para uso de laboratorio (piezoeléctricos, puntas sonicadoras) e industrial (generación de campo ultrasónico por aguja vibrante) (McClements, 1999).

1.3.3 Evaluación de la eficiencia en la homogeneización

1.3.3.1 Métodos basados en la dispersión de luz

Muchas propiedades importantes de las emulsiones como la estabilidad a largo plazo, la apariencia y la textura están íntimamente ligadas al tamaño de las gotas que contienen. Por consiguiente es sumamente importante poder contar con métodos para medir este parámetro de manera sencilla y reproducible. Las técnicas basadas en la dispersión estática de luz se utilizan para determinar tamaños de

partícula de emulsiones comprendidos entre 0,1 y 1000 μm ; por lo tanto se aplican exhaustivamente a la caracterización de emulsiones alimentarias.

Cuando un haz de luz incide a través de la emulsión, el mismo es dispersado por las gotas en distintas direcciones. La intensidad con la que se produce este fenómeno está determinada principalmente por el tamaño de las gotas, la longitud de onda de la luz y la diferencia entre los índices de refracción de las fases dispersa y continua. La interacción de una onda electromagnética con una emulsión se caracteriza mediante un patrón de dispersión, el cual representa la dependencia angular de la intensidad de luz que emerge de la emulsión. A través de la aplicación de modelos matemáticos adecuados, este patrón de dispersión puede dar información sobre la fracción volumétrica de la fase dispersa y el tamaño de gota de las emulsiones.

La teoría de Mie fue desarrollada para interpretar patrones de dispersión de emulsiones diluidas que contienen partículas esféricas independientemente de su tamaño. Esta teoría asume que las ondas de luz son dispersadas por una partícula por única vez, de manera que puede aplicarse solo en emulsiones diluidas, cuando la concentración de gotas, ϕ , es menor a 0,05 %. En emulsiones más concentradas, el haz de luz dispersado por una gota interactúa inmediatamente con otra gota, de manera que el patrón de dispersión se altera. La teoría de la dispersión de luz múltiple se desarrolló para el análisis de patrones de dispersión de emulsiones concentradas.

La dispersión de la luz por parte de las emulsiones está estrictamente ligada con su apariencia. La intensidad de luz dispersada es mayor cuando la longitud de onda de la luz incidente está en el mismo orden que el tamaño de las gotas y cuando

la diferencia de índices de refracción entre las fases continua y dispersa es mínima (McClements, 1999).

I.3.3.2 Distribuciones de tamaño de partícula

Las emulsiones alimentarias son siempre polidispersas, es decir, el tamaño de todas las gotas varía dentro de un rango definido entre un valor mínimo y un valor máximo. Por lo tanto, para el análisis del tamaño de gota de las emulsiones alimentarias es conveniente referirse en términos de una distribución de tamaño de gota. Los datos se presentan como una frecuencia de tamaños en número, en superficie o en volumen. **Ecuaciones 2, 3 y 4** respectivamente.

$$f_n = n_i / N \quad \textbf{Ecuación 2}$$

$$f_s = a_i / A \quad \textbf{Ecuación 3}$$

$$f_v = v_i / V \quad \textbf{Ecuación 4}$$

donde, n_i , a_i y v_i son el número, área y volumen de las gotas del i -ésimo rango; N es el número total de gotas, A es el área total creada durante el proceso de homogeneización y V es el volumen total de las gotas en la emulsión.

La distribución de tamaño de gota también se puede representar como curvas continuas: la *función de distribución* $F(D_i)$ y la *función de distribución acumulativa* $C(D_i)$. La función de distribución en número se genera de manera tal que el área bajo la curva en el rango de dos diámetros D_i y $D_i + dD_i$ es igual al número de partículas en dicho rango, n_i , de manera tal que $n_i = F(D_i) \cdot dD_i$. A partir del mismo

razonamiento puede generarse las correspondientes funciones de distribución en superficie y en volumen.

Asumiendo que las emulsiones están formadas por gotas esféricas, las funciones de distribución en número, $F_n(D_i)$, superficie, $F_s(D_i)$ y volumen, $F_v(D_i)$ pueden relacionarse entre sí a partir de las siguientes expresiones:

$$F_v(D_i) = (1/6) \cdot \pi \cdot D_i^3 \cdot F_n(D_i) \quad \text{Ecuación 5}$$

$$F_s(D_i) = \pi \cdot D_i^2 \cdot F_n(D_i) \quad \text{Ecuación 6}$$

Las funciones de distribución son monomodales cuando presentan un único pico, bimodales cuando presentan dos picos principales o multimodales si hay más de dos picos.

La **Figura 18** muestra un ejemplo de distribuciones en número, superficie y volumen para una emulsión aceite en agua.

La utilización de modelos matemáticos para las funciones de distribución tiene la ventaja de describir un sistema complejo mediante un número pequeño de parámetros. Aunque en la mayoría de los casos no se puede aplicar un modelo matemático de manera satisfactoria, a partir de las funciones de distribución se pueden calcular distintos diámetros promedio (**Tablas 8 y 9**). La determinación de los diámetros promedio $D_{1,0}$, $D_{2,0}$ y $D_{3,0}$ requiere el conocimiento del número total de gotas. El conteo de gotas en una emulsión es un proceso extremadamente complejo, de manera que se utilizan los diámetros promedio de Sauter ($D_{3,2}$) y de De Brouker ($D_{4,3}$), cuyas fórmulas no contienen el número total de gotas (**Tabla 8**).

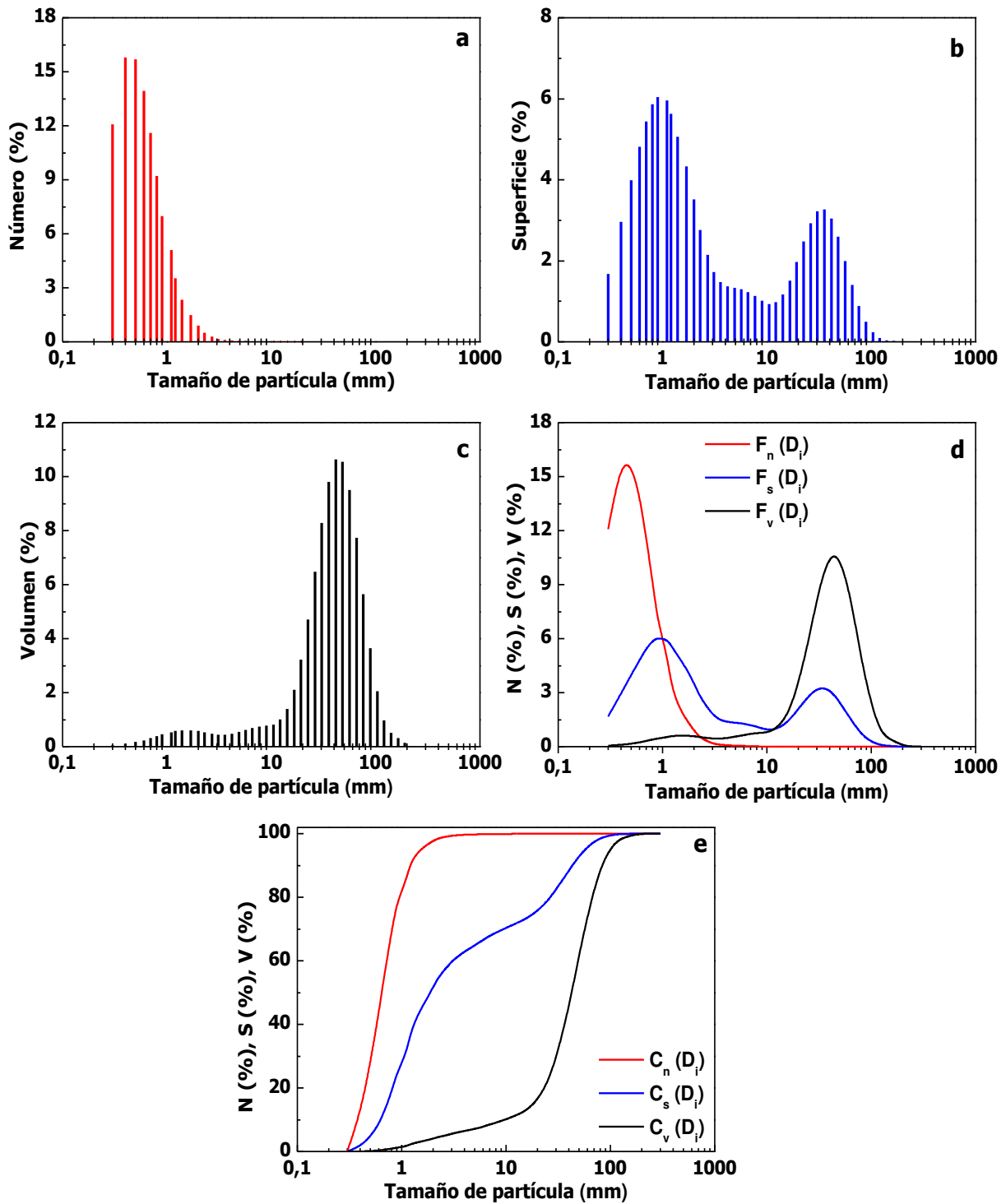


Figura 18. Distribuciones de tamaño de partícula para una emulsión multimodal: a), b) y c), distribuciones en número, superficie y volumen, expresadas como histograma; d) y e) las mismas distribuciones anteriores expresadas como una función de distribución continua o una función de distribución acumulativa. Adaptado de Palazolo (2006).

Tabla 8. Diferentes formas de expresar el diámetro promedio de las gotas en una emulsión polidispersa. Abreviaturas: N = número; S = superficie; V= volumen. Adaptado de Palazolo (2006).

Diámetros promedio	Notación	Tipo de distribución relacionada
Diámetro promedio en número	$D_{1,0}$	N
Diámetro promedio en superficie	$D_{2,0}$	S
Diámetro promedio en volumen	$D_{3,0}$	V
Diámetro promedio de Sauter	$D_{3,2}$	S
Diámetro promedio de De Brouker	$D_{4,3}$	V
Percentil 0,5 o 50 % (mediana)	$D_{x,0,5}$ (x = N, S, V)	N, S, V

Tabla 9. Definición matemática de los diámetros promedio más utilizados en emulsiones (Rawle, 2005).

$$D_{1,0} = \frac{\sum n_i \times D_i}{\sum n_i} = \frac{\sum n_i \times D_i}{N}$$

$$D_{2,0} = \frac{\sum n_i \times D_i^2}{\sum n_i} = \frac{\sum n_i \times D_i^2}{N}$$

$$D_{3,0} = \frac{\sum n_i \times D_i^3}{\sum n_i} = \frac{\sum n_i \times D_i^3}{N}$$

$$D_{3,2} = \frac{\sum n_i \times D_i^3}{\sum n_i \times D_i^2}$$

$$D_{4,3} = \frac{\sum n_i \times D_i^4}{\sum n_i \times D_i^3}$$

El diámetro promedio $D_{3,2}$ se puede relacionar con el área interfacial específica (AIE, en m^2/ml de emulsión) a partir de la siguiente expresión (Walstra, 1983):

$$AIE = 6 \cdot \phi / D_{3,2} \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde: ϕ es la fracción volumétrica.

La determinación del tamaño de gota debe hacerse en condiciones de alta dilución ($\phi < 0,05$) y con agitación, con el objeto de que las gotas se distribuyan de manera uniforme.

I.4 Sistemas deshidratados

I.4.1 Propiedades físicas de sistemas deshidratados

I.4.1.1 Actividad de agua e isothermas de sorción de agua

El contenido de agua de un alimento está íntimamente ligado con su estabilidad microbiológica. Sin embargo, se ha observado que diferentes tipos de alimentos con el mismo contenido de agua pueden tener estabilidad diferente. Esto se debe a que el agua se encuentra asociada con distinta intensidad a los componentes no acuosos y cuando está implicada en asociaciones fuertes no puede ser utilizada por microorganismos. Por esta razón se utiliza más comúnmente el concepto de actividad de agua (a_w), en lugar de contenido acuoso, para predecir la estabilidad microbiológica de un alimento (Fennema, 2000).

El concepto de actividad de agua procede de las leyes termodinámicas de Lewis, y se define como:

$$a_w = (p / p_0)_T \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde:

a_w es la actividad de agua.

p es la presión de vapor del agua en el producto a la temperatura T .

p_o es la presión de vapor del agua pura a la temperatura T .

Esta igualdad se basa en asumir la existencia de equilibrio termodinámico.

La actividad de agua representa la fuerza impulsora para la migración de agua desde el ambiente hacia el alimento y viceversa, o para la igualación de las actividades de agua de los componentes de una mezcla. Por lo tanto, en el almacenamiento de productos deshidratados es especialmente importante conocer las características de sorción del material, y este es uno de los factores más importantes para determinar sus características de almacenaje.

En el equilibrio, la actividad de agua está relacionada con el contenido acuoso a una temperatura constante a través de la isoterma de sorción de agua, **Figura 19**. Las isotermas de sorción de agua presentan diferente forma dependiendo del sistema en estudio. La **Figura 19a** representa el comportamiento de los sistemas amorfos (que incluyen a muchos alimentos). A bajas a_w la adsorción de agua es mayor en los sistemas amorfos que en los cristalinos (**Figura 19b**). Un sólido cristalino adsorbe muy poca agua hasta una a_w dada, a partir de la cual el agua comienza a disolver los cristales.

Además existen materiales, como los azúcares, que a bajas a_w son amorfos, pero al aumentar el contenido de agua logran suficiente movilidad para cristalizar. En muchos casos la estructura cristalina no puede contener la misma cantidad de agua que el material amorfo y por lo tanto se produce una "caída" de la curva como se ve en la **Figura 19c**.

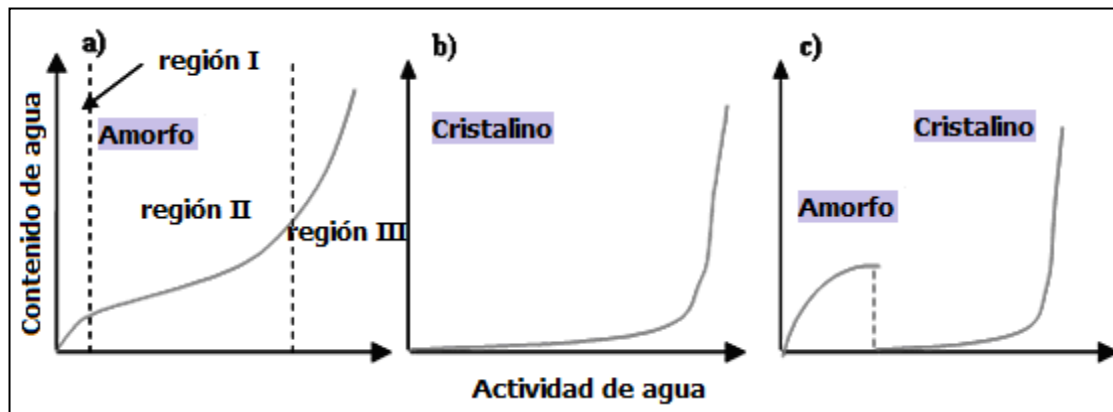


Figura 19. Isotermas de sorción de agua correspondientes a sistemas amorfos, cristalinos y a materiales amorfos que cristalizan a medida que aumenta la actividad de agua.

1.4.1.2 Estado vítreo y estabilidad

En términos de termodinámica, en alimentos complejos no existen estados de equilibrio estable, pero sí se pueden alcanzar varios estados de equilibrio metaestable. La estabilidad de propiedades deseables en los alimentos está entonces cinéticamente gobernada en condiciones de metaestabilidad dadas por el estado vítreo, y el objetivo de la obtención de productos estables durante el almacenamiento es impartir propiedades de metaestabilidad (Franks, 1994). En estos casos, el estado físico es extremadamente sensible a la humedad, la temperatura y el tiempo de observación.

Un material no cristalino puede existir en el estado vítreo o en el estado líquido sobre-enfriado ("gomoso") dependiendo de la temperatura y de la presencia de agua. El cambio entre estos dos estados, se conoce como transición vítrea. El término transición vítrea se refiere a la temperatura a la cual los vidrios inorgánicos empiezan a ablandarse y fluir (Sperling, 1986). Por debajo de la temperatura de transición vítrea (T_g), que es característica de cada sistema, el material es un sólido amorfo (vidrio) altamente viscoso. La transición vítrea (T_g) puede utilizarse como un parámetro descriptivo del estado físico de las macromoléculas, el cual puede diferir

de la movilidad de las moléculas más pequeñas como el agua (Vittadini y Chinachoti, 2003). La movilidad molecular en los vidrios está restringida a vibraciones y movimientos rotacionales de rango corto (Sperling, 1986). Los cambios que ocurren en el estado vítreo, durante el llamado "envejecimiento físico", son extremadamente lentos (Levine y Slade, 1986; Slade y Levine, 1991; Jouppila, 1999; Roos y col., 1996). A temperaturas superiores a T_g , el sistema pasa del estado vítreo al de líquido sobre-enfriado, la viscosidad disminuye de aproximadamente 10^{12} a 10^3 Pa.s (Sperling, 2005), aumenta la movilidad molecular y los movimientos traslacionales. Por lo tanto, al ocurrir la transición vítrea, los materiales son más susceptibles a cambios físicos o químicos, y el parámetro $(T-T_g)$ o sea la diferencia entre la temperatura del experimento y la T_g , que representa la distancia a la temperatura de transición vítrea en la escala de temperaturas, en muchos casos permite definir las variables cinéticas de los cambios físico-químicos asociados. Un valor de $(T-T_g)$ alto y positivo indicaría las condiciones para altas velocidades de transformaciones.

Los sólidos amorfos se obtienen cuando las moléculas del soluto son inmovilizadas mediante un rápido congelamiento o una rápida deshidratación, como sucede en los procesos de liofilización o secado por aspersion o "spray" (**Figura 20**). Como consecuencia de estos procedimientos, el sistema experimenta un rápido incremento de la viscosidad y por ende una importante disminución en la movilidad molecular. Las moléculas de soluto no pueden alcanzar configuraciones de equilibrio y por lo tanto no pueden organizarse para formar un cristal, sino que permanecen en forma desordenada o amorfa. En el secado convencional de sistemas heterogéneos (tejidos, multicomponentes), gran parte del material permanece amorfo por

impedimentos de movilidad de las sustancias cristalizables. (White y Cakebread, 1966; Levine y Slade, 1992; Roos y Karel, 1992).

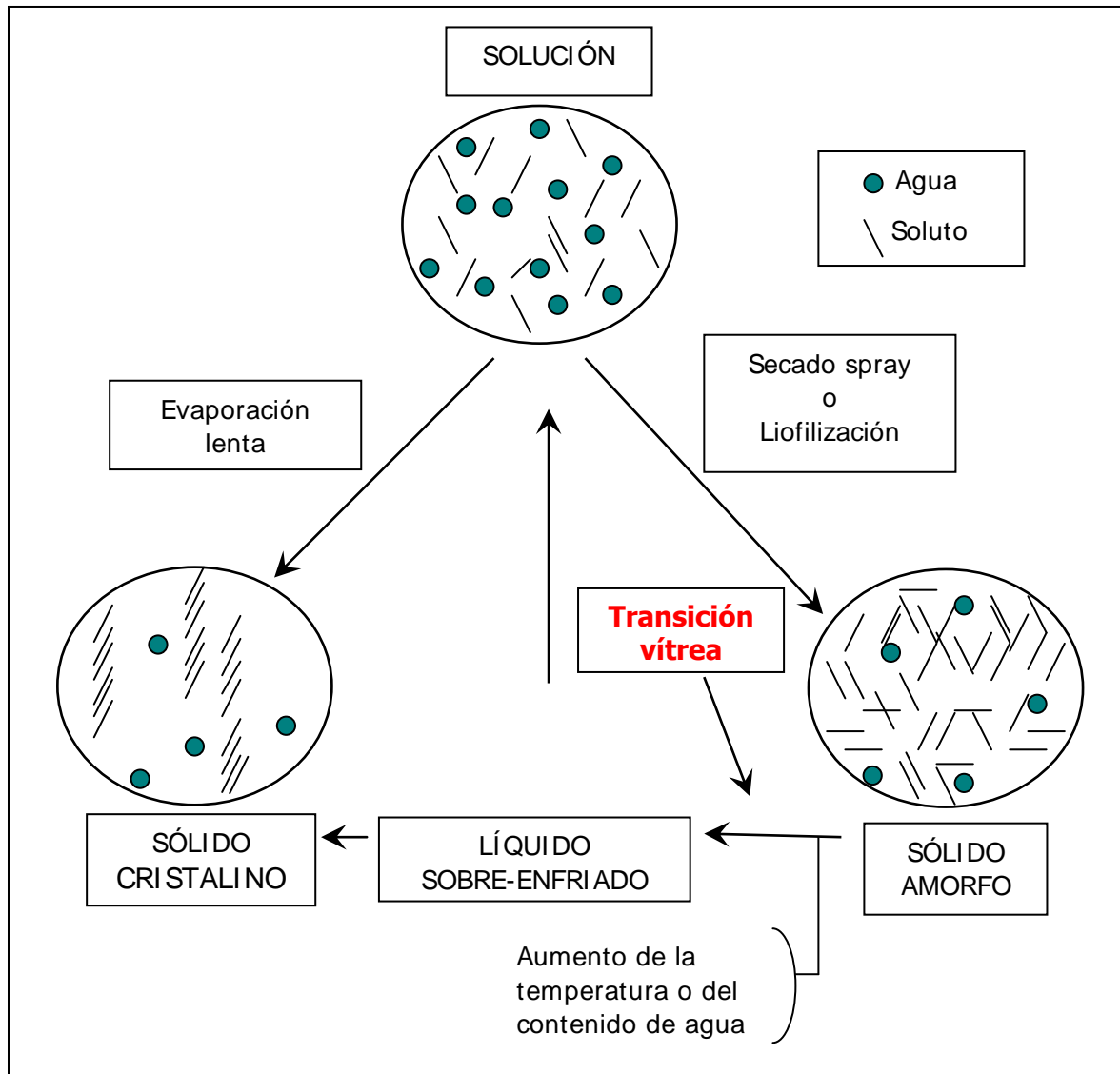


Figura 20. Formación de un sólido amorfo o cristalino a partir de una solución. Adaptado de Karmas, 1994.

Una aplicación interesante del estudio de la transición vítrea es el entendimiento de las propiedades de textura de sistemas alimenticios, y la explicación de los cambios que ocurren durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos (Nelson y Labuza, 1994). Algunos materiales de bajo contenido de agua son frágiles

mientras permanecen en el estado vítreo (Slade y Levine, 1995). A medida que los polímeros absorben agua no todas sus propiedades se afectan de la misma manera, en el rango bajo a intermedio de humedades algunas propiedades mecánicas muestran un máximo en función del contenido de agua, mientras que la T_g disminuye continuamente (Chang y col., 2000). Es importante notar que, a temperaturas en el rango de la T_g , un cambio de pocos grados puede provocar en los materiales frágiles una disminución significativa en la rigidez.

En cuanto a la relación entre el estado amorfo y la cinética de las reacciones químicas, la mayoría de los estudios evidencian efectos combinados de la transición vítrea y otros factores como el contenido de agua, actividad de agua, temperatura y concentración de reactivos, sobre la velocidad de reacciones químicas (Karmas y col., 1992; Bell y Hageman, 1994; Roos y Himberg, 1994; Buera y Karel, 1995; Bell, 1996).

La movilidad molecular en un sistema amorfo puede ser afectada por la adición de compuestos de bajo peso molecular, que actúan como plastificantes, esto es, aumentan la flexibilidad y extensibilidad. Además, los compuestos de bajo peso molecular tienen efecto sobre la T_g de un sistema. En los sistemas biológicos el plastificante más importante es el agua. En la **Figura 21** se muestra, para una matriz de azúcar, la curva de T_g en función del contenido de agua.

A medida que aumenta el contenido acuoso, disminuye la T_g (Roos, 1992) y la transición de un sistema vítreo a uno sobre-enfriado se puede dar tanto por aumento de la temperatura como del contenido de agua.

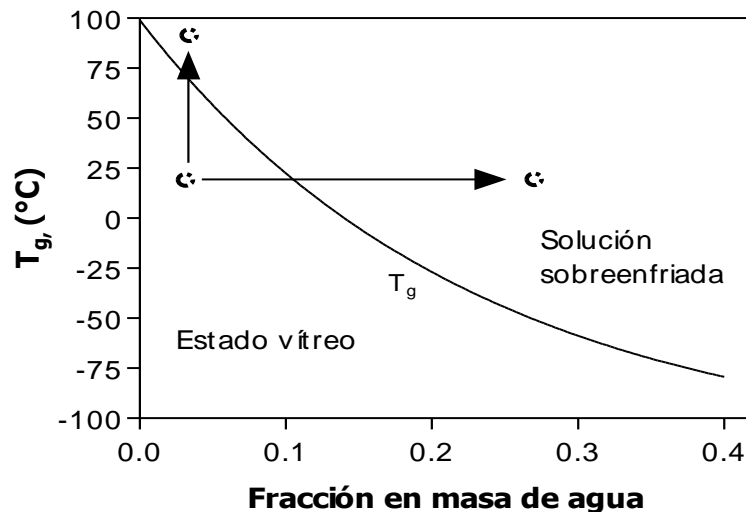


Figura 21. Curva de temperatura de transición vítrea en función del contenido de agua. Adaptado de Cardona y col. (1997).

Los materiales sobreenfriados están en un estado de no equilibrio y exhiben cambios dependientes del tiempo a medida que se acercan al equilibrio. De esta forma, pueden ocurrir cambios en sus características mecánicas o cambios en la difusión de solutos (Roos, y col., 1996). Los cambios mecánicos incluyen los fenómenos de colapso, pegajosidad, apelmazamiento y pérdida de porosidad (White y Cakebread, 1966; Bellows y King, 1973; Trsourouflis, y col., 1976; To y Flink, 1978 a; To y Flink, 1978 b; Flink, 1983; Levine y Slade, 1988; 1991). Los cambios en la difusión afectan la cinética de cristalización de azúcares amorfos, la liberación de aromas y en algunos casos las cinéticas de las reacciones (White y Cakebread, 1966; Iglesias y Chirife, 1978; To y Flink, 1978 c; Levine y Slade, 1988; Roos y Karel, 1990; Slade y Levine, 1991; Roos y Karel, 1992; Roos, 1995c; Simatos, y col., 1995; Roos, y col., 1996).

La **Figura 22** muestra un esquema del efecto de la transición vítrea sobre los cambios que ocurren en el procesamiento y almacenamiento de alimentos (Roos, 1998a).

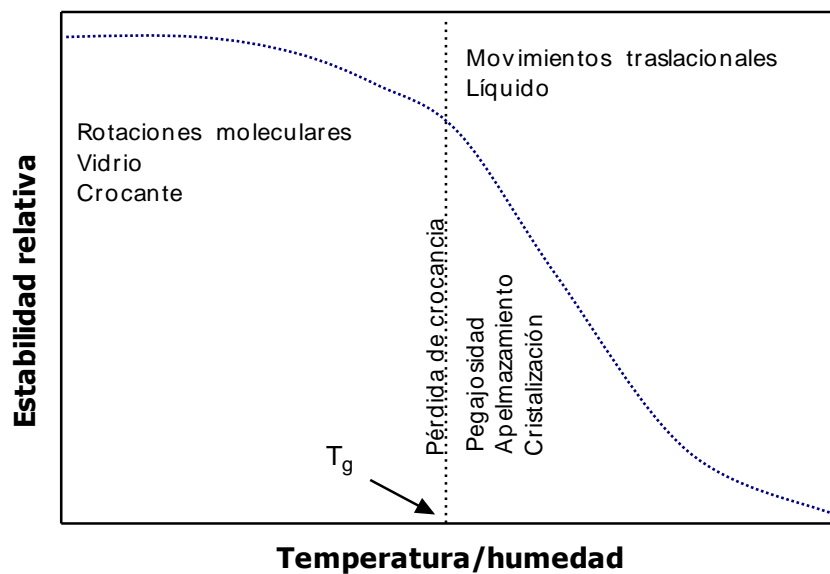


Figura 22. Representación esquemática de los efectos de la transición vítrea sobre las transformaciones estructurales y los cambios controlados por la difusión en materiales farmacéuticos, biológicos y alimentos. El bloque de la izquierda representa al estado vítreo, y el de la derecha al estado sobreenfriado. Adaptado de Roos, 1998a.

En el caso de aromas encapsulados en polvo, son muy importantes las consecuencias que tiene el almacenamiento a temperaturas mayores que T_g . La cristalización de azúcares en la matriz carrier puede causar la pérdida de aromas. Además, la ocurrencia de pegajosidad, apelmazamiento y colapso de los polvos, no solo produce productos con un aspecto indeseable para el consumidor, sino que también provoca la pérdida de aromas, y la dificultad en la reconstitución de los polvos.

Cristalización de hidratos de carbono amorfos

La cristalización incluye tres etapas: nucleación, propagación y maduración (Slade y Levine, 1987; Levine y Slade, 1992; Roos, 1995b). Durante la propagación ocurre el crecimiento de los cristales, que requiere difusión y una orientación

adecuada de las moléculas que están cristalizando sobre la superficie de un cristal en crecimiento (Jouppila, 1999). La velocidad de cristalización se puede controlar por la velocidad de difusión de las moléculas en su nucleación o en los sitios de crecimiento del cristal, y mediante la habilidad de las moléculas para reorientarse entre ellas para formar un núcleo o para formar un cristal lateral (Hartel y Shastry, 1991; Roos, 1995a).

Se sabe que la cristalización de polímeros sintéticos amorfos está controlada por la transición vítrea (Tant y Wilkes, 1981; Sperling, 1986). Además, la velocidad de cristalización en hidratos de carbono amorfos aumenta al aumentar la diferencia entre la temperatura de almacenamiento y la T_g (Slade y Levine, 1991). Los hidratos de carbono amorfos cristalizan cuando se almacenan en condiciones de humedad relativa en la cual el contenido de agua se torna lo suficientemente alto como para disminuir la transición vítrea por debajo de la temperatura de almacenamiento (Roos y Karel, 1990; Roos y Karel, 1992); siendo éste el contenido de agua crítico (Roos, 1993). El almacenamiento de los hidratos de carbono a tales condiciones de HR podría resultar en cristalizaciones dependientes del tiempo (Jouppila, 1999).

El agregado de otras macromoléculas a sistemas de azúcares puede alterar las características de sorción de agua, y retrasar la cristalización de azúcares. Por ejemplo, varios autores observaron que la cristalización de la lactosa estaba afectada (retrasada) por los otros componentes sólidos de la leche (Berlin, y col., 1973; Senoussi, y col., 1995; Jouppila y col., 1999).

Pegajosidad, apelmazamiento y colapso estructural

Los fenómenos de apelmazamiento, pegajosidad y colapso ocurren en polvos como consecuencia de un aumento de temperatura o humedad. El término "colapso" se utiliza para describir la pérdida de estructura, la reducción del tamaño de los poros y un encogimiento volumétrico en materiales secos. Los materiales muy porosos, como los preparados por liofilización son susceptibles de sufrir un colapso post-secado cuando no se mantienen las condiciones óptimas de almacenamiento (Levi y Karel, 1995). El apelmazamiento de los polvos se puede considerar como un fenómeno de colapso, en el que se forman agregados de partículas en forma permanente, que se endurecen e impiden el flujo libre del polvo. Por el contrario la pegajosidad se refiere a un proceso instantáneo que se debe a la plastificación de la superficie de las partículas, con la formación de puentes líquidos entre ellas (Roos, 1995).

El colapso en las matrices liofilizadas puede afectar adversamente las propiedades del material liofilizado, y entre ellas se pueden citar: a) pérdida de volátiles atrapados en la matriz liofilizada (Flink y Karel, 1972; Tsourouflis y col., 1976; To y Flink, 1978 c; Gerschenson, y col., 1981); b) disminución de las características de rehidratación de tejidos vegetales (Tsourouflis y col., 1976; Anglea, y col., 1993); c) distribución inhomogénea de la humedad de la muestra (Tsourouflis y col., 1976); d) aparición de apelmazamiento y pegajosidad (Levine y Slade, 1989; Aguilera, y col., 1993); e) sellado de los capilares, durante la liofilización, que provoca una disminución en la deshidratación y pérdida de esponjosidad (Bellows & King, 1973; Flink, 1983); f) modificación de la velocidad de desarrollo de color (Buera y Karel, 1995; Roos y Himberg , 1994); y g) aumento de la velocidad de oxidación de lípidos (Gejl-Hansen y Flink, 1977).

La temperatura de colapso (T_c) se definió específicamente para cada experimento y se determinó para algunos sistemas (To y Flink, 1978 a). Entre los factores que afectan la T_c se pueden citar: la temperatura de almacenamiento de la muestra (To y Flink, 1978 a); el aumento de humedad, (Levi y Karel, 1995); la masa molecular (To y Flink, 1978 a; Aguilera, y col., 1993); y la temperatura de transición vítrea (Levi y Karel, 1995).

Está claro que el colapso y la temperatura de transición vítrea son fenómenos relacionados, mientras la transición vítrea de un material polimérico es generalmente reversible, el colapso de las matrices liofilizadas es irreversible. La **Figura 23** muestra la relación entre la temperatura de transición vítrea y la aparición de fenómenos físicos de deterioro.

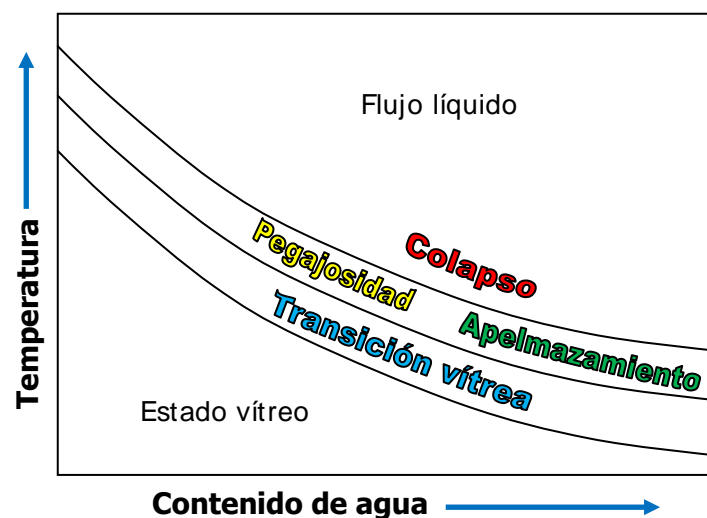


Figura 23. Consecuencias de la transición vítrea sobre los fenómenos físicos. Adaptado de Roos 1995b.

Se propuso que la relación entre T_c y T_g de un alimento amorfo se podría usar como un indicador de estabilidad. Por lo tanto, el conocimiento de la T_g y su dependencia con el contenido de agua se podría usar para controlar los problemas

de pegajosidad, especialmente para la producción y para la estabilidad de polvos liofilizados (Roos, 1995b).

1.4.2. Cambios influenciados por los procesos de secado

El secado tiene como objetivo disminuir la actividad del agua (a_w) de diversos materiales perecederos a valores de a_w menores de 0,5 con el fin de permitir su almacenamiento a temperatura ambiente.

El parámetro que tradicionalmente se empleó para describir la estabilidad de alimentos fue la actividad de agua. Labuza, y col. (1970) definieron un mapa de estabilidad en el que se indicaba esquemáticamente la velocidad relativa de procesos químicos, enzimáticos y microbiológicos en función de a_w (**Figura 24**). A valores bajos de a_w , el agua está fuertemente unida a los sitios más polares, y no está disponible para solvatar a los reactivos. El límite de esta región de a_w es la humedad de monocapa (Labuza, 1975). A valores mayores de a_w , el agua existe en multicapas, y su movilidad molecular aumenta. Se observa un aumento en las velocidades de reacción, debido a la disponibilidad de agua como medio de reacción. Con un mayor aumento de a_w , la velocidad de algunas reacciones disminuye debido a la inhibición por producto causada por ser un producto de reacción; o a la dilución de los reactivos en la fase acuosa. La actividad de agua provee una guía general para predecir la estabilidad de alimentos, y se utiliza extensivamente en la industria como un indicador de calidad y seguridad.

Muchas características físicas, tales como cristalización, apelmazamiento, pegajosidad, colapso, movilidad molecular, y difusividad no se puede explicar completamente con el concepto actividad de agua. Además, el secado conduce a

estructuras que difieren generalmente de las del producto húmedo inicial. Esto puede ser una desventaja, pero también puede ofrecer un nuevo beneficio, como por ejemplo la estructura porosa de copos de maíz crujiente leche en polvo instantánea, y así sucesivamente. El proceso de secado puede, por tanto, ser considerado como una operación controlada, una fuente de productos innovadores y fáciles de usar.

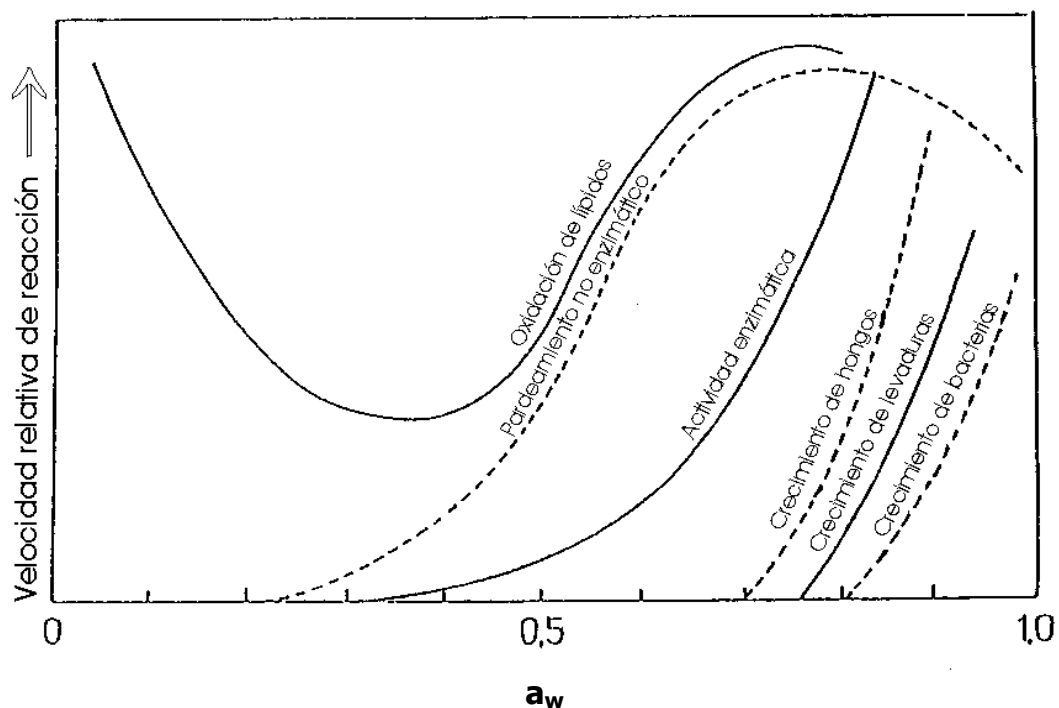


Figura 24. Mapa de actividad de agua para las velocidades de procesos deteriorativos en alimentos (Adaptado de (Labuza, y col., 1970).

En la industria alimentaria, el secado se aplica a diferentes tipos de productos y los principales objetivos son:

- Extender la vida útil de los alimentos sin la necesidad de almacenamiento refrigerado.
- Reducir el peso y el volumen a granel, para ahorrar en el costo del transporte y almacenamiento.

- Convertir productos perecederos a formas estables (por ejemplo, leche en polvo).
- Producir ingredientes y aditivos para la transformación industrial (el llamado productos alimenticios intermedio (PAI), como las verduras para sopas, cebollas para las carnes cocidas, frutas para tortas, agentes aglutinantes, aromas, colorantes, agentes de alimentos formadores de gel y proteínas emulsionantes, etc.).
- Obtener determinados alimentos de conveniencia (bebidas instantáneas, cereales para el desayuno, frutas secas, etc.), con las características de una reconstitución rápida y las buenas cualidades sensoriales, para usos especiales, como en las máquinas expendedoras, o directamente para los consumidores.

En lo que se refiere a calidad de alimentos hay que tener en cuenta primero la seguridad y luego las propiedades sensoriales y nutricionales. Con el fin de obtener las características deseadas en los alimentos deben diseñarse un tiempo óptimo de secado y un nivel adecuado de severidad de procesamiento. El control de las propiedades mencionadas se basa, a menudo en una forma compleja, sobre todo fenómenos químicos y físicos que ocurren durante el secado y el almacenamiento subsiguiente.

La composición química del producto alimenticio es variable y compleja, incluyendo hidratos de carbono, proteínas, lípidos, minerales, vitaminas, aromas, y así sucesivamente. Esta complejidad induce cambios en las propiedades a lo largo de secado y el almacenamiento, y por tanto deben ser controlados. Además del contenido de agua y la actividad del agua, muchos factores positivos y efectos

negativos deben ser considerados (Nadeau y Puiggali, 1995; Dumoulin y Bimbenet, 1998a, b; Nijhuis et al, 1998). Entre ellos:

- las condiciones de temperatura y humedad durante el procesamiento.
- los cambios en la forma, estructura, porosidad y propiedades mecánicas.
- los fenómenos de colapso y cristalización vinculados con la T_g .
- las reacciones químicas, en concreto la naturaleza y el tipo en relación con el pH y la temperatura.
- las condiciones de transferencia de calor y agua en relación con la difusividad y conductividad.

Las interacciones entre el agua y otros componentes dependen de la movilidad del agua y el soluto, los cuales son por tanto, responsables de reacciones bioquímicas, transformaciones físicas y fenómenos mecánicos durante el procesamiento, almacenamiento y consumo (Le meste y col., 2002).

1.4.2.1 Reacciones bioquímicas

Las altas temperaturas de secado tienden a dañar la calidad de los productos alimenticios. Pero sería más preciso decir que estos cambios en la calidad están relacionados con el tiempo y la temperatura. Ambos parámetros aumentan las velocidades de reacción, que también dependen fuertemente de la a_w de los productos.

Muchas reacciones bioquímicas puede ser inducidas por el incremento de la temperatura en los alimentos: la reacción de Maillard, la degradación de vitaminas, la oxidación de lípidos, la desnaturalización de proteínas térmicamente inestables, la ocurrencia de reacciones enzimáticas (que puede ser promovidas o inhibidas), etc.

Algunas de estas reacciones bioquímicas generan componentes apropiados, por ejemplo, por sus propiedades sensoriales (desarrollo de sabor), otras pueden ser más o menos deseables por cuestiones nutricionales o potencial toxicidad (pérdida de vitaminas, cambios en el color, sabor o aroma, o por la formación de compuestos tóxicos). Todas las reacciones están vinculadas a la composición del producto, el contenido de agua y la temperatura.

En el caso de los aromas encapsulados, la principal reacción de deterioro a tener en cuenta en el secado es la oxidación de lípidos. La oxidación lipídica es responsable de la rancidez, el desarrollo de sabores desagradables, y la pérdida de vitaminas solubles en grasas y pigmentos en los alimentos deshidratados. La oxidación lipídica se inicia por luz, calor, radicales libres y peróxidos, activado por iones metálicos, y aumenta a altas temperaturas durante la deshidratación. La porosidad del producto seco puede tener un impacto sobre la concentración de oxígeno y afectar a la susceptibilidad al oxígeno, la cual es mayor en productos liofilizados (Bonazzi y Dumoulin; 2011).

I.4.2.2 Transformaciones físicas

Diferentes fenómenos relacionados con la pérdida de humedad y la variación de la temperatura con el tiempo se observan en transcurso del secado:

- Disminución de a_w
- Formación de vidrios, cristalización, colapso, pegajosidad
- Evaporación de compuestos volátiles

- Migración o retención de los componentes, volátiles o no.

Las consecuencias sobre las características del producto son complejas y están interconectadas. Por ejemplo, una disminución de la a_w corresponde a una reducción de la disponibilidad de agua y la movilidad en el medio, aumentando la estabilidad biológica y microbiológica, que es el objetivo principal. Por otro lado, una disminución en la a_w disminuye la transferencia de agua, y por tanto, la velocidad de secado, aumentando el tiempo que el producto debe pasar a temperatura relativamente alta y durante el cual se pueden desarrollar diversas reacciones (Rocha Mier, 1993).

Los compuestos aromáticos se evaporan durante el secado debido al calentamiento intenso del producto y la eliminación de agua. Sin embargo, se ha observado que la liberación de compuestos aromáticos durante el secado es mucho menor de lo esperado si se considera sólo la volatilidad o presión de vapor de las moléculas.

Tres explicaciones han sido propuestas: 1) la difusión selectiva, 2) el atrapamiento dentro de microrregiones, y 3) la interacción con el sustrato. El primero fue propuesto por Thijssen y Rulkens (1968). La retención es un proceso controlado principalmente por difusión, y la difusividad de las moléculas de aroma disminuye mucho más rápido que la del agua cuando el contenido de agua disminuye. Como resultado, el producto evoluciona durante el secado como si su superficie fuera impermeable a los componentes aromáticos. El concepto de microrregiones se ha utilizado para explicar la retención de los compuestos volátiles durante la liofilización (Flink y Karel, 1969). Durante la congelación, los azúcares pueden crear microrregiones amorfas que atrapan las moléculas volátiles por enlaces de

hidrógeno. Esta es una descripción del fenómeno de retención a nivel microscópico. También es posible que la retención está influenciada por las interacciones específicas con el sustrato, tales como enlaces covalentes (aldehídos con-NH₂ y grupos-SH), atrapamiento estérico, o sorción (en proteínas, lípidos). Sin embargo, la difusión selectiva se presenta a menudo como el mecanismo principal y más general. Coumans y col. (1994) indicaron que el concepto de difusión selectiva puede aprovecharse para crear condiciones que proporcionen una alta retención de aroma, promoviendo una rápida disminución en el contenido de agua en la superficie del producto.

La retención o pérdida de compuestos aromáticos también se ve influenciada por la estructura del producto seco (amorfo o cristalino) (Bhandari y col., 1992; Re, 1998).

Otro fenómeno físico importante es la pegajosidad en el secado spray. Durante el secado spray, las gotas de líquido que entran en contacto con el aire caliente se secan rápidamente (~ 10 s). El agua se evapora desde la superficie y la viscosidad en la superficie gota aumenta progresivamente hasta alcanzar un valor crítico (10^7 Pa . s) en el que la superficie de la partícula se encuentra en un estado gomoso considerado como pegajoso (Roos y Karel, 1991). La pegajosidad superficial depende de la temperatura superficial, el contenido de agua y la composición (es decir, hidratos de carbono y aceites). Cuando la superficie de las partículas alcanza el estado pegajoso, se producen adhesiones entre partículas, que luego del secado podrían conducir a la aglomeración (Palzer, 2005).

I.4.2.3 Estabilidad del aroma encapsulado durante el almacenamiento

El objetivo principal de la microencapsulación de aromas líquidos o aceites es proveer polvos secos que fluyan libremente, otorgando además protección contra reacciones evitando la pérdida de aroma durante el procesamiento y el almacenamiento. Además, la encapsulación ofrece algunos beneficios como la liberación controlada de aromas y el retraso de oxidación de aceites.

Las propiedades de las sustancias encapsuladas están relacionadas con la estructura de la matriz, que a su vez está directamente relacionada con la T_g del material. En el estado vítreo, la matriz es físicamente estable y no sufre ningún cambio estructural significativo. Por el contrario en el estado sobreenfriado, pueden ocurrir movimientos moleculares ocasionando el deterioro del aroma encapsulado (Ubbink y Schoonman, 2003). En este caso el deterioro físico estaría asociado a la ocurrencia de apelmazamiento, colapso y cristalización. Por lo tanto, para conservar las propiedades y estructura de los productos conteniendo los aromas encapsulados es necesario mantener la matriz en estado vítreo durante el almacenamiento. Esta condición se consigue utilizando polímeros de alto peso molecular como matrices para la encapsulación, para tener altas temperaturas de transición vítrea (**Figura 25a**). Sin embargo, este efecto positivo de aumentar el peso molecular para incrementar la T_g de la matriz se ve contrarrestado por un aumento en el volumen libre y la porosidad residual. Estos efectos conducen a la obtención de una estructura menos densa que en el caso de emplear moléculas más pequeñas, dado que es más complejo que se empaquen las moléculas grandes de los polímeros debido a su mayor viscosidad. Este tipo de matrices facilitan la entrada de oxígeno y por lo tanto disminuyen la vida útil de los aromas encapsulados, si esta depende de la

concentración de productos de la oxidación de lípidos, como se esquematiza en la **Figura 25b**. El efecto de una mayor porosidad con el aumento del peso molecular de la matriz es muy importante para el caso de encapsulación por secado spray.

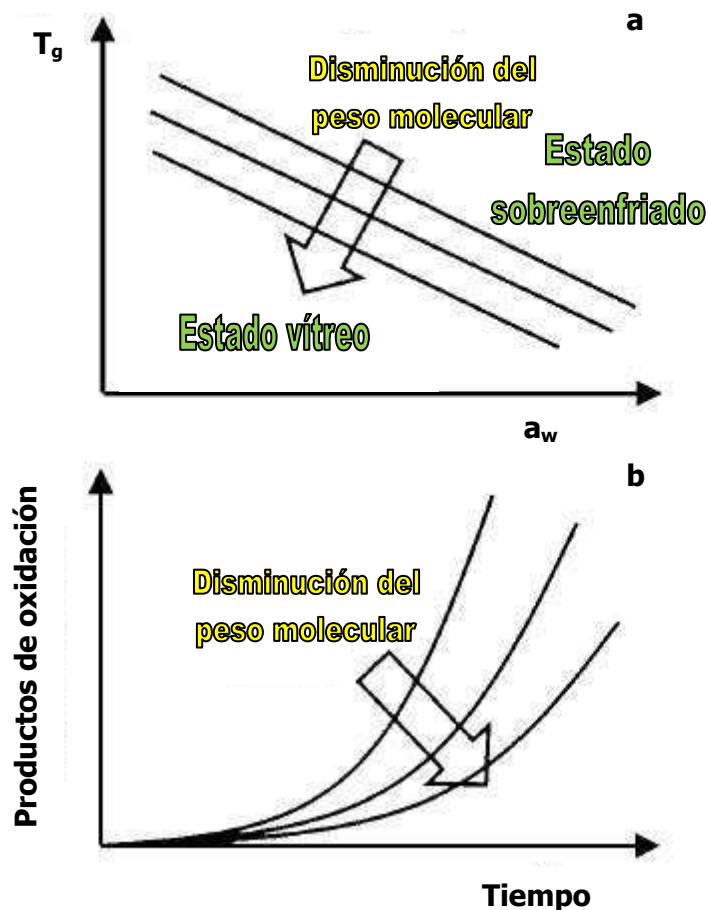


Figura 25: Representación esquemática de la dependencia del peso molecular de sistemas de encapsulación formadores de estructuras vítreas sobre: (a) la temperatura de transición vítrea, y (b) la concentración de productos de oxidación de aromas encapsulados por secado spray en función del tiempo. Adaptado de Ubbink y Schoonman (2003).

Por lo tanto, en general se debe hacer un compromiso entre la estabilidad física de la matriz, que se favorece con el aumento del peso molecular, y la permeabilidad al oxígeno, que usualmente se minimiza reduciendo el peso molecular. Para ello, en la mayoría de los productos comerciales preparados por secado spray se utilizan matrices compuestas por mezclas de hidratos de carbono de peso molecular

intermedio/alto (almidones, maltodextrinas, etc.) e hidratos de carbono de bajo peso molecular (usualmente disacáridos como sacarosa) (Whorton y Reineccius, 1995; Reineccius, 2001).

En las reacciones de oxidación de aromas se forman muchos productos diferentes. En el caso de la encapsulación de D-limoneno, el óxido de limoneno (limoneno-1, 2-epóxido) y la carvona se suelen utilizar como indicadores de la oxidación (Anandaraman y Reineccius, 1986). La formación de los óxidos aumenta durante el almacenamiento y depende fundamentalmente de la HR. Durante el período inicial, la formación de óxidos aumenta linealmente con el tiempo, de modo que la constante de velocidad de oxidación puede calcularse en base a una cinética de reacción de orden cero (Anandaraman y Reineccius, 1986). Sin embargo, durante un tiempo de almacenamiento la velocidad de formación de los óxidos mencionados tiende a disminuir, particularmente a HR mayores. Esto podría explicarse por la degradación acelerada hacia otros compuestos de óxido y la liberación de los óxidos en el entorno (Soottitantawat et al., 2003).

Los procesos de liberación y oxidación de aromas encapsulados están estrechamente relacionados con los cambios estructurales en las matrices. La **Figura 26** es una representación esquemática de los fenómenos que ocurren cuando se almacena una partícula secada spray en un ambiente húmedo. Puede observarse como la partícula adsorbe vapor de agua, seguido por un cambio de estado de la matriz de vítreo a gomoso. En la matriz en estado gomoso, el aroma encapsulado puede moverse fácilmente, al mismo tiempo, la adsorción de oxígeno en la pared se vuelve más importante progresando la oxidación del aroma (Walzel y Furuta, 2011).

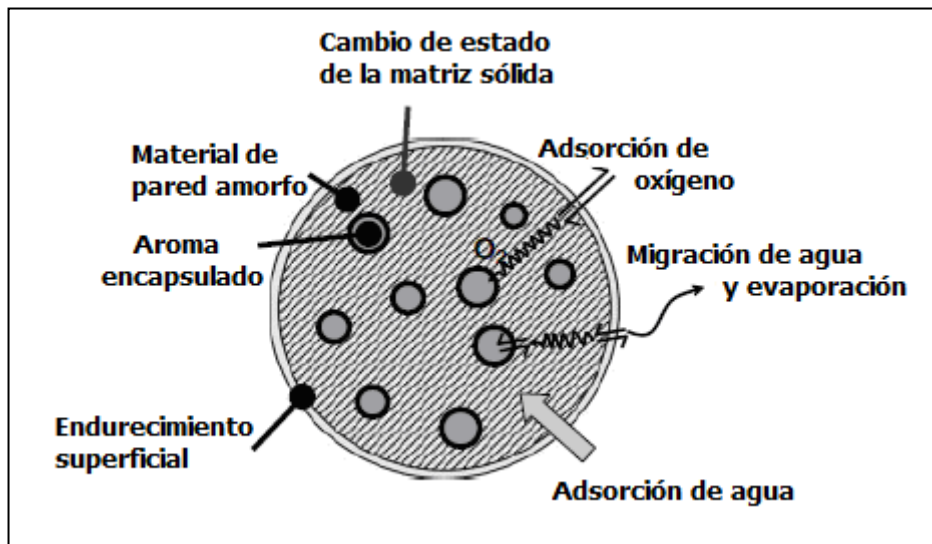


Figura 26. Características generales de un flavor hidrofóbico encapsulado en una matriz vítrea. Se indican las principales características estructurales y los cambios físicos y químicos que influyen en la estabilidad del flavor encapsulado. Adaptado de Walzel y Furuta, 2011.

La **Figura 27** muestra las imperfecciones estructurales de partículas conteniendo aromas oleosos encapsulados, que afectan la vida útil del aroma. Los principales defectos son los poros abiertos y aceite superficial (aceite no encapsulado presente tanto en la superficie exterior como en los poros abiertos).

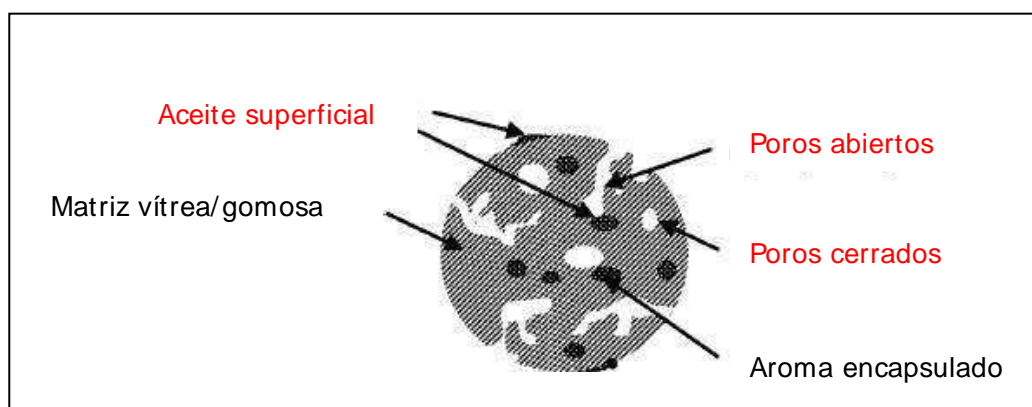


Figura 27. Esquema de los defectos estructurales de una partícula conteniendo un flavor oleoso encapsulado. Adaptado de Ubbink y Schoonman (2003).

Los poros abiertos son indeseables porque penetran en las zonas donde está encapsulado el aceite y aceleran la oxidación. Además contribuyen a la evaporación

del aroma. Es importante notar que si bien los movimientos a gran escala de las moléculas de la matriz están efectivamente bloqueados en el estado vítreo, las moléculas pequeñas como gases y algunas moléculas orgánicas pueden migrar a través de los materiales amorfos debido a fluctuaciones de densidad inducidas térmicamente (Vrentas y Duda, 1978).

II. Objetivos

II.1 Objetivo general

La presente Tesis tiene como objetivo general estudiar la aplicación del azúcar trehalosa en la encapsulación de aromas. El enfoque de este estudio apunta a analizar la influencia de la trehalosa en la retención de volátiles aromáticos. Estos estudios se orientan a mejorar la calidad sensorial y la estabilidad física de aromas encapsulados por secado spray, y por extensión a mejorar/comprender la encapsulación de biomateriales lábiles en estructuras amorfas conteniendo trehalosa.

II.2 Objetivos específicos

- Realizar la encapsulación de diferentes volátiles, considerando 1) un volátil sencillo y soluble en agua como el etanol, 2) un volátil sencillo e hidrofóbico como el citral, y 3) un volátil complejo e hidrofóbico como el aceite esencial de naranja.
- Preparar emulsiones para lograr la encapsulación de los volátiles hidrofóbicos:
 - Caracterizar las emulsiones en cuanto a su reología, distribución y tamaño de gota y desestabilización en el tiempo.
 - Emplear distintos agentes emulsificantes (almidones modificados).
 - Comparar dos métodos de preparación de las emulsiones (agitación a alta velocidad y sonicación).
 - Obtener emulsiones reconstituidas a partir de los polvos conteniendo los aromas encapsulados, realizar su caracterización y evaluar su estabilidad.
- Obtener formulaciones deshidratadas conteniendo los volátiles encapsulados en matrices formadas por trehalosa o sacarosa, con el agregado de maltodextrina y almidones modificados:
 - Caracterizar los polvos conteniendo los aromas encapsulados en cuanto a sus propiedades de sorción de agua, transiciones vítreas y movilidad molecular.
 - Analizar la retención de los volátiles encapsulados luego del secado por cromatografía gaseosa como así también realizar la evaluación sensorial de los mismos.

- Analizar el efecto de los componentes de las diferentes formulaciones sobre: a) las características físicas de los polvos y su influencia sobre la estabilidad en el almacenamiento en diferentes condiciones; b) los perfiles aromáticos obtenidos; y c) el uso potencial de las formulaciones de aromas cítricos para su incorporación a jugos en polvo.

III. Materiales y métodos

III.1 Elección de los sistemas

Con el objetivo de analizar la retención de volátiles luego del secado y durante el almacenamiento, determinar la estabilidad de las emulsiones y el efecto de la matriz amorfa sobre la encapsulación de volátiles, se seleccionaron formulaciones similares a las utilizadas en la industria alimentaria y sistemas modelos sencillos que se pudieran obtener en estado amorfo por liofilización y por secado spray. A continuación se mencionan las formulaciones seleccionadas:

Encapsulación de etanol:

- Volátil a encapsular: etanol
- Matrices: soluciones de trehalosa, sacarosa, maltodextrina y mezclas de trehalosa con maltodextrina y sacarosa con maltodextrina, en presencia de almidón modificado.

Encapsulación de aromas cítricos:

- Volátiles a encapsular: citral (mayoritariamente responsable del carácter único del limón) y aceite esencial de naranja (un aroma complejo compuesto por varios volátiles).
- Matrices: soluciones de trehalosa, sacarosa y sus mezclas con maltodextrina en presencia de almidón modificado (empleado como emulsificante).

III.2 Preparación de los sistemas

III.2.1 Encapsulación de etanol

Los materiales componentes de las diferentes soluciones fueron:

- Sacarosa grado analítico, Merck (Alemania)

- Trehalosa, Cargill Inc. (Wayzata, Minnesota, EE.UU.).
- Maltodextrina (MD) DE 12, Saporiti S.A. (Argentina).
- Almidón modificado Capsul, Gelfix (Argentina).
- Agua bidestilada.

El volátil a encapsular fue:

- Etanol, Fradealco (Argentina).

III.2.1.1 Preparación de las soluciones

Se prepararon soluciones compuestas por etanol, trehalosa (T), sacarosa (S), maltodextrina (MD) y mezclas de cada azúcar y MD (1:1), llamadas (TMD) y (SMD). En todos los casos se agregó almidón modificado (Capsul). En la **Tabla 10** se presenta la composición de las diferentes formulaciones.

Tabla 10. Composición de las diferentes soluciones conteniendo etanol.

Formulaciones	Componentes (%p/p)					
	Etanol	Agua	Capsul	Trehalosa	Sacarosa	Maltodextrina
T	0,3	56,3	8,0	35,4	-	-
S	0,3	9,7	8,0	-	32,0	-
MD	0,3	9,7	8,0	-	-	32,0
TMD	0,3	58,0	8,0	17,7	-	16,0
SMD	0,3	59,7	8,0	-	16,0	16,0

III.2.1.2 Secado de las soluciones

III.2.1.2.a Secado spray

Las soluciones se secaron utilizando un secador spray a escala de laboratorio, Mini Spray Dryer Büchi B290 (Flawil, Suiza), cuyo esquema de secado en co-corriente se muestra en la **Figura 28**. Las condiciones operativas del proceso de secado

fueron: temperatura de entrada del aire 98 ± 2 °C, temperatura de salida del aire 68 ± 2 °C, caudal de 8 mL/min, presión de aire 3,2 bar, y diámetro de boquilla de 1,5 mm (Lee y col., 1999). Una vez obtenidos, los polvos se recolectaron en bolsas de cloruro de polivinilideno (PVDC) que se sellaron y se almacenaron en un freezer a -20 °C hasta su utilización.

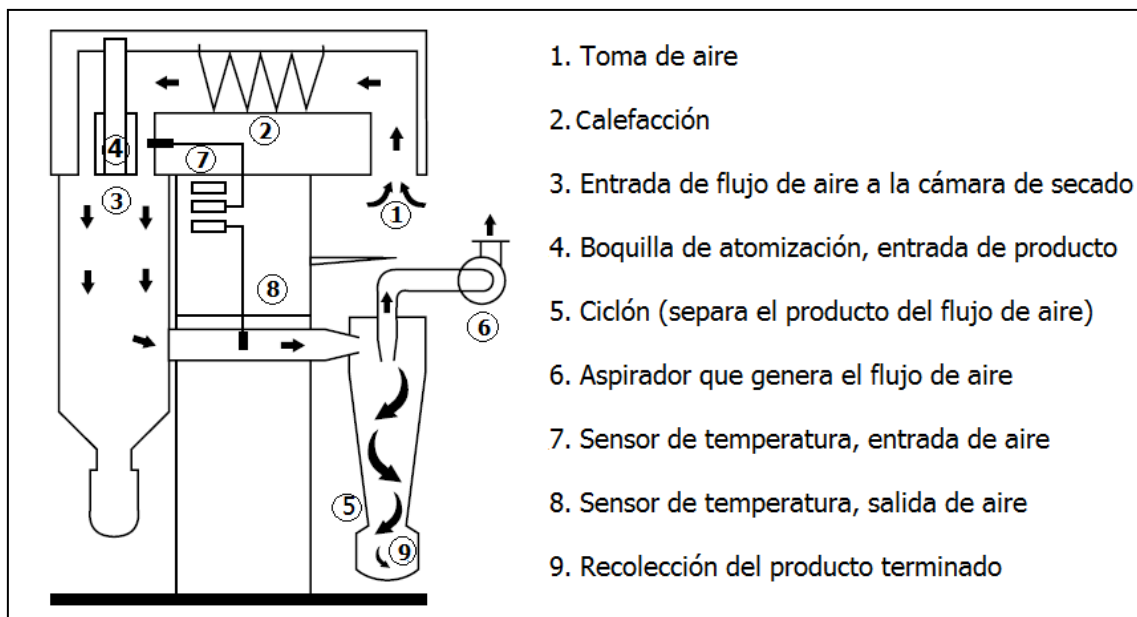


Figura 28. Esquema del proceso de secado spray en co-corriente en un equipo como el utilizado en este trabajo. Adaptado de Training Papers Spray Drying, BÜCHI Labortechnik AG, 1997 - 2002.

III.2.1.2.b Liofilización

Se distribuyeron 2,5 mL de las distintas soluciones en viales de 5 mL. Los viales se congelaron a -20 °C durante 24 horas y posteriormente se sometieron a un proceso de liofilización durante 48 horas. Este procedimiento se realizó en un liofilizador ALPHA 1-4 LD2 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GMBH Alemania), cuya placa condensadora opera a -84 °C y a una presión de 0,04 mbar. En la **Figura 29** se muestra el esquema básico del equipo liofilizador empleado. Al cabo del

proceso los tubos se sellaron herméticamente y se almacenaron en un freezer a -20°C hasta su utilización.

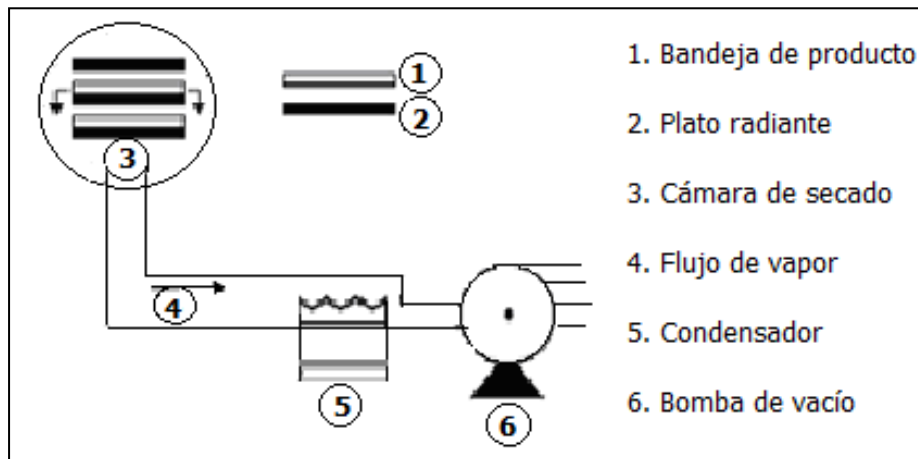


Figura 29. Esquema básico de un equipo liofilizador como el utilizado.

III.2.1.3 Almacenamiento

Se colocó 1 g de los distintos polvos obtenidos del proceso de secado spray en viales de 5 mL, estos viales junto con los obtenidos del proceso de liofilización se almacenaron durante 15 días en presencia de una solución saturada de LiCl (a 11 %HR; Greenspan, 1977) a 25°C . Luego, los viales se sellaron herméticamente y se almacenaron a dos temperaturas 25 y 37°C . A determinados intervalos de tiempo (0, 15, 45 y 75 días) de almacenamiento las muestras se retiraron para realizar las determinaciones correspondientes.

Los estudios de las propiedades físicas se realizaron entre 11 y 33 % HR, mientras que los almacenamientos en el tiempo a distintas temperaturas se realizaron a 11 % HR, se seleccionó esta HR para poder tener a todas las formulaciones en el estado vítreo a las temperatura de almacenamiento.

III.2.2 Encapsulación de aceites cítricos

III.2.2.1 Preparación de emulsiones frescas

Los materiales componentes de las diferentes fases continuas fueron:

- Sacarosa grado analítico, Merck (Alemania)
- Trehalosa grado analítico, Cargill Inc. (Wayzata, Minnesota, EE.UU.).
- Maltodextrina (MD) DE 12, Saporiti S.A. (Argentina).
- Agua bidestilada.

Se utilizaron dos almidones modificados como emulsificantes:

- Capsul, Gelfix (Argentina).
- Hi Cap, Saporiti Sabores (Argentina).

Las fases dispersas empleadas fueron:

- Aceite citral Extra Fino, Saporiti Sabores (Argentina).
- Aceite esencial de naranja Extra Fino, Saporiti Sabores (Argentina).

III.2.2.1.a Emulsiones conteniendo citral

Se prepararon soluciones formadas por agua bidestilada, trehalosa (T), sacarosa (S) o una mezcla (1:1) de T o S con maltodextrina (MD), llamadas TMD y SMD respectivamente. Se agregó almidón modificado Capsul como emulsificante. Luego, se agregó citral a las soluciones y se prepararon 200 mL de cada emulsión empleando un agitador Griffin & George (Loughborough, Reino Unido). Esta operación se llevó a cabo durante 2 min a 25 °C y a 750 rpm. La formación de emulsiones se completó agitando la mezcla durante 10 min en un agitador de alta velocidad, Sorvall OMNI MIXER 17106-OMNI Corporación Internacional, Waterbury (CT, EE.UU.), que opera a 16.000 rpm. La temperatura se mantuvo constante

durante la agitación empleando un baño de hielo. Los valores de pH fueron: $3,49 \pm 0,01$ para las formulaciones T y S, y $4,04 \pm 0,01$ para las formulaciones que contenían MD. Este conjunto de emulsiones, denominado emulsiones frescas (EF), se analizó inmediatamente una vez preparado. La masa exacta de cada ingrediente de las emulsiones se detalla en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Composición de las diferentes emulsiones conteniendo citral.

Formulaciones	Componentes (%p/p)					
	Citral	Agua	Capsul	Trehalosa	Sacarosa	Maltodextrina
T	5,0	60,0	3,0	32,0	-	-
S	5,0	60,0	3,0	-	32,0	-
TMD	5,0	60,0	3,0	16,0	-	16,0
SMD	5,0	60,0	3,0	-	16,0	16,0

III.2.2.1.b Emulsiones conteniendo aceite de naranja

La preparación de la emulsión se realizó en dos etapas. En primer lugar se prepararon 200 mL de soluciones formadas por agua bidestilada y una relación (1:1) de trehalosa y maltodextrina (TMD) o sacarosa y maltodextrina (SMD). Se emplearon como emulsificantes dos tipos de almidones modificados, Capsul o Hi cap. Luego se dispersaron cantidades necesarias de aceite esencial de naranja y se mezclaron empleando un agitador Griffin & George (Loughborough, Reino Unido). Esta operación se llevó a cabo durante 2 min a 25 °C y a 750 rpm. La composición de las formulaciones se detalla en la **Tabla 12**.

En una segunda etapa el proceso de emulsificación se realizó empleando 2 métodos:

a) Agitación a alta velocidad: durante 10 minutos empleando un agitador de alta velocidad "Ultra-turrax" T18 Basic (IKA® Works, Inc., USA) operando a 20.000 rpm durante 5 min. Para evitar el aumento de temperatura durante la agitación, se colocó el recipiente conteniendo la mezcla en un baño de hielo.

b) Ultrasonido de alta intensidad: durante 20 minutos en un equipo de ultrasonido VIBRA CELL, VCX (Newtown, Connecticut, EE.UU.). La temperatura de la muestra no superó los $40 \pm 1^\circ \text{C}$, lo cual se controló por medio de un baño de agua a 15°C durante el tratamiento.

Tabla 12. Composición de las diferentes emulsiones conteniendo aceite esencial de naranja.

Formulaciones	Componentes (%p/p)						
	Aceite de Naranja	Agua	Capsul	Hi Cap	Trehalosa	Sacarosa	Malto-dextrina
TMD _{Capsul}	5,0	58,0	3,0	-	18,0	-	16,0
SMD _{Capsul}	5,0	60,0	3,0	-	-	16,0	16,0
TMD _{Hi Cap}	5,0	58,0	-	3,0	18,0	-	16,0
SMD _{Hi Cap}	5,0	60,0	-	3,0	-	16,0	16,0

III.2.2.2 Secado spray de las emulsiones

Las emulsiones se secaron por aspersión utilizando el mismo equipo descrito en la sección III.2.1.2.a. Las condiciones operativas del proceso de secado fueron: temperatura de entrada del aire de $175 \pm 3^\circ \text{C}$, temperatura de salida del aire $83 \pm 3^\circ \text{C}$, caudal de 8 mL/min, presión de aire 3,2 bar, diámetro de boquilla de 1,5 mm. Una vez obtenidos, los polvos se recolectaron en bolsas de PVDC que se sellaron herméticamente y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

III.2.2.3 Almacenamiento

Los polvos conteniendo aceite esencial de naranja se almacenaron durante 15 días a 25 °C en presencia de una solución saturada de LiCl (a 11% de HR). Luego 25 g de polvo se envasaron en viales de 25 mL que se sellaron herméticamente y se almacenaron a dos temperaturas, 25 y 37 °C. A determinados intervalos de tiempo (0, 3, 6 y 9 meses) de almacenamiento las muestras se retiraron para realizar las distintas determinaciones.

Los estudios de las propiedades físicas se realizaron entre 11 y 33 % HR, mientras que los almacenamientos en el tiempo a distintas temperaturas se realizaron a 11 % HR, se seleccionó esta HR para poder tener a todas las formulaciones en el estado vítreo a las temperaturas de almacenamiento.

III.2.2.4 Preparación de emulsiones reconstituidas

Para obtener emulsiones reconstituidas (ER) se realizó la rehidratación de los polvos con agua bidestilada conservando la relación original aceite esencial/agua. Las ER se sometieron a las mismas determinaciones realizadas sobre las emulsiones frescas.

III.3 Determinaciones

III.3.1 Caracterización y estabilidad de emulsiones

III.3.1.1 Reometría

Se determinó la viscosidad aparente de las fases dispersas, continuas y las emulsiones a partir de las respectivas curvas de flujo, cuyos puntos fueron obtenidos

empleando un viscosímetro Brookfield DV-LVT (Middleboro, MA, EE.UU.) con un sistema de cono y plato, a 25 °C. Se utilizó el cono de acero inoxidable CP41 de 4,8 mm de diámetro. Se aplicó un rango de velocidad de deformación de 0,5 a 120 s⁻¹. El volumen de las muestras fue de 2 mL. Todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado. Se obtuvieron los valores de esfuerzo de corte frente a las velocidades de deformación y a continuación los datos se ajustaron utilizando la ecuación de la ley de potencia (**Ecuación 9**).

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde:

τ es el esfuerzo de corte

$\dot{\gamma}$ es la velocidad de deformación

K es el coeficiente de consistencia

n es el índice de flujo

III.3.1.2 Distribución del tamaño de gota

El tamaño de las gotas de las emulsiones se midió utilizando un equipo de dispersión estática de luz Mastersizer 2000 con una unidad de dispersión Hydro 2000MU (Malvern Instruments Ltd, UK).

Para realizar una medición en este equipo se coloca un volumen pequeño de emulsión en un vaso de precipitado con agua bidestilada, luego un haz de radiación láser incide sobre una cubeta interna transparente por donde recircula la emulsión diluida. La luz dispersada en distintos ángulos por gotas de diferente tamaño pasa por un complejo sistema óptico e incide posteriormente sobre un arreglo de detectores obteniendo un patrón angular de luz dispersada (**Figura 30**). El software

incorporado en el equipo se encarga de traducir este patrón en la correspondiente distribución de tamaño de partícula.

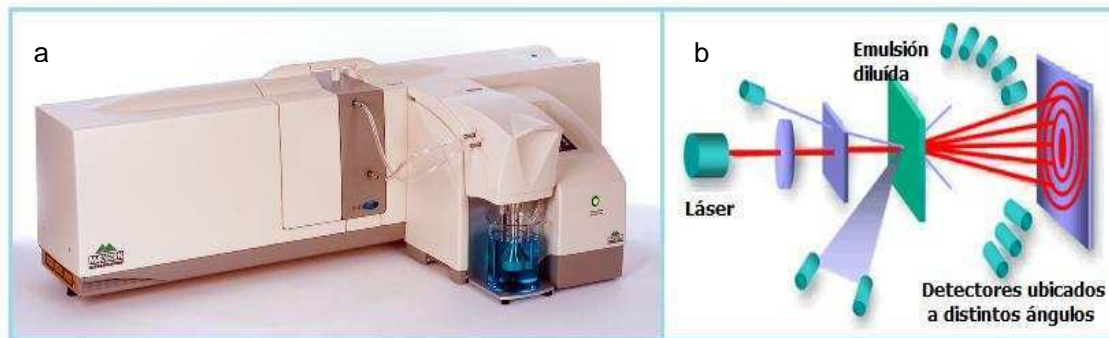


Figura 30. Equipo de dispersión estática de luz (a). Esquema de sus componentes (b).

Procedimiento

En este trabajo se determinó la distribución de tamaños de gota en volumen y número realizando el análisis inmediatamente después de la preparación de las emulsiones y cada 30 minutos durante 2 ó 3 horas, de acuerdo al caso. Para ello se vertieron alícuotas de cada muestra en la unidad de dispersión hasta alcanzar el grado de obscuración adecuado. La velocidad de la bomba se fijó en 1800 rpm. Se utilizaron un índice de refracción de la fase dispersa de 1,488, y su parámetro de absorción de 0,001.

El tamaño de gota de las emulsiones se informó como el diámetro promedio de volumen-superficie o diámetro de Sauter ($D_{3,2} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2}$) y el diámetro promedio de volumen equivalente o diámetro De Broucker ($D_{4,3} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3}$), donde n_i es el número de gotas de diámetro d_i (Huang y col., 2001; Leroux, y col, 2003). $D_{3,2}$ que es inversamente proporcional a la superficie específica de las gotas, representa una medida del diámetro promedio en donde se encuentran la mayoría de las gotas. $D_{4,3}$ es más sensible a los cambios relacionados con modificaciones en el tamaño de

partícula que involucran procesos de desestabilización (Relkin y Sourdet, 2005) y se utilizó para evaluar la estabilidad estructural (floculación o coalescencia).

El tamaño de las gotas se informa como el promedio y la desviación estándar de diez lecturas hechas en dos muestras de cada emulsión preparadas de forma independiente.

En otra serie de mediciones, se vertieron alícuotas de cada muestra en la unidad dispersora, que contenía una solución de sodiododecilsulfato (SDS) al 1,0 % (p/p). Las mediciones en presencia de SDS permitieron diferenciar los mecanismos irreversibles de desestabilización (coalescencia), evaluando el tamaño de las gotas individuales sin floculación (Anton y col., 2002).

III.3.1.2 Estabilidad

La estabilidad global de las emulsiones se analizó utilizando un analizador óptico vertical, Quick Scan (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

Este equipo permite evaluar la desestabilización global y establecer los diferentes mecanismos que la conducen, para emulsiones, suspensiones y espumas sin dilución y sin agitación, con tamaños de partícula comprendidos entre 0,05 a 5000 μm . Este equipo consta de una cabeza lectora que se mueve a lo largo de una celda cilíndrica de vidrio donde se almacena la muestra estacionariamente durante un cierto período de tiempo. La cabeza lectora es una fuente pulsante de radiación electromagnética en el infrarrojo cercano ($\lambda = 850 \text{ nm}$), conjuntamente con dos detectores sincrónicos: el de transmitancia que detecta la radiación transmitida a través de la muestra y el de backscattering que recibe la radiación dispersada por la muestra en una dirección de 135° respecto a la fuente (Pan y col., 2002). El principio

de medición del analizador óptico vertical, se basa en la teoría de dispersión múltiple de luz: los valores de transmitancia (T %) y de backscattering (BS %) dependen no sólo del diámetro de las gotas, sino también de la fracción volumétrica de la fase dispersa (ϕ) (Mengual y col., 2000). La cabeza lectora adquiere los datos de T y BS cada 40 μm a lo largo de la celda, realizando un barrido vertical de la emulsión contenida en la celda (**Figura 31**).

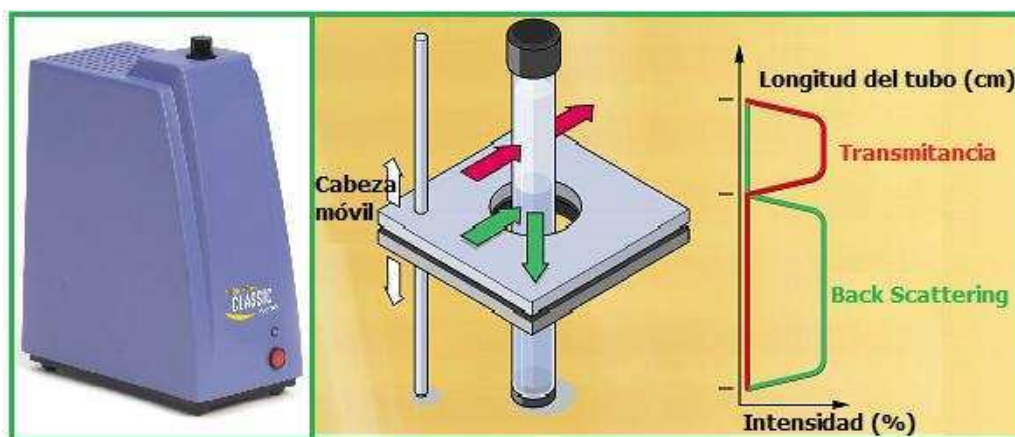


Figura 31. Representación esquemática del principio de funcionamiento del analizador óptico vertical.

Las emulsiones medidas se consideran estables cuando no hay cambio del tamaño de gota o concentración, los valores de BS (%) y T (%) se mantienen constantes y los perfiles se superponen. Por el contrario se consideran inestables cuando varía el tamaño de las gotas como consecuencia de la floculación o coalescencia, lo cual se visualiza como cambios en los valores de BS (%) y T (%) sobre toda la altura del tubo, o cuando hay migración de gotas (cremado o sedimentación) que inducen a un cambio en la fracción de volumen de las gotas en los extremos del tubo. La **Figura 32** resume estos dos fenómenos de desestabilización.

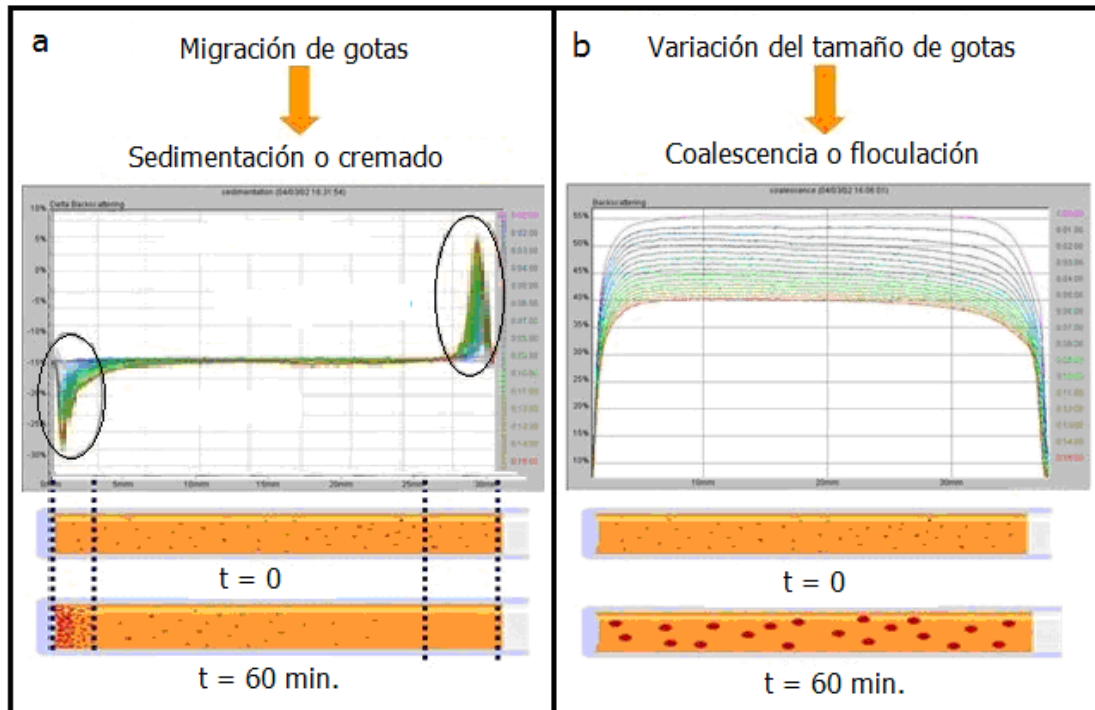


Figura 32. Perfiles mostrando los fenómenos de desestabilización de emulsiones debidos a migración de gotas (a) y a variación del tamaño de gotas (b) obtenidos empleando un analizador óptico vertical.

Procedimiento

Las emulsiones se colocaron en la celda de medición y la cabeza lectora proporcionó los perfiles de backscattering (BS %) y transmitancia (T %) cada 40 μm a lo largo de la celda, en función de la altura de la muestra en la celda (altura total = 10 cm), en condiciones de quiescencia, a 25 °C. Las mediciones se realizaron inmediatamente después de la preparación de la emulsión y cada 30 minutos durante 2 ó 3 horas de acuerdo al caso. Debido a la importancia del mantenimiento de la estabilidad de las emulsiones reconstituidas, que podrían ser utilizadas para diseñar bebidas conteniendo estas esencias, los datos también se registraron 24 hs después de la reconstitución.

III.3.1.3 Movilidad molecular

La movilidad molecular de los sólidos y el agua de las muestras se estimó mediante la determinación de los tiempos de relajación T_2 obtenidos por la técnica de resonancia magnética nuclear ($^1\text{H-NMR}$) resuelta en el tiempo. Se empleó un equipo Bruker Minispec mq20 de resonancia magnética nuclear (RMN) pulsada, con un campo magnético de 0,47 T que opera a una frecuencia de resonancia de 20 MHz. La celda de muestra está equipada con un sistema de control de temperatura enfriado con nitrógeno líquido que permite operar entre -100 y 80 °C.

El principio de esta técnica se basa en que cualquier núcleo con un número cuántico de espín distinto de cero, cuando se coloca en un campo magnético puede absorber y emitir energía a través de radiación electromagnética, que puede ser detectada por el instrumento. El núcleo ^1H , es el más utilizado, debido a la facilidad de observación, a su alta abundancia natural y al hecho de que se encuentra presente invariablemente en biomateriales.

El experimento de RMN consiste en inducir la transición entre niveles de energía correspondientes a la magnetización de núcleos atómicos. Luego de la excitación, los espines de los núcleos retornan al estado de equilibrio por procesos de transiciones no radiactivas, llamados en conjunto procesos de relajación. La señal obtenida de la recuperación o decaimiento es una característica de los procesos de relajación (Colquhon y Goodfellow, 1994).

Existen dos tipos importantes de procesos de relajación:

- *Relajación espín – red:* se realiza a través de interacciones de todo el conjunto de átomos de la muestra. Está caracterizada por un tiempo de relajación T_1 . Este tiempo está fuertemente afectado por la movilidad de la red. Cuando dos

núcleos vecinos se hallan en diferentes estados magnéticos de energía los campos magnéticos de los mismos pueden interactuar entre sí produciendo un intercambio de estados cuánticos. Como consecuencia de la interacción, el tiempo de vida promedio de un núcleo excitado se acorta.

- *Relajación espín – espín:* se realiza a través de núcleos vecinos, es un proceso de disminución exponencial de primer orden que se caracteriza con un tiempo de relajación T_2 . Para sólidos cristalinos o líquidos muy viscosos el fenómeno de relajación espín-espín es más eficiente y los tiempos son muy pequeños (10^{-4} s). Cuanto menor es la viscosidad de la muestra más largos son estos tiempos.

En las medidas de RMN pulsada, los núcleos que están en un intenso campo magnético, se someten periódicamente a pulsos muy cortos de una intensa radiación de radiofrecuencia (durante menos de 10 μ s). Los núcleos excitados, al relajarse emiten una señal de radiofrecuencia en el dominio del tiempo (**Figura 33**). El momento de espín nuclear de todos los protones de la muestra se representa por un único vector magnetización (M) que se puede descomponer en dos componentes, una paralela al eje z, (M_z), y otra en el plano xy, ($M_{x,y}$). En el campo magnético inicial el espín nuclear está orientado en la dirección del eje z siendo $M_{x,y}=0$ y $M_z=M_0$. La curva de decaimiento de la magnetización en el plano xy ($M_{x,y}$) que se produce luego de aplicar un pulso de radiofrecuencia de 90° es normalmente llamada decaimiento libre de la inducción (o FID por sus siglas en inglés) y puede ser descrita por la siguiente ecuación:

$$M_{xy} = M_0 e^{-\frac{1}{T_2}}$$

Ecuación 10

El parámetro $1/T_2$ es entonces la constante de decaimiento de una magnetización causada por un pulso de radiofrecuencia que produce un cambio de 90° en la posición del vector magnetización.

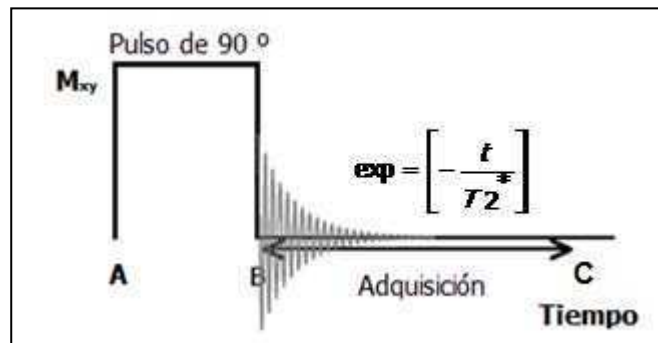


Figura 33. Señales de relajación de RMN después de un pulso RF de 90° aplicado a tiempo A. Duración del pulso: A-B. Adquisición de datos: B-C.

Si los tiempos de relajación son mayores que los microsegundos, cuando se emplea un único pulso a 90° se obtienen resultados inesperados. Después de la aplicación del pulso, la magnetización neta decae más rápidamente que la predicha por la **Ecuación 10**. Esto puede suceder debido a inhomogeneidad del campo, difusión, etc. Para evitar el efecto de inhomogeneidad del campo, se utilizan métodos de ecos de espín que consisten en la aplicación de varios pulsos sucesivos. Carr y Purcell (1954) propusieron un método de ecos de espín que luego fue modificado (Meiboom y Gill, 1958). Este método (secuencia de pulsos CPMG), utiliza un pulso de 90° seguido de una serie de pulsos a 180° y es el más comúnmente utilizado para la determinación de T_2 en sistemas de viscosidad media o baja.

Procedimiento

Las emulsiones se colocaron en tubos de vidrio de 10 mm de diámetro hasta una altura de 5 cm, luego se equilibraron a 25°C en un baño de agua termostático

(Haake Phoenex II C35P, Alemania) antes de realizar la medición. Las mediciones se realizaron a 25 °C.

Como las muestras presentaban un contenido de agua elevado, se utilizó la secuencia de pulsos CPMG. Las curvas de decaimiento se ajustaron a una ecuación biexponencial (**Ecuación 11**).

$$I = A_1 e^{(-t/T_{2-1})} + A_2 e^{(-t/T_{2-2})} \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde: I es la intensidad de la señal de RMN al tiempo t. El tiempo de relajación T_{2-1} corresponde a los protones de la fracción menos móvil. A_1 es proporcional a la cantidad de protones en el estado representado por T_{2-1} . T_{2-2} corresponde al tiempo de relajación de los protones de la fracción más móvil y A_2 es proporcional al número de protones en el estado T_{2-2} .

III.3.1.4 Análisis estadístico

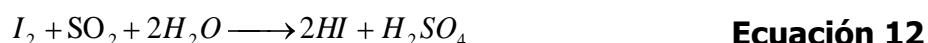
Las diferencias significativas entre las propiedades de las emulsiones se determinaron mediante análisis de varianza (ANOVA). Se utilizó un nivel de significación alfa de 0,05 ($p < 0,05$). Para estos procedimientos se trabajó con el software InfoStat v2011e.

III.3.2 Caracterización de los polvos

III.3.2.1 Contenido de agua

El contenido de agua se determinó por el método de Karl Fisher (KF). Se empleó un titulador volumétrico Mettler Toledo DL 31 (Schwerzenbach, Suiza).

La valoración KF se basa en la reacción que se describe en la **Ecuación 12**, donde se observa que utilizando un medio no acuoso y un exceso de dióxido de azufre (el cual forma el ión sulfito que a su vez oxida al yodo) se puede desplazar el equilibrio de la reacción hacia la derecha, neutralizando los ácidos que se forman, y así determinando la cantidad de agua presente en la solución.



Procedimiento

Se aplicó la técnica de un solo componente con el reactivo Hydranal® Titrant Composite 5 de Riedel-de Haën (Darmstadt, Alemania). Se utilizaron como solventes, metanol puro o una mezcla de metanol:formamida 95 (1:1) Merck (Darmstadt, Alemania). Las mediciones se realizaron a 25 °C. Los tamaños de muestra analizados fueron de aproximadamente 100 mg y la desviación estándar se calculó a partir de tres mediciones repetidas de la misma muestra.

III.3.2.2 Transiciones vítreas

Las transiciones vítreas se determinaron por calorimetría diferencial de barrido (DSC). Se empleó un calorímetro diferencial de barrido Mettler Toledo modelo DSC 822e (Schwerzenbach, Suiza).

La calorimetría diferencial de barrido detecta la transición vítrea en base al cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p). La muestra se calienta a una velocidad constante en una cápsula sellada, y en general se utiliza una cápsula vacía como referencia. El instrumento registra las diferencias en el flujo de calor entregado por el

equipo a la muestra y a la referencia en función de la temperatura y del tiempo. En la **Figura 34** se muestra un termograma típico (obtenido por DSC) que muestra la transición vítrea, indicando el comienzo, el punto medio y el final de la misma. El ΔC_p en la transición vítrea, se evidencia como un cambio en la línea de base del termograma.

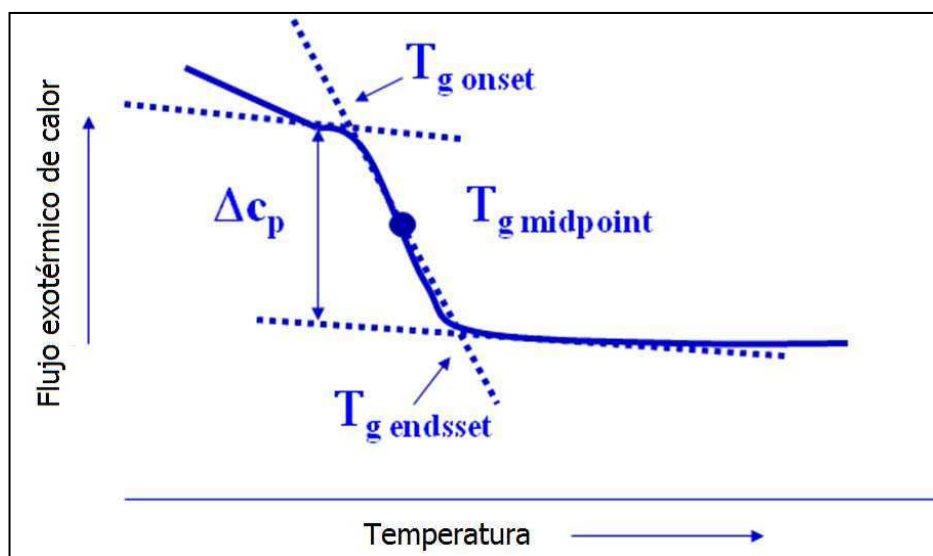


Figura 34. Termograma típico obtenido por DSC mostrando la transición vítrea.

Procedimiento

El instrumento se calibró con indio (156,6 °C), plomo (327,5 °C) y zinc (419,6 °C). La muestra se colocó en una cápsula de aluminio de 40 μ L herméticamente cerrado (una cápsula vacía y perforada se empleó como referencia). Todas las mediciones se realizaron a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min y los termogramas se evaluaron utilizando el programa Mettler Star^e. Se informó un valor promedio de al menos dos réplicas. La desviación estándar para la medición de temperatura de transición vítrea fue de ± 1 °C.

III.3.2.3 Movilidad molecular

La movilidad molecular de los sólidos y el agua de las muestras se estimó mediante la técnica de resonancia magnética nuclear ($^1\text{H-NMR}$) resuelta en el tiempo, utilizando el mismo equipo descrito anteriormente en la sección III.3.1.4

Procedimiento

Los tiempos de relajación espín-espín asociados a los sólidos y al agua que interactúa fuertemente con ellos se midieron en los polvos utilizando el método de decaimiento libre de la inducción (FID) luego de aplicar un pulso de 90° . Las determinaciones se realizaron en un rango de temperaturas entre 15 y 45°C cada 5°C . Los polvos se colocaron en tubos de vidrio de 10 mm de diámetro hasta una altura de 5 cm, luego se equilibraron a diferentes temperaturas ($15\text{-}45^\circ\text{C}$) en un baño de agua termostático (Haake Phoenix II C35P, Alemania) antes de realizar las mediciones.

Las curvas de decaimiento se ajustaron mediante la **Ecuación 13** a un comportamiento mono-exponencial.

$$I = Ae^{(-t/T_{2\text{FID}})} \quad \text{Ecuación 13}$$

Donde: I es la intensidad de la señal de los protones, $T_{2\text{FID}}$ es el tiempo de relajación de los protones (T_2) que forman parte de los sólidos de la muestra y del agua íntimamente unida a los sólidos y A es un parámetro relacionado con la intensidad de la señal.

Dado que los núcleos no se reorientan con un pulso de 180° , los tiempos de relajación espín-espín obtenidos serían tiempos de relajación aparentes, es decir T_2^* .

Sin embargo, para muestras sólidas (como las determinadas en este trabajo), podemos considerar que el T_2 intrínseco está muy cerca al T_2^* , como fue sugerido por Fullerton y Cameron (1998). Por lo tanto, se utilizó T_2 por conveniencia.

III.3.2.4 Microscopía electrónica de barrido

Las características microestructurales de los polvos conteniendo aceite de naranja encapsulado se analizaron por microscopía electrónica de barrido (SEM) utilizando un microscopio Zeiss Supra 40 (Alemania).

Las muestras se colocaron en un soporte de aluminio, utilizando el apoyo de una cinta adhesiva bifaz de carbón conductor y luego se recubrieron con nanopartículas de oro (Cressington Scientific Instruments 108 Sputter Coater).

Las imágenes se tomaron con el detector dentro de la lente, utilizando un voltaje de aceleración de 3,00 kV.

III.3.2.5 Análisis estadístico

Las diferencias significativas entre las propiedades de los polvos se determinaron mediante análisis de varianza (ANOVA), análogamente a lo explicado en III.3.1.5.

III.3.3 Análisis de volátiles

III.3.3.1 Determinación de etanol

Se determinó la concentración de etanol empleando el kit enzimático Ethyl Alcohol, Roche Diagnostics Cobas[®] (Mannheim, Alemania). Este método se basa en la oxidación del etanol a acetaldehído en presencia de la enzima alcohol

deshidrogenasa (ADH) nicotinamida/adenina dinucleótido (NAD) (**Ecuación 14**). El NADH formado durante la reacción, medido espectrofotométricamente a través de los cambios en la absorbancia a 342 nm, es directamente proporcional a la concentración de etanol.



Procedimiento

Se confeccionó una curva de calibración preparando soluciones de concentraciones crecientes y perfectamente conocidas, en un rango de 0,01 a 5,00 mg de etanol por mL de solución empleando agua bidestilada. Este rango de concentraciones se seleccionó porque en cada tubo se esperaba que hubiera 0,3 mg de etanol inicial por mL de solución. Se utilizaron como reactivos y soluciones de trabajo: a) tampón y conservantes (reactivo 1). NAD: ≥ 3 mmol/L; b) ADH (EC 1.1.1.1; levadura; 25°C): ≥ 37 U/mL (617 $\mu\text{kat/L}$); y c) estabilizadores y conservantes (reactivo 2).

En un tubo de ensayo se colocaron 400 μL del reactivo 1 y 400 μL del reactivo 2. El tubo se mezcló por agitación y se colocó en un baño de agua a 37 °C durante 5 minutos. Luego se adicionaron 80 μL de muestra (polvos reconstituidos a su volumen original en agua bidestilada) y se realizó una incubación a 37 °C durante exactamente 1 minuto. Inmediatamente se leyó la absorbancia de la solución a 342 nm (A_1). Seguidamente se retomó la incubación por exactamente otro minuto y se volvió a medir la absorbancia (A_2) a 342 nm. Empleando la **Ecuación 15** se calculó la absorbancia.

$$A = (A_2 - A_1) \quad \text{Ecuación 15}$$

Obtenidas las lecturas de absorbancia de los patrones y la muestra, se obtuvo la recta de regresión y a partir de la ecuación de dicha recta se calculó la concentración de etanol en la muestra (**Ecuación 16**).

$$y = a x + b$$

Ecuación 16

En donde:

y = absorbancia medida a 342 nm

x = concentración de etanol

Las diferencias significativas entre las propiedades de los polvos conteniendo etanol encapsulado se determinaron mediante análisis de varianza (ANOVA), análogamente a lo explicado en III.3.1.5.

III.3.3.2 Determinación de citral

III.3.3.2.a Cromatografía gaseosa

El citral es una mezcla de dos compuestos volátiles químicamente bien definidos, el isómero trans conocido como geranial y el isómero cis conocido como neral. Por lo tanto se pudo emplear una metodología de preparación de muestra sencilla y rápida como lo es la extracción con solventes, para luego cuantificar los volátiles por cromatografía de gases.

Preparación de la muestra: Extracción de citral

Se pesaron exactamente alrededor de 0,2000 g de polvo en un vial de vidrio de 10 mL con tapa y se adicionaron 3 mL de agua destilada. La mezcla se agitó en un agitador vortex por 3 minutos y luego se sonicó a 35 °C por 30 minutos. A

continuación se agregaron 2 mL de hexano puro a esa suspensión. Se agitó en agitador magnético por 3 minutos y se centrifugó 5 minutos a 3500 rpm. Luego, se colectó la fase oleosa en un matraz de 25 mL. Este procedimiento se repitió 4 veces. La última extracción, la cuarta, se realizó en ampolla de decantación, separándose la fase superior y su interfase que luego se desecaron con sulfato de sodio anhidro. El sulfato de sodio anhidro se lavó con hexano y se incorporó al matraz de 25 mL. Antes de llevar a volumen, se agregó 1 mL de solución de linalol (concentración= 25 mg/mL) empleado como estándar interno. Se llevó a volumen con hexano. Esta solución se inyectó en el cromatógrafo.

Análisis por cromatografía gaseosa (GC-FID)

Los componentes del citral se analizaron por cromatografía de gases usando un cromatógrafo Varian 3400 Cx con un detector de ionización de llama (FID). Se empleó una columna capilar de sílice fundido con una fase estacionaria de 5% fenil-95% dimetilpolisiloxano (DB-5, J&W Scientific), de 60 m x 0,25 mm de diámetro y 25 µm de espesor de fase estacionaria. Las condiciones programadas fueron: temperatura del horno desde 75 hasta 210 °C, rampa de 3 °C/min, temperatura del inyector 250 °C, temperatura del detector 260 °C. Como gas carrier se utilizó nitrógeno. Todos los análisis se llevaron a cabo por duplicado para cada muestra. El contenido de los componentes de citral (neral y geranial) se calculó por el método de estándar interno (linalol).

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente a través de un análisis de varianza (ANOVA) y por la aplicación del método de Student–Neuman–Keuls (SNK) $p < 0,05$, con el fin de determinar si existían diferencias significativas entre las

formulaciones. Se utilizó el programa SPSS versión 20.0, IBM Corp., Armonk, NY, EE.UU.).

III.3.3.2.b Evaluación sensorial

Evaluación discriminativa entre las diferentes formulaciones

Se evaluaron las diferentes formulaciones secadas por spray con el fin de determinar si se percibían en forma similar, con lo cual se podría inferir que las formulaciones habrían retenido el aroma encapsulado en forma análoga. Con este fin, se utilizó el método de comparación por pares con elección forzada (2-AFC test; ASTM 1977). El panel estuvo integrado por 30 asesores no entrenados (7 hombres, 23 mujeres, 21 a 23 años de edad, estudiantes de grado de la carrera de Ingeniería de Alimentos de la Facultad de Ciencias Agrarias, Pontificia Universidad Católica, Argentina). Los asesores evaluaron las cuatro formulaciones descritas en la **Tabla 11**. Se le presentaban dos muestras (15 mL) contenidas en frascos de vidrios cerrados, codificados con tres dígitos (35 mL de capacidad, apertura de 3 cm de diámetro), y su tarea consistía en olfatear el aroma contenido en el espacio de cabeza y elegir la muestra de mayor intensidad aromática.

Antes de la evaluación se realizaron varias diluciones de las muestras en un rango entre 0,00125 y 0,05 mg/ 100 mL en agua con el fin de encontrar la concentración adecuada de trabajo para que no sature los receptores olfatorios. Una vez hallada la concentración óptima, 0,0025 mg/ 100 mL, las formulaciones diluidas se colocaron en frascos de vidrio y se dejaron equilibrar entre las fases líquida y gaseosa por cuatro horas para la evaluación posterior.

Las pruebas se efectuaron en cabinas individuales a una temperatura de 22 ± 2 °C, con un sistema de iluminación con luz blanca (6500 K). El nivel de significación de la prueba de comparación de pares se calculó mediante la prueba binomial ($\alpha = 0,05$; dos colas; valor crítico = 21) basada en el número de muestras de mayor intensidad aromática respecto del total de muestras evaluadas.

Evaluación de la intensidad de citral encapsulado

La intensidad aromática de las muestras de citral encapsulado se midió con un panel entrenado utilizando una escala no estructurada de 15 cm (Meilgaard y col., 1999). Un panel de 12 asesores (mujeres, 21 a 23 años de edad, que habían participado en la evaluación por pares) fue entrenado (dos sesiones, de media hora cada una) para evaluar la intensidad de las soluciones del aroma citral. Se hicieron diluciones (0,04; 0,11; 0,33 y 0,98 mg/100 mL) de las emulsiones, utilizando como estándar de referencia la dilución de 0,33 mg/100 mL, que tenía un valor de 8 en la escala no estructurada (línea de 15 cm).

La intensidad del aroma de las emulsiones reconstituídas, provenientes de los polvos resuspendidos (**Tabla 11**) (0,0025 mg/ 100 mL, la misma dilución empleada en la prueba de comparación pareada) se evaluó por triplicado (cuatro sesiones).

Se realizó una curva de calibración empleando soluciones de citral y la intensidad del aroma citral en las formulaciones se calculó a partir de esta curva. Cada asesor evaluó por sesión una de las soluciones del polvo reconstituido y las cuatro concentraciones de citral, con un intervalo de 10 minutos entre repeticiones. La evaluación se realizó en las mismas condiciones que la prueba de comparación por pares.

Los datos obtenidos de la intensidad del citral se analizaron estadísticamente a través de un análisis de varianza (ANOVA), en el cual la concentración de las soluciones de citral y las repeticiones se consideraron factores fijos, y los evaluadores un factor aleatorio. Para determinar las diferencias ($p < 0,05$) entre las formulaciones se compararon las medias con la prueba de Student–Neuman–Keuls (SNK) y se calculó el error estándar. Se utilizó el programa SPSS versión 20.0, IBM Corp., Armonk, NY, EE.UU.).

La retención de citral (% p/v) se calculó teniendo en cuenta que el polvo secado por spray en dilución 0,05 % tenía una concentración teórica de 6,25 mg citral/100 mL.

III.3.3.3 Determinación de aceite esencial de naranja

III.3.3.3.a Cromatografía gaseosa

Preparación de la muestra: microextracción en fase sólida (SPME)

En el presente trabajo los constituyentes volátiles del aroma de naranja encapsulado se aislaron mediante la técnica de de microextracción en fase sólida (referida como SPME, del inglés Solid Phase Micro Extraction), ampliamente desarrollada por Pawliszyn y colaboradores para la extracción de volátiles orgánicos en solución (Arthur y Pawliszyn, 1990; Zhang y Pawliszyn, 1993). Se empleó esta técnica dado que es ideal para recuperar los volátiles constituyentes en el espacio de cabeza de aromas complejos ya que tiene un alto poder de separación y una alta sensibilidad. Este sistema de toma de muestra es similar al proceso de olfacción puesto que los compuestos volátiles se concentran en el espacio de cabeza y

adsorben sobre la fibra de modo similar a lo que ocurre en la nariz y los receptores olfatorios.

La técnica de SPME extrae y concentra los analitos directamente en una fibra o fase estacionaria que incluye un tipo o más de polímeros extractantes (Arthur y Pawliszyn, 1990; Yang y Peppard, 1994; Jetty y col., 2007). El método es rápido, fácil de aplicar, de bajo costo y no requiere del uso de disolventes orgánicos, permitiendo analizar los volátiles tal cual se encuentran en la muestra. Se emplea combinado con cromatografía de gases (GC) y cromatografía de gases acoplada a detector de espectrometría de masas (GC-MS). Esta técnica ha sido muy aplicada, en un amplio rango de compuestos volátiles y semi volátiles, al análisis de aromas en alimentos (Verhoeven et al., 1992; Steffen y Pawliszyn, 1996 y Jordán y col., 2001).

La técnica de SPME se basa en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida de 10 mm, de muy pequeñas dimensiones, recubierta por un sorbente de 80-100 μm (generalmente polimérico). Dado el pequeño tamaño de la fibra y su geometría cilíndrica se la utiliza incorporada a una jeringa retráctil para facilitar su manipulación y proteger la fibra cuando no se utiliza (**Figura 35**).

Esta técnica consta de 2 etapas principales: una etapa de extracción y una de desorción. Durante la extracción se produce la migración de los analitos desde la muestra a la fibra hasta que se alcanza la situación de equilibrio. Este proceso de extracción se puede producir por adsorción (si la fibra toma los volátiles del espacio de cabeza) o absorción (si la fibra se sumerge en la matriz líquida de la muestra).

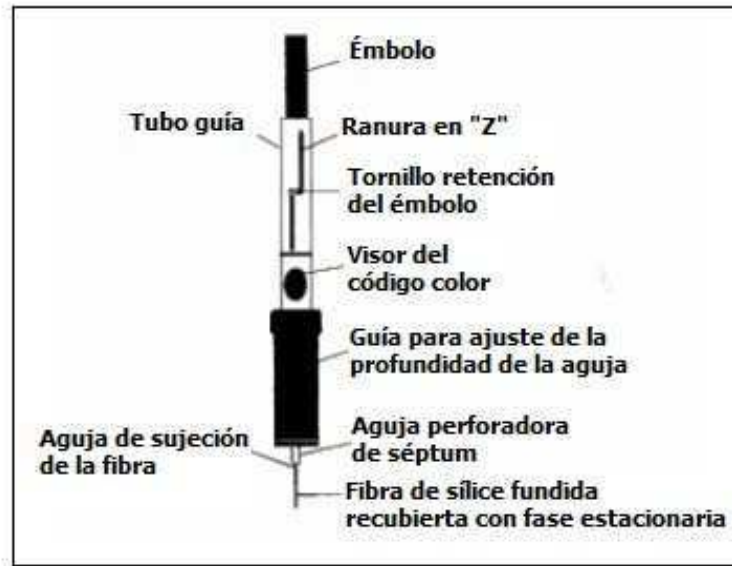


Figura 35. Descripción de la jeringa soporte de una fibra de SPME

Para el proceso de extracción con SPME descrito en la **Figura 36**, se coloca un volumen de muestra en un vial herméticamente cerrado con un septum de silicona o teflón. Seguidamente se perfora el septum y se introduce la jeringa en el vial. Empujando el émbolo se expone la fibra a la muestra la cual permanece expuesta el tiempo que la técnica determine en cada caso. Una vez finalizado el tiempo de extracción, se devuelve la fibra al interior de la jeringa y la etapa de desorción se lleva a cabo en el puerto de inyección del cromatógrafo.

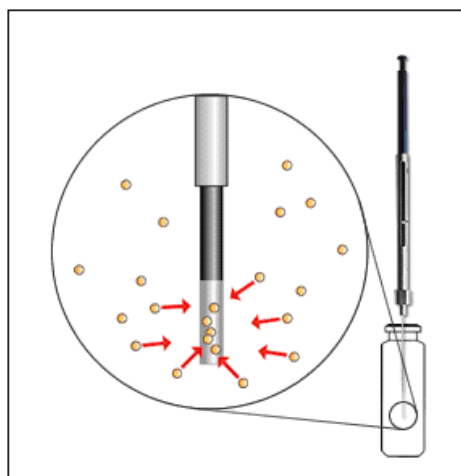


Figura 36. Proceso de extracción con SPME

Tipo de fibra empleada

De acuerdo con las características de los componentes a analizar, en este trabajo se ha utilizado una fibra con recubrimiento polimérico de polidimetilsiloxano (PDMS), de 100 μm de espesor de film (Supelco, Bellefonte, USA) y cuya naturaleza apolar resulta específica para volátiles de bajo peso molecular. Previamente a la utilización, la fibra se acondicionó mediante su introducción en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases a una temperatura de 250 °C, durante 1 hora, con el fin de eliminar posibles interferentes adsorbidos por la fibra del medio ambiente.

Condiciones empleadas para el aislamiento de volátiles

La elección de los parámetros utilizados en el aislamiento de volátiles mediante la técnica de SPME se basó en los parámetros optimizados por Jordán y col., 2001. La estandarización de estos parámetros permitió la obtención de datos comparables entre repeticiones.

Parámetros de la extracción

a) *Tamaño de muestra:* Se probaron distintas cantidades y se decidió utilizar 567 ± 10 mg de polvo conteniendo aceite esencial de naranja encapsulado y 165 ± 10 μL de agua. El tamaño de muestra utilizado por Jordán y col. (2001) resultó demasiado grande para la sensibilidad del método empleado en este trabajo.

b) *Preparación de muestra:* en un vial de 18 mL se colocaron el polvo conteniendo el aroma encapsulado y el agua. Luego se adicionaron 20 μL de linalol como estándar interno y una solución saturada de NaCl en una proporción del 36 % en volumen con relación a la muestra analizada, para aumentar la fuerza iónica y

ayudar a la liberación de volátiles de la matriz líquida reconstituida. Por último se colocó una barra magnética, se tapó el vial y se sometió a agitación mediante el uso de un agitador magnético durante 5 min, a fin de lograr la correcta reconstitución de los polvos.

c) *Agitación y temperatura:* El aumento de temperatura y la agitación se utilizaron para favorecer la expulsión de los volátiles desde la matriz líquida a la fase gaseosa. El vial conteniendo la muestra preparada se introdujo en el baño de ultrasonido a 40 °C durante 30 minutos, con la ayuda de un dispositivo como el que se presenta en la **Figura 37** compuesto por un soporte y una agarradera.

d) *Tiempo de exposición de la fibra al espacio de cabeza:* el tiempo necesario para absorber los volátiles que se liberaron de la matriz líquida reconstituida fue de 30 minutos. Pasado ese tiempo, se retrajo la fibra y se extrajo el dispositivo del vial.

e) *Tiempo de desorción en el puerto de inyección del cromatógrafo:* el dispositivo se colocó en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases, que se encontraba calefaccionado a 250 °C, durante 0,6 minutos para la desorción de los volátiles. Éstos entraron en la columna para su separación y detección.



Figura 37. Sistema de microextracción en fase sólida.

Cromatografía gaseosa (GC-MS)

Para el análisis cuali-cuantitativo de los compuestos odorantes por GC-MS se trabajó con un cromatógrafo de gases, Perkin Elmer GC modelo Clarus 500, provisto de un único inyector tipo split/splitless conectado con un divisor de flujos a dos columnas capilares de sílice fundido: 1) polietilenglicol de PM aproximado de 20.000 (DB-Wax, J&W Scientific) y 2) 5% fenil-95% dimetilpolisiloxano (DB-5, J&W Scientific), ambas de 60 m x 0,25 mm de diámetro y 0,25 μm de espesor de fase estacionaria. La columna polar se encontraba conectada a un detector FID (detector de ionización en llama) mientras que la columna no polar a un detector FID y a un detector de masas cuadrupolar (70 eV), a través de un sistema de venteo (MSVent™) (**Figura 38**).

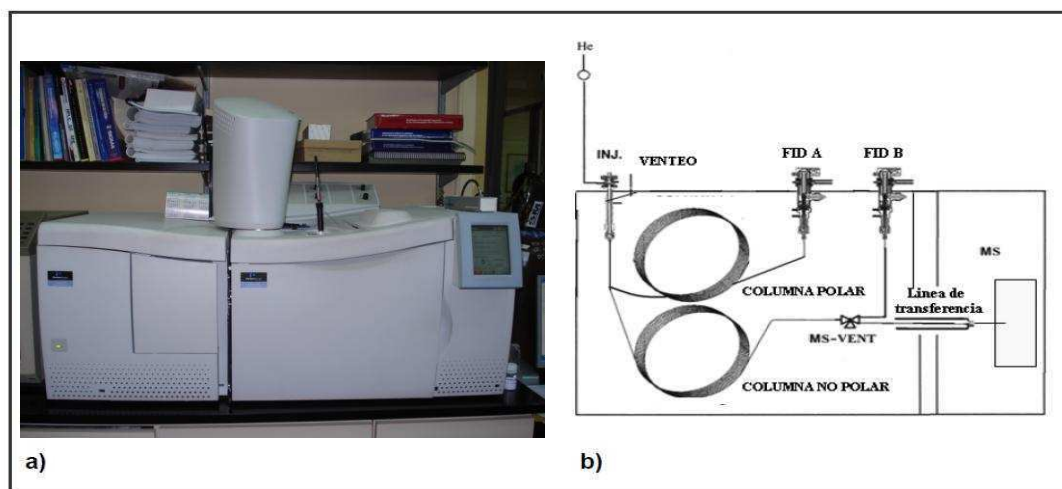


Figura 38. Cromatógrafo de gases (a). Esquema del GC-FID-MS (b).

Las condiciones analíticas empleadas en el GC-FID-MS fueron: programación de temperatura: 40 °C (3 min), luego a 3 °C/min hasta los 153 °C manteniéndose durante 0,33 min; temperaturas de inyector y detectores FID: 250 °C ; temperatura de la línea de transferencia: 180 °C; temperatura de la fuente de iones: 150 °C; tiempo total de corrida: 41 min; fase móvil: Helio a 1,87 mL/min; inyector en modo

splitless; tiempo de desorción en el puerto de inyección: 0,6 minutos y rango de masas escaneado: 40 - 400 Da.

Identificación de volátiles: fue realizada por comparación de los espectros de masa con los de la base de datos computarizada (Adams, 2007; Wiley/NIST Mass Spectral Library, 2008) y los obtenidos con los estándares propios y la determinación de sus índices de retención en las dos columnas utilizadas mediante la inyección de una serie homóloga de alcanos (C6 a C24) en las mismas condiciones operativas.

Cuantificación

La cuantificación se realizó teniendo en cuenta el contenido total de aceite de naranja y los constituyentes del aceite esencial retenidos por las diferentes formulaciones.

a) Retención del contenido total de aceite esencial de naranja

A fin de calibrar y calcular la cantidad de aceite esencial retenido, se utilizó el limoneno (un componente relevante del aroma) como marcador del aceite esencial de naranja debido a que los volátiles mayoritarios de este aceite son terpenos.

La cantidad de aceite esencial de naranja retenido por las diferentes formulaciones se calculó a través del contenido de limoneno, por el método de estándar interno de manera de poder construir una curva de calibración.

Se preparó una solución de aceite esencial de naranja en acetato de etilo adicionada de limoneno (concentración= 2,5 mg/mL) y del estándar interno, linalol (concentración= 25 mg/mL). Se graficó la relación de concentración limoneno/linalol versus la relación de las áreas limoneno/linalol obtenidas por GC y se obtuvo la siguiente ecuación: $y = 13,704x$ ($R^2 = 0,999$). Empleando la ecuación de la curva se

determinó el contenido de aceite esencial de naranja retenido por las diferentes formulaciones luego del secado y en las distintas condiciones de almacenamiento

b) Retención de los constituyentes volátiles del aceite esencial de naranja

La cuantificación de los constituyentes volátiles del aceite esencial de naranja retenido por las diferentes formulaciones se calculó de la misma forma en que se evaluó el contenido total de aceite esencial de naranja.

Se realizaron cuatro curvas de calibración (**Figura 39**) empleando soluciones de los componentes de la fase continua de las cuatro formulaciones con la adición de limoneno. Las soluciones se prepararon de la misma forma que las muestras. De esta manera, cualquier interferencia de la matriz fue compensada y así se evitó una lectura errónea de los resultados obtenidos.

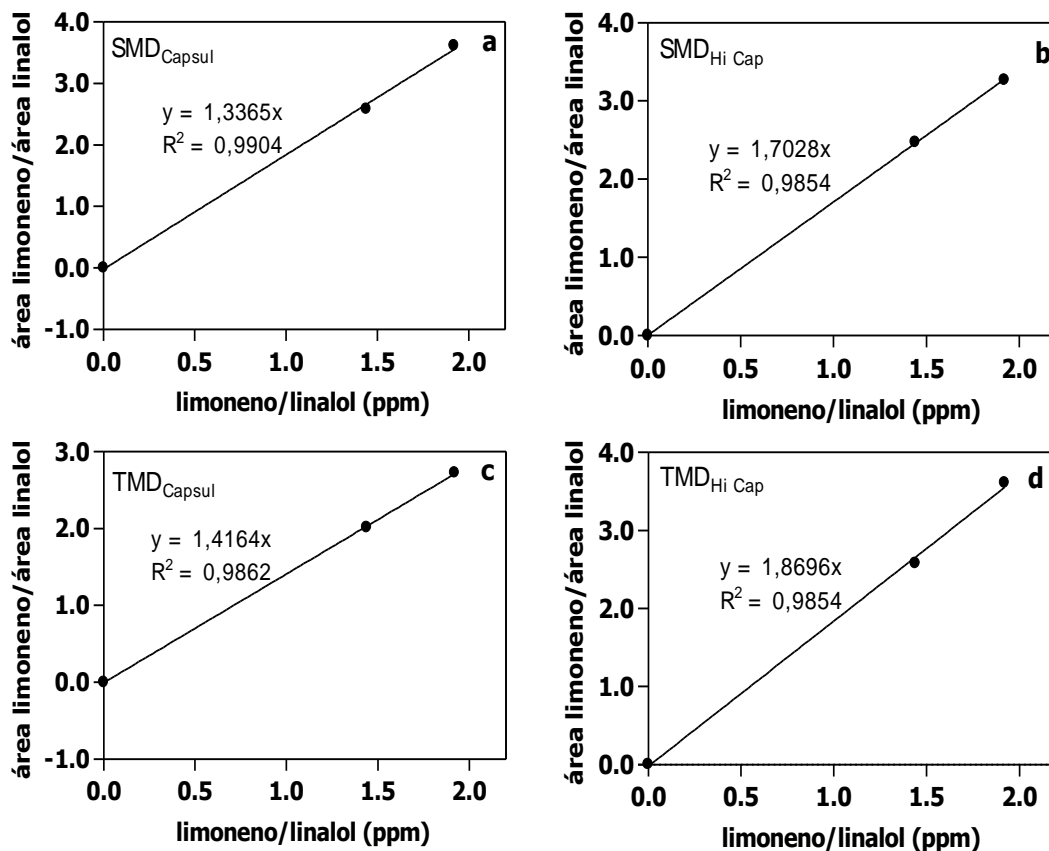


Figura 39. Curvas de calibración empleadas en la valoración de compuestos volátiles del aceite esencial de naranja utilizando soluciones de las diferentes fases continuas: SMD_{Capsul} (a), SMD_{Hi Cap} (b), TMD_{Capsul} (c) y TMD_{Hi Cap} (d).

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente a través de un análisis de varianza (ANOVA) y por la aplicación del método de Student–Neuman–Keuls (SNK) $p < 0,05$, con el fin de determinar si existían diferencias significativas entre las formulaciones. Se utilizó el programa SPSS versión 20.0, IBM Corp., Armonk, NY, EE.UU.).

III.3.3.3.b Evaluación sensorial

Panel

El panel estuvo integrado por 25 asesores (20 mujeres y 5 hombres con edades comprendidas entre 22-25 años) estudiantes de la Facultad de Ciencias Agrarias, Pontificia Universidad Católica Argentina (UCA), quienes fueron entrenados en evaluación de aromas de naranja.

Entrenamiento en el reconocimiento e identificación de aromas de naranja

El entrenamiento del panel consistió en la realización de pruebas discriminativas (test del triángulo), generación de atributos descriptivos, identificación de atributos utilizando estándares y matching de aromas.

- Evaluación discriminativa (test del triángulo)

Con el fin de que los evaluadores detectaran diferencias entre los aromas de las distintas muestras se realizó el test del triángulo- caracterización de la diferencia (ASTM, 1977). Esta prueba consiste en presentar a cada asesor tres muestras codificadas, indicándole que dos son iguales y una es diferente, teniendo

que identificar la muestra distinta. Además, se les requirió información adicional solicitándoles que describieran la muestra diferente. Se presentaron igual número de las seis combinaciones posibles (ABB, BAA, AAB, BBA, ABA y BAB), balanceando la presentación entre los evaluadores. Como la prueba es de elección forzada, aunque no encuentren diferencias están obligados a elegir por azar. De esta forma, se elimina, el error por indecisión del evaluador.

Se compararon las cuatro formulaciones iniciales, realizando por lo tanto, seis triángulos cada evaluador. Los polvos conteniendo el aceite esencial de naranja encapsulado fueron reconstituidos a su volumen original y 1 mL de este aroma en polvo reconstituido se colocó en frascos de vidrio color marrón con tapa (100 mL de capacidad, con una boca de 2,5 cm de diámetro) codificados con números aleatorios de tres cifras. La evaluación se llevó a cabo en las mismas cabinas empleadas en la sección III.3.3.2.b.

Además, se les solicitó a los asesores que eligieran descriptores que diferenciaran a las muestras evaluadas. A partir de esta prueba se seleccionaron los atributos de mayor frecuencia de mención para la preparación de algunos de los estándares aromáticos para el entrenamiento de los asesores.

- Identificación de atributos mediante el uso de estándares

Se prepararon distintos estándares aromáticos (**Tabla 13**) teniendo en cuenta los descriptores propuestos por los asesores en la prueba anterior, y a estándares empleados en un trabajo que analiza los perfiles aromáticos de aromas de naranja encapsulados (Galmarini y col., 2007).

Tabla 13. Definición de los atributos y receta de los estándares utilizados por el panel para describir el perfil aromático de naranja.

Atributo	Receta	Definición
Naranja fresca	Papel de filtro embebido en aceite de naranja fresca (Saporiti, Arg.), colocado en frasco de vidrio con tapa.	Aroma evocativo del jugo natural de naranja recién exprimido.
Jugo en polvo	50 g de jugo en polvo naranja dulce (Tang) reconstituido en 100 mL de agua destilada.	Evocativo del jugo en polvo reconstituido.
Cítrico	Papel de filtro embebido en aceite esencial de Gamma Terpenos ("Gamma Terpenos", IFF) colocado en frasco de vidrio con tapa.	Asociado a un fuerte y penetrante aroma cítrico.
Vitamina C	Vitamina C sabor naranja (Redoxón, Argentina).	Relacionado al aroma de complejos vitamínicos.
Limón	Papel de filtro embebido en aceite esencial de citral (Saporiti, Argentina) colocado en frasco de vidrio con tapa.	Asociado a un fuerte y penetrante aroma cítrico.
Plástico	Jugo de naranja calentado 2 min en microondas en un recipiente plástico.	Aroma asociado a recipientes plásticos.
Pino	Papel de filtro embebido en aceite esencial de mirceno (Firmenich, Argentina), colocado en frasco de vidrio con tapa.	Aroma asociado a pino.
Frutado	Sin estándar	Aroma asociado a fruta.
Floral	Papel de filtro embebido en dodecanol, colocado en un frasco de vidrio con tapa.	Aroma asociado a flores/fruta verde.
Pegamento	Papel de filtro embebido en acetato de etilo, colocado en un frasco de vidrio con tapa.	Aroma asociado al pegamento.
Cáscara	Papel de filtro embebido en limoneno (Ledema, Argentina) colocado en un frasco de vidrio con tapa.	Aroma asociado a la cáscara de naranja.
Madera	Papel de filtro embebido en aceite esencial de naranja valenciana (Ledema) colocado en un frasco de vidrio con tapa.	Sugerente del olor a corteza.
Pungente	Sin estándar	Sensación de picazón en la mucosa olfativa.
Naranja verde	Sin estándar	Característico de la naranja inmadura.
Naranja madura	Sin estándar	Aroma relacionado con la naranja madura.
Mermelada de naranja	Jugo y cáscara de naranja con azúcar cocidos a baño maría durante 60 minutos.	Aromas asociado a mermelada de naranja.
Cocido	Papel de filtro embebido en aroma cocido (Firmenich, Argentina), colocado en frasco de vidrio con tapa.	Aroma asociado a la naranja dulce cocida/mermelada.
Mandarina	5 g de jugo en polvo mandarina (Clight) reconstituidos en 100 mL de agua destilada.	Aromas relacionados al jugo de mandarina.
Caramelo	Sin estándar	Aroma asociado al caramelo de naranja.
Solvente	Papel de filtro embebido en acetona, colocado en un frasco de vidrio con tapa.	Aroma asociado a solvente, quitaesmalte
Pomelo	5 g de jugo en polvo pomelo (Clight) reconstituidos en 100 mL de agua destilada.	Aromas relacionados al jugo de pomelo.

Los estándares les fueron presentados a los evaluadores para que identificaran los aromas y los asociaran con el nombre de cada descriptor. Esta prueba se realizó durante tres sesiones con el fin de memorizar los aromas.

- Matching

El test de matching es una prueba que se realiza para explorar si los asesores han sido bien entrenados (Meilgaard y col., 1999). En este caso aplicado a la identificación de aromas, se determinó si los asesores podían identificar los aromas de los estándares que habían estado memorizando. Esta prueba consiste en encontrar el par correspondiente entre dos sets de aromas.

En este estudio se compararon 13 estándares: naranja fresca, jugo en polvo, cítrico, limón, pino, floral, pegamento, cáscara de naranja, madera, naranja cocida, mandarina, solvente y pomelo. En la evaluación, los asesores contaron con un grupo de estándares con sus nombres y otro grupo de aromas codificados. Su tarea consistió en encontrar el par correspondiente para cada aroma.

Análisis de volátiles

- Agrupamiento de muestras similares (Sorting task)

El método de agrupamiento es un procedimiento simple para identificar muestras que se perciben en forma similar. Es un método práctico cuando se tiene un gran número de muestras para comparar. Al evaluador se le presentan las muestras y se le pide que las agrupe de acuerdo a alguna característica que encuentre similar entre las muestras. Se puede pedir un determinado número de grupos o dejar que cada asesor agrupe libremente las muestras. Asimismo, se

puede requerir que realicen una descripción de cada grupo de muestras (Chollet y col., 2011). Los datos se analizan estadísticamente por análisis de escalamiento multidimensional (Schiffman y col., 1981).

Se realizó la prueba de agrupamiento de las muestras almacenadas a distintos tiempos. Por un lado se evaluaron las formulaciones conteniendo TMD y por otro las formulaciones conteniendo SMD. Para esta evaluación, 1 mL del aroma en polvo reconstituido con agua destilada a su volumen original se colocó en frascos de vidrio color marrón con tapa (100 mL de capacidad, con una boca de 2,5 cm de diámetro) codificados con números aleatorios de tres cifras. La evaluación se llevó a cabo en cabinas individuales a 22 ± 2 °C. Se les pidió a los asesores que olieran todos los frascos y agruparan las muestras que se percibían similares, pudiendo hacer tantos grupos como creyeran conveniente (la cantidad de grupos no era fija). Una vez organizados los grupos, debían describirlos con al menos tres descriptores que identificaran las características del grupo. Para la descripción contaban con los estándares y la lista de los aromas mencionados en la **Tabla 13**. Los datos fueron analizados por escalamiento multidimensional utilizando el programa SPSS v. 20.0.

En la **Tabla 14** se presenta la codificación empleada para identificar a las distintas muestras correspondientes a las cuatro formulaciones almacenadas a cuatro tiempos (0, 3, 6 y 9 meses) y a dos temperaturas 25 °C y 37 °C.

Tabla 14. Codificación empleada en la identificación de las diferentes formulaciones almacenadas a distintos tiempos y temperaturas.

Muestras	Tratamientos						
	Tiempo cero	3 meses		6 meses		9 meses	
		25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C
TMD _{Capsul}	M1	M5	M9	M13	M17	M21	M25
TMD _{Hi Cap}	M2	M6	M10	M14	M18	M22	M26
SMD _{Capsul}	M3	M7	M11	M15	M19	M23	M27
SMD _{Hi Cap}	M4	M8	M12	M16	M20	M24	M28

- Perfil descriptivo del aromas de naranja

El perfil aromático se realizó aplicando el método Listado de Atributos de Calidad (*Quality Attribute Check List*, ASTM 1975). Este método descriptivo semi-cuantitativo es usado cuando se deben evaluar estímulos aromáticos que son difíciles de cuantificar sobre una escala (Campo y col., 2010). La tarea consiste en tildar sobre una lista de atributos aquellos que mejor describen las muestras. Los datos se analizan por frecuencia de mención.

Se evaluaron los siguientes 21 descriptores: naranja fresca, jugo en polvo, cítrico, vitamina C, limón, plástico, pino, frutado, floral, pegamento, cáscara de naranja, madera, pungente, naranja verde, naranja madura, mermelada de naranja, naranja cocida, mandarina, caramelo de naranja, solvente, pomelo. Los evaluadores podían oler los estándares si lo necesitaban.

El aroma de naranja en polvo, reconstituido a volumen original con agua destilada (1,5 mL finales) se presentó en orden aleatorio dentro de botellitas de vidrio (4,5 cm de diámetro de base, 9 cm de altura) color caramelo con tapa, codificadas con códigos aleatorios de tres cifras, en cabinas individuales bajo luz diurna (6500 k). Los evaluadores debían agitar la muestra, para favorecer la liberación de volátiles, y luego olfatear el espacio de cabeza.

Los datos obtenidos fueron analizados por frecuencia de mención, considerando solamente aquellos atributos que habían sido mencionados al menos cinco veces en la misma muestra. Luego se realizó un Análisis de Componentes Principales con matriz de correlaciones, considerando el mínimo eigenvalor como 1, utilizando el programa InfoStat v.2011e. El análisis de la agrupación de muestras se llevó a cabo aplicando un análisis de conglomerados (*clusters*) no jerárquico con el comando K medias.

IV. Resultados

IV.1 Capítulo I: Encapsulación de etanol

En este capítulo se analiza la encapsulación de un volátil sencillo (etanol) en matrices "carriers" formadas por maltodextrina (MD), sacarosa (S), trehalosa (T), y sus mezclas con maltodextrina (SMD y TMD respectivamente), con el agregado de almidón modificado. Se emplearon dos métodos de secado (liofilización y secado spray) y se evaluaron las propiedades físicas y la retención de etanol en el almacenamiento a diferentes temperaturas.

Cuando el etanol se combina con carriers solubles en agua, forma una solución mixta de etanol, agua y el carrier. Esta solución se puede transformar en polvo por las técnicas de liofilización y secado spray a través de las cuales sustancialmente se extrae el agua y el etanol se encapsula dentro del carrier (Menting y Hoogstad, 1967; Menting y col., 1970; Thijssen, 1971; Sato y col., 1982). Algunos factores importantes a tener en cuenta para la encapsulación de etanol son el tipo y la concentración de carrier, y en el caso de secado spray también se debe considerar la temperatura de entrada de aire del secador spray, debido a que cuanto mayor sea la temperatura de secado, menor será la cantidad de etanol encapsulado, por la rápida volatilización (Kim y col., 1994, 1995).

IV.1.1 Caracterización de los polvos

En esta sección se realizó una caracterización física de las diferentes formulaciones deshidratadas conteniendo etanol encapsulado. La información provista por estos estudios apunta a seleccionar las condiciones adecuadas para el almacenamiento, evitando la ocurrencia de deterioro físico como colapso, cristalización de los azúcares, etc. Estos cambios no solo afectarían la apariencia del

material sino que se podrían provocar pérdidas del volátil encapsulado y dificultades en la rehidratación. Se determinaron algunas propiedades físicas a bajas humedades relativas (entre 11 y 33 % HR): propiedades de sorción de agua, temperaturas de transición vítrea (T_g), y se estimó la movilidad molecular de los sólidos y el agua fuertemente asociada a los sólidos mediante la determinación de los tiempos de relajación (T_2) por ^1H RMN. El rango de humedad relativa se seleccionó teniendo en cuenta que los polvos deshidratados se mantienen generalmente en condiciones de baja humedad.

IV.1.1.1 Propiedades de sorción de agua

La **Figura 40** muestra las isotermas de sorción de agua, después de 15 días de humidificación a 25 °C, para las cinco formulaciones obtenidas mediante secado spray (a) y liofilización (b). Los datos de contenido de agua deben ser considerados valores de pseudo-equilibrio debido a que el equilibrio completo de los azúcares amorfos puede tardar más tiempo (Makower y Dye, 1965; Yu y col., 2008).

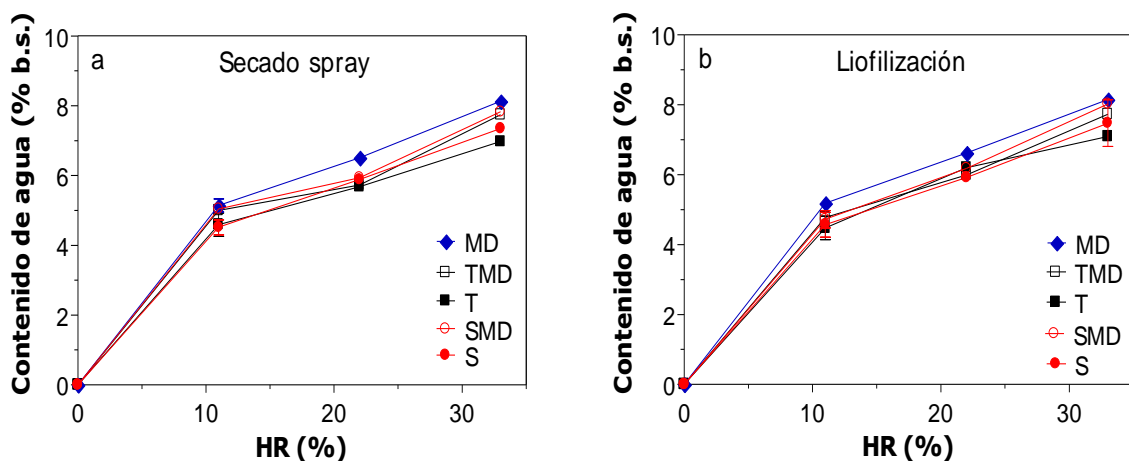


Figura 40. Isotermas de sorción de agua a 25 °C de las formulaciones obtenidas mediante secado spray (a) y liofilización (b).

Las distintas formulaciones presentaron isotermas muy similares, siendo MD la formulación que presentó los valores más elevados de contenido de agua a todas las HR estudiadas. Los contenidos de agua de la formulación S presentaron valores similares a los informados para la sacarosa amorfa pura (Aguilera, 2003). Además, Yu y col. (2008) compararon isotermas de pseudo-sorción para sacarosa amorfa a partir de varias fuentes bibliográficas, mostrando una gran concordancia con los datos actuales.

En el caso de la formulación T, se presentaron contenidos de agua similares a los reportados para la trehalosa pura (Iglesias y col., 1997). El contenido de agua de la formulación MD fue muy similar al observado para MD pura (Abramovič y Klofutar, 2002).

IV.1.1.2 Transiciones térmicas

La **Figura 41** muestra las temperaturas de transición vítrea (T_g) en función del contenido de agua. Se observó que la temperatura de inicio ("onset") de la transición vítrea (T_g) decreció a medida que aumentó el contenido de agua, debido al efecto plastificante del agua. No se presentaron diferencias importantes entre los valores de T_g obtenidos por los dos métodos de secado.

En el presente trabajo los valores de T_g de las formulaciones que contienen azúcares puros liofilizados (sin MD) fueron similares a los obtenidos para sacarosa (Foster, 2005) y trehalosa (Cardona y col., 1997) liofilizadas. Los valores de MD fueron levemente inferiores a los obtenidos por Roos (1995). Se observó que las mezclas de azúcares con maltodextrina presentaron un aumento de los valores de

T_g , en comparación con los valores correspondientes a los azúcares puros. Este hecho es esperable debido al elevado valor de T_g de la maltodextrina.

Teniendo en cuenta la línea punteada que indica la temperatura ambiente, se observa que se puede lograr mantener el estado vítreo a 25 °C hasta diferentes HR según la formulación: T, TMD, y MD hasta 33 %HR, SMD hasta 22 %HR y S hasta 11 %HR.

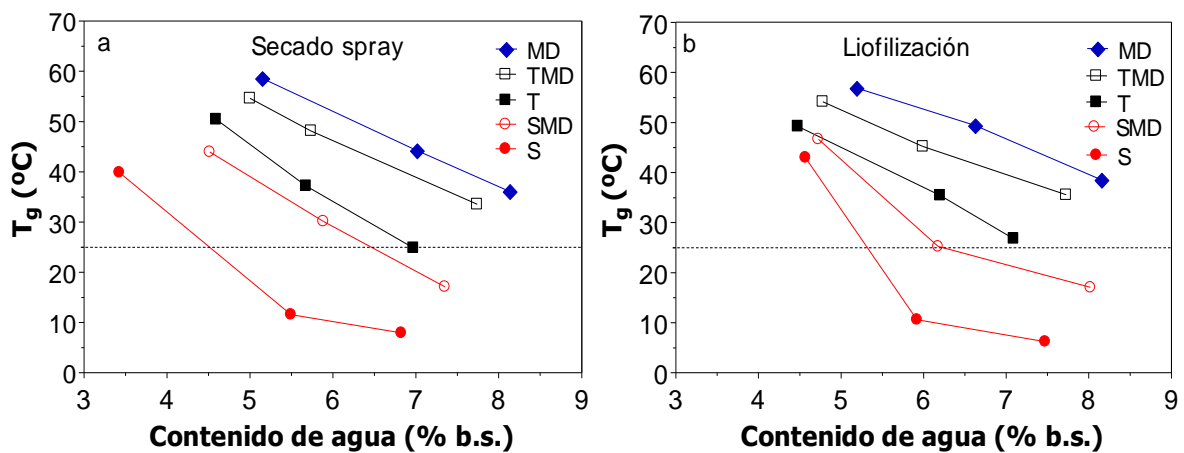


Figura 41. Valores de T_g en función del contenido de agua para las cinco formulaciones obtenidas mediante secado spray (a) y liofilización (b). La línea punteada indica la temperatura ambiente (25 °C).

La formulación S no mostró evidencia visual de cristalización después de 15 días de almacenamiento a 33 %HR. Este hecho podría estar relacionado con la dependencia de la cristalización de la sacarosa con tiempo. Iglesias y Chirife (1978) informaron que varios polímeros retrasan la cristalización de la sacarosa en sistemas amorfos, como así también Roos y Karel (1991) informaron de la inhibición de la cristalización de la sacarosa en presencia de MD o jarabe de maíz. La presencia de almidón modificado podría explicar el retraso de la cristalización de sacarosa observado en este trabajo a 33 %HR.

En el caso de las formulaciones conteniendo trehalosa, dado que se trabajó hasta 33 %HR no se alcanzó el contenido de agua necesario para que ocurra la cristalización del azúcar dihidrato (10,5 %) (Schebor y col., 2010).

IV.1.1.3 Movilidad molecular

Con el fin de estimar la movilidad molecular en las distintas formulaciones, se analizaron los tiempos de relajación transversal (T_2) mediante ^1H RMN. Se empleó el método de decaimiento libre de la inducción (FID). De acuerdo con varios autores, el decaimiento rápido de T_2 observado con este método, está asociado a los protones de los sólidos y a las moléculas de agua que están interactuando fuertemente con la matriz sólida por enlaces de hidrógeno (Kalichevsky y col., 1992; Ruan y col., 1999; Rugraff y col., 1996). Ablett y col. (1993) analizaron la evolución de T_2 (medido por el método FID) con la temperatura, en relación con T_g para diversos malto-oligómeros. Ellos observaron que los tiempos de relajación (T_2) a temperaturas por debajo de la T_g mostraban que las moléculas de soluto tenían propiedades de RMN típicas de un sólido. Por otro lado, a temperaturas mayores que T_g , los valores de T_2 aumentaron al aumentar la temperatura, mostrando una correlación entre la temperatura límite para el comportamiento sólido y la T_g .

Para evaluar el efecto del estado físico del material sobre la movilidad molecular, los tiempos de relajación T_2 se determinaron en un rango de temperaturas entre 15 y 45 °C, de manera de tener las formulaciones tanto en estado vítreo como en estado sobreenfocado. La **Figura 42** muestra los valores de T_2 a todas las HR estudiadas en función de variable $T-T_g$. El comportamiento general muestra un aumento de T_2 al aumentar la temperatura y la humedad relativa. En el

estado vítreo las formulaciones conteniendo sacarosa fueron las que presentaron los valores más bajos de T_2 , seguido de las formulaciones conteniendo trehalosa, y los valores más altos se presentaron para MD. Es importante notar que la formulación MD fue la que presentó los valores más altos de humedad a cada HR (**Figura 40**), lo cual puede estar relacionado con los valores más altos de T_2 . Los cambios más importantes se observaron en el estado sobreenfriado, particularmente para las formulaciones S a 33 %HR. No se observaron diferencias notables entre los dos métodos de secado empleados.

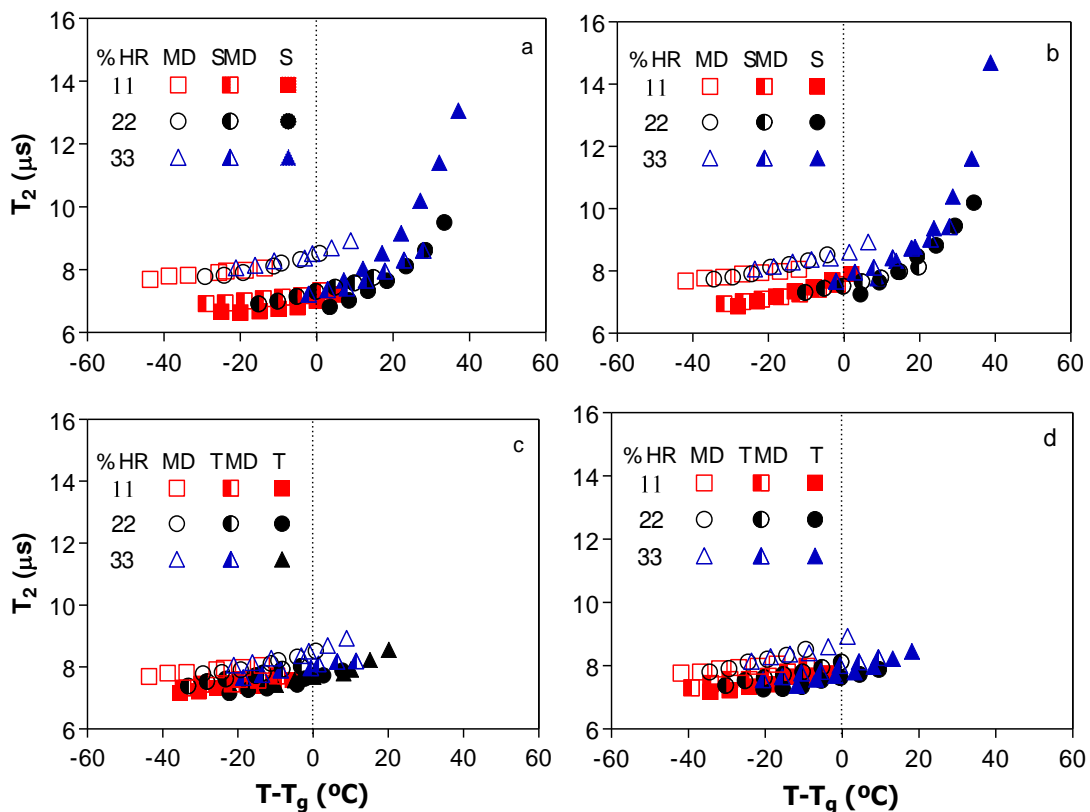


Figura 42. Tiempos de relajación T_2 obtenidos por ^1H RMN en función de la variable $(T-T_g)$, donde T es la temperatura (entre 15 y 45 °C) y T_g la temperatura de transición vítrea a diferentes HR para las formulaciones conteniendo sacarosa (a y b) y trehalosa (c y d) obtenidas mediante secado spray (a y c) y liofilización (b y d).

IV.1.2 Retención de etanol

En base a los resultados observados en los estudios sobre las propiedades físicas, se seleccionaron las condiciones de interés para evaluar la retención de etanol. Por lo tanto, en esta sección se analiza la retención de etanol en las diferentes formulaciones teniendo en cuenta: 1) los procesos de secado (liofilización y secado spray), y 2) el almacenamiento a diferentes temperaturas (temperatura ambiente y una condición más desfavorable, 37 °C). Al cabo del secado, las formulaciones se almacenaron durante 15 días a 11 %HR con el fin de unificar la HR para comparar los comportamientos en los tratamientos posteriores. Se seleccionó esta HR para poder tener a todas las formulaciones en el estado vítreo a temperatura ambiente.

La **Figura 43** presenta el porcentaje de retención de etanol en las diferentes formulaciones a la salida de cada proceso de secado (**Figura 43a**) y al cabo de los 15 días de almacenamiento a 11 %HR a 25 °C (**Figura 43b**). Se observa que la retención de etanol fue muy baja para ambos métodos de secado.

Se pueden observar diferencias altamente significativas entre los valores de retención de etanol correspondientes a las muestras obtenidas por los dos procesos de secado. En el proceso de liofilización, se observa que todas las formulaciones retuvieron aproximadamente un 40 % del etanol inicial, mientras que el secado spray causó pérdidas mucho mayores (**Figura 43a**). Entre las formulaciones secadas por spray se pueden observar diferencias significativas en la retención de etanol entre las muestras que contienen MD (entre 20 y 24 % de retención) y las que contienen sólo azúcares puros (entre 10 y 13 % de retención), siendo la formulación S la que menos etanol retuvo. Voilley y col. (1973) analizaron la retención de etanol

en jugo de naranja y en un sistema modelo del jugo, y observaron una retención de aproximadamente 30% luego de la liofilización, mostrando porcentajes de retención similares a los obtenidos en este trabajo.

Las grandes pérdidas observadas luego del proceso de secado spray probablemente se deban a las altas temperaturas del proceso y a la alta volatilidad del etanol. Al cabo de la equilibración a 11 %HR (**Figura 43b**) se observaron pérdidas de aproximadamente 2 % para las formulaciones liofilizadas, y entre 1 y 3 % para las muestras secadas por spray.

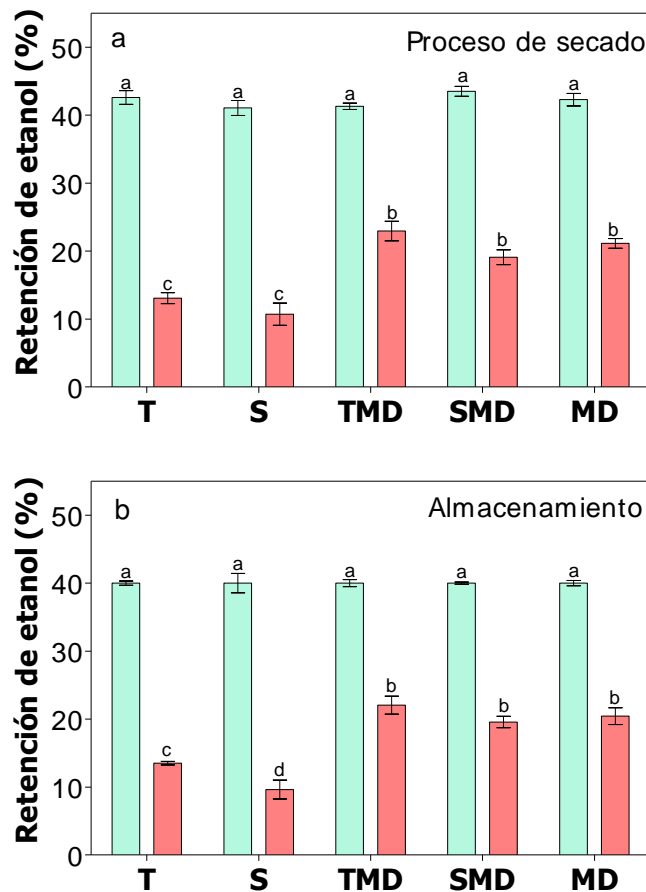


Figura 43. Porcentaje de etanol retenido en las diferentes formulaciones a la salida del secado (a) y al cabo de los 15 días de almacenamiento a 11 %HR a 25 °C (b), para los dos proceso de secado: secado spray (barras rojas) y liofilización (barras verdes). Los promedios con letras diferentes son significativamente distintos ($p < 0,05$).

La **Figura 44** muestra la retención de etanol para los sistemas liofilizados y secados spray durante el almacenamiento a dos temperaturas (25 y 37 °C).

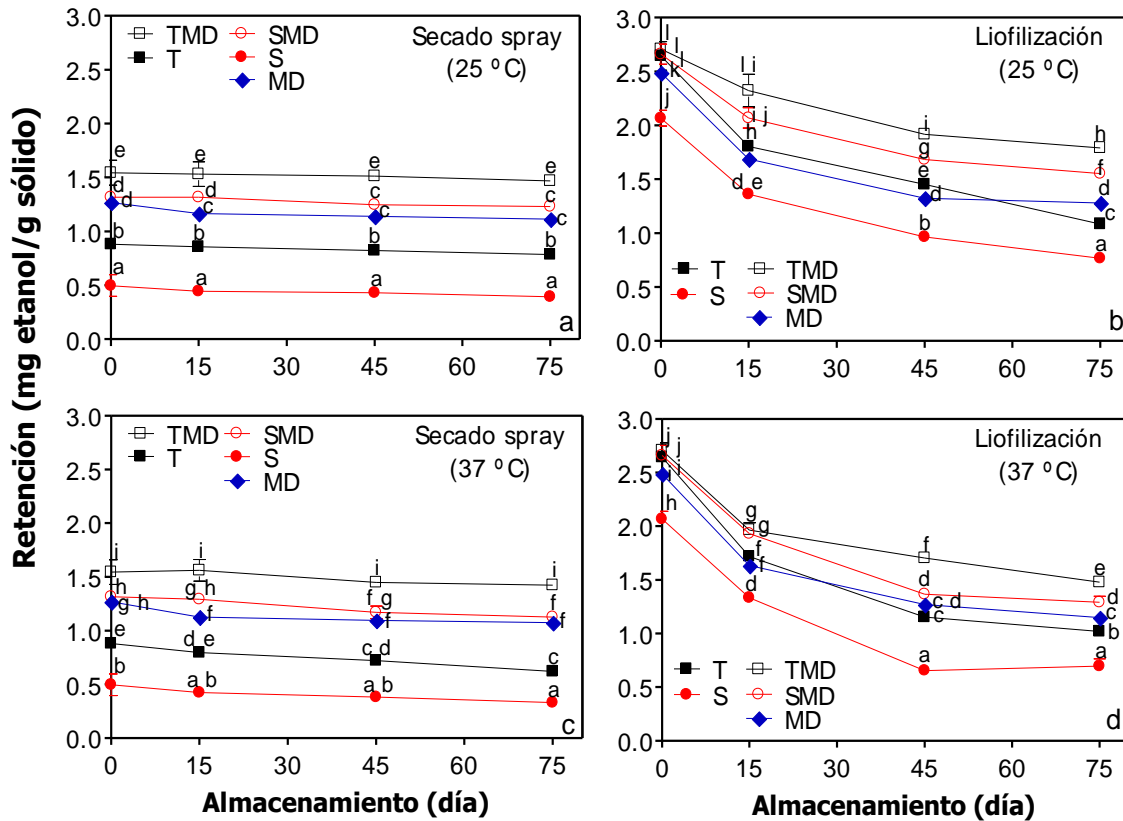


Figura 44. Porcentaje de etanol retenido en las diferentes formulaciones obtenidas por secado spray (a y c) y liofilización (b y d), almacenadas a 25 y 37 °C. Las distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Se observó una diferencia muy importante dependiendo del tipo de secado. Las formulaciones secadas por spray no presentaron pérdidas sustanciales de etanol durante el almacenamiento. En contraste, las formulaciones liofilizadas sufrieron pérdidas muy importantes, de hasta 28 % en el caso de la formulación S almacenada a 37 °C. Cabe destacar que las pérdidas de etanol se produjeron en matrices en estado vítreo en todos los casos. Si bien los movimientos a gran escala de las moléculas de la matriz están efectivamente bloqueados en el estado vítreo, las moléculas pequeñas como gases y algunas moléculas orgánicas pueden migrar a

través de los materiales amorfos debido a fluctuaciones de densidad inducidas térmicamente (Vrentas y Duda, 1978).

La presencia de maltodextrina contribuyó a aumentar la estabilidad de la matriz (aumentando el valor de T_g , **Figura 41**), no obstante, las matrices TMD y SMD fueron más eficientes al momento de retener el volátil, que las formulaciones MD. La combinación TMD exhibió la mayor retención de etanol ($p < 0,05$) a todas las temperaturas y tiempos analizados.

En la **Figura 45** se presenta el porcentaje de etanol retenido en las diferentes formulaciones secadas spray y liofilizadas, al finalizar el almacenamiento (75 días) a 25 y 37 °C en función de las variables ($T-T_g$) y T_2 .

En las formulaciones secadas por spray (**Figura 45a y b**), las muestras se pudieron separar en dos grupos: las formulaciones que contenían MD en las que se observó una retención de aproximadamente 18 % y las formulaciones de azúcares que retuvieron 10 %. En ambos casos el comportamiento fue independiente de la temperatura de almacenamiento. Además, no se observó una influencia de la T_g ni de la movilidad molecular sobre la retención de etanol. En este caso, el secado a alta temperatura causó la pérdida de la mayoría del etanol en el proceso, quedando partículas de polvo en las que el volátil residual probablemente está interactuando fuertemente con la matriz. Debido a que las temperaturas de almacenamiento seleccionadas fueron relativamente bajas, no se produjeron pérdidas sustanciales en esta etapa.

Para las formulaciones liofilizadas, se presentó una tendencia general a la disminución de la retención de etanol al aumentar la variable $T-T_g$ (**Figura 45c**) y los valores de T_2 (**Figura 45d**).

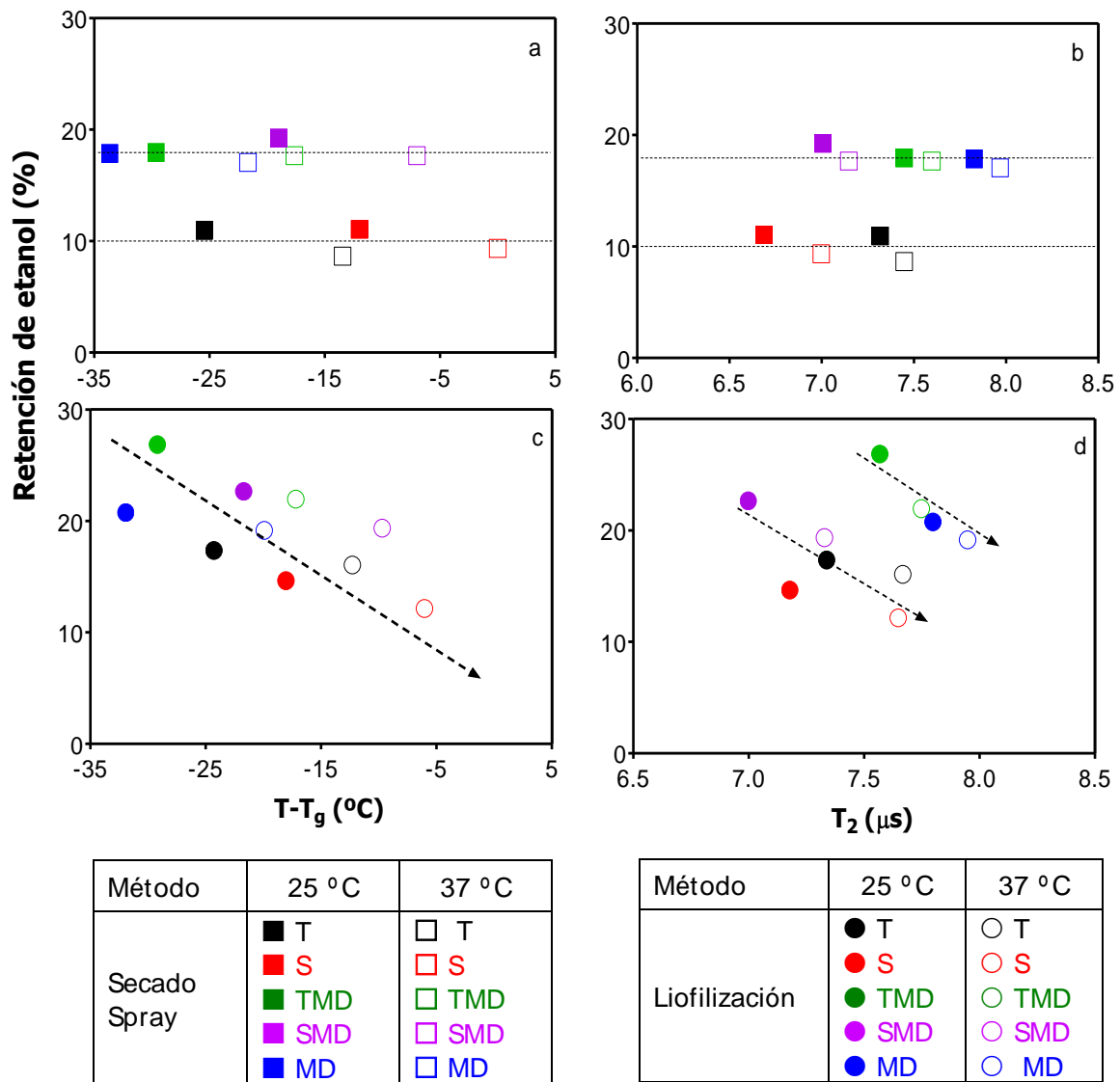


Figura 45. Porcentaje de etanol retenido en las diferentes formulaciones obtenidas por secado spray (a y b) y liofilización (c y d), al cabo de los 75 días de almacenamiento a las dos temperaturas analizadas: 25 y 37 °C en función de la variable ($T-T_g$) (a y c) y de la variable T_2 (b y d).

Sin embargo, también se presentó un efecto específico de la matriz, dividiendo a las muestras en dos grupos (**Figura 45d**). Un grupo estuvo formado por las formulaciones S, SMD y T, y otro grupo por las formulaciones TMD y MD, este último mostró altos valores de retención a valores relativamente altos de T_2 . En este caso, si bien la retención luego del secado fue baja (**Figura 43**), durante el

almacenamiento se produjeron leves pérdidas a diferencia de lo observado para las muestras secadas spray.

IV.1.3 Resultados relevantes

- El método empleado para la deshidratación de las formulaciones tuvo una gran influencia en la retención de etanol. Se alcanzó mayor retención cuando se empleó la liofilización en comparación con el secado spray. Esto indicaría que las altas temperaturas alcanzadas en el proceso de secado spray y la alta volatilidad del etanol hacen inadecuado a este método para el secado de etanol.
- La retención de etanol fue mucho menor para las matrices conteniendo azúcares que para las mezclas de azúcares con maltodextrina, indicando la importancia de incorporar polímeros de alto peso molecular a este tipo de formulaciones.
- La retención de etanol en el almacenamiento fue mayor para las formulaciones conteniendo trehalosa que para las que contenían sacarosa. Este hecho implica un efecto específico del azúcar. Algunos aspectos de las propiedades físicas de los polvos indican que este efecto no estaría relacionado con el estado físico de la matriz: 1) En ambos casos los polvos se encuentran en estado vítreo y a temperaturas bastante menores que T_g en las condiciones de almacenamiento, y 2) Los valores de T_2 obtenidos por RMN fueron menores para las formulaciones conteniendo sacarosa que para aquellas conteniendo trehalosa, indicando una movilidad molecular más baja en el caso de sacarosa.
- La retención de etanol fue muy baja en todos los casos analizados indicando que sería necesario desarrollar nuevas formulaciones dado que

empleando el método de liofilización deberían obtenerse mejores resultados.

IV.2 Capítulo II: Encapsulación de aceites cítricos

En este capítulo se desarrollaron formulaciones secadas por spray conteniendo dos volátiles encapsulados: citral (componente mayoritariamente responsable del carácter único del limón) y aceite esencial de naranja (un aroma compuesto por numerosos componentes, proveniente de la cáscara de naranja). Dada la naturaleza hidrofóbica de los aromas seleccionados, se realizó la encapsulación de los mismos en emulsiones conteniendo como fase continua matrices compuestas por sacarosa, trehalosa y sus mezclas con maltodextrina. Además se emplearon dos almidones modificados como agentes emulsificantes. Se analizaron las propiedades y la estabilidad de las emulsiones, las características físicas de las formulaciones obtenidas por secado spray, y la retención de los volátiles luego del secado y el almacenamiento.

IV.2.1 Citral

IV.2.1.1 Caracterización de las emulsiones

En esta sección se describen los estudios realizados en emulsiones frescas (EF) y las obtenidas después de un proceso de secado, denominadas emulsiones reconstituidas (ER). En todos los casos, se prepararon dispersando citral en fases continuas constituidas por soluciones conteniendo trehalosa, sacarosa o la mezcla de los azúcares con maltodextrina. Se empleó como emulsificante el almidón modificado comercial Capsul. La formación de estas emulsiones se realizó empleando un agitador de alta velocidad.

IV.2.1.1.a Reometría

La viscosidad de un líquido es una medida de su resistencia a fluir: cuanto mayor es la viscosidad, mayor es la resistencia (McClements, 1999). Esta propiedad surge de la fricción entre las capas líquidas que se deslizan una sobre otra. Esta medida reológica proporciona información sobre la organización estructural y las interacciones de los componentes dentro del sistema estudiado. Es importante conocer las propiedades reológicas de las emulsiones para diseñar adecuadamente ciertas operaciones en la industria, como los sistemas de bombeo. Además, es sabido que influyen en las características organolépticas percibidas por los consumidores (Gabriel y col., 2009). En este sentido, Hunter (1993) y Tadros (1994) estudiaron la relación entre la viscosidad y la velocidad de deformación de las emulsiones, la cual se puede utilizar para obtener información acerca de la fuerza de las interacciones coloidales entre las gotas.

La **Figura 46** muestra las curvas de flujo obtenidas para las EF (**Figura 46a**) y ER (**Figura 46b**). En todos los casos estudiados el esfuerzo de corte aumentó linealmente a medida que la aumentaba la velocidad de deformación. Por lo tanto, la viscosidad resultó constante sobre la variación del esfuerzo de corte, corroborando el carácter Newtoniano de las emulsiones.

La **Figura 46c** muestra los valores de viscosidad obtenidos para las EF, ER y sus componentes individuales: 1) los componentes de las fases continuas de las formulaciones S, T, TMD, SMD y 2) el citral puro. Tanto las EF como las ER presentaron valores de viscosidad significativamente más bajos en ausencia (S y T) que en presencia de maltodextrina (SMD y TMD).

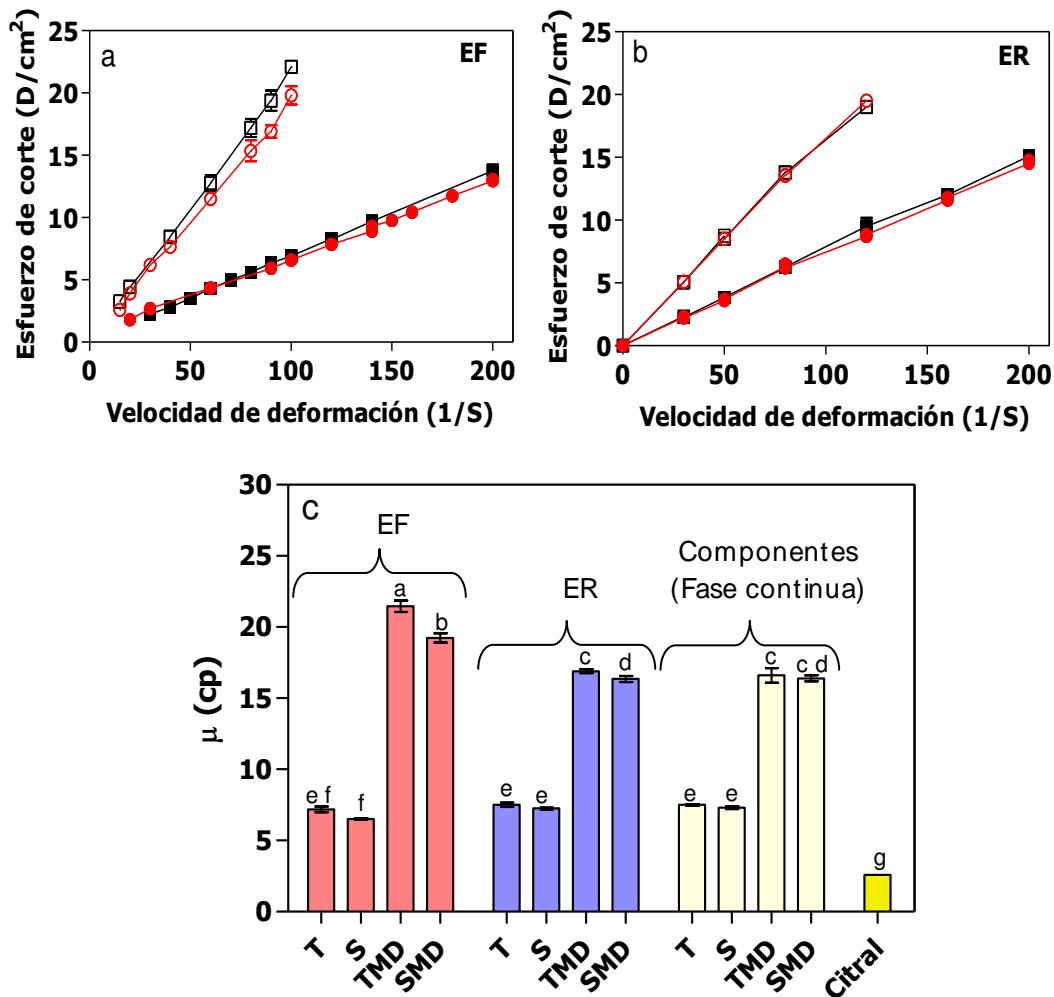


Figura 46. Curvas de flujo para emulsiones frescas (EF) (a) y emulsiones reconstituidas (ER) (b): T (■), S (●), TMD (□) y SMD (○). Valores de viscosidad de EF, ER, de los componentes de las fases continuas y del citral puro (c). Los promedios con distintas letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Las formulaciones S y T manifestaron valores de viscosidad similares entre sí y a los valores de sus correspondientes fases continuas (sin adición de citral). La viscosidad del citral puro (2,2 cp) fue mucho menor, y aparentemente no contribuyó a la viscosidad global de las emulsiones S y T.

La MD es un polisacárido ramificado cuyas moléculas se expanden en solución acuosa, ejerciendo un notable efecto viscoso (Klinkesorn y col., 2004). Esta sería la razón por la cual las emulsiones TMD y SMD manifestaron valores de viscosidad mayores que los correspondientes a las emulsiones S y T. En el caso de las EF,

parece haber ocurrido un efecto aditivo con la contribución de ambas fases, la continua y la dispersa. Sin embargo, las ER no mostraron este comportamiento, estas presentaron valores de viscosidad similares a los de sus correspondientes fases continuas.

IV.2.1.1.b Distribución y tamaño de gota

La distribución de tamaño de las gotas influye en las propiedades de la emulsión en aspectos como: la velocidad de los procesos de desestabilización, la estabilidad a largo plazo, la resistencia al cremado, la textura y la apariencia óptica, la viscosidad, la eficiencia funcional en emulsiones destinadas a la liberación controlada de compuestos, y la reactividad química de sus componentes (Jurado y col., 2007). El tamaño de las gotas de la emulsión también tiene un impacto tecnológico, ya que es un factor importante para la retención de flavors. Risch and Reineccius (1988) y Sootitawat y col. (2003) observaron que el tamaño de gota tuvo una influencia muy importante en la retención de aromas cítricos encapsulados.

La **Figura 47** ilustra la distribución de tamaño de gotas, en volumen, obtenida por la técnica de dispersión estática de luz láser de las EF y ER. Todas las emulsiones estudiadas presentaron una distribución de tamaño de gota similar, con un patrón multimodal, es decir, poblaciones polidispersas. La distribución en volumen se puede convertir a distribución en número a fin de comparar la contribución relativa en el tamaño de gota de cada población sobre la distribución global. Cuando se analizó la distribución en número sólo se detectó un pico para todas las emulsiones analizadas, lo que indica la existencia de una población dominante, con un tamaño promedio de alrededor de $0,15 \mu\text{m}$ (insertos de la **Figura 47**).

El diámetro promedio de volumen-superficie ($D_{3,2}$) y el diámetro promedio de volumen equivalente ($D_{4,3}$), ambos derivados de la distribución del tamaño de gota, se utilizaron para caracterizar los diámetros de las gotas (**Figura 48**).

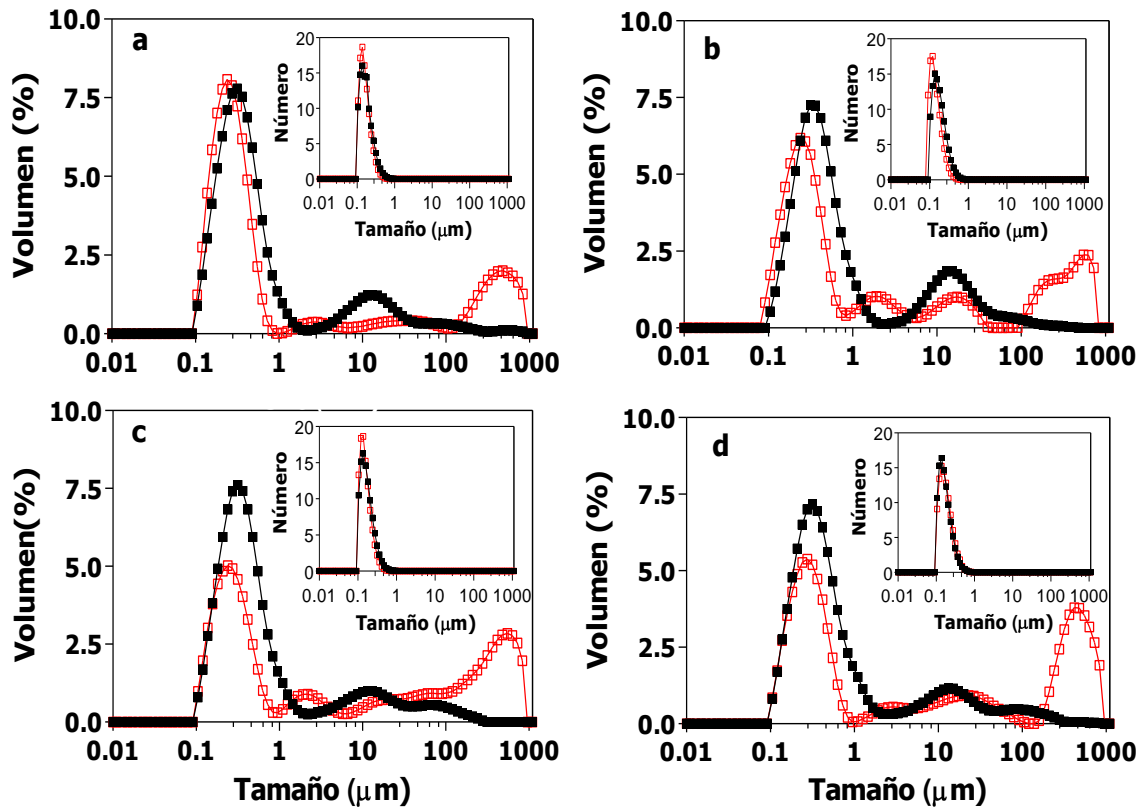


Figura 47. Distribución de tamaño de gota de EF (■) y ER (□): T (a), TMD (b), S (c), y SMD (d). Medición realizada a 25 °C. Los promedios con distintas letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Las EF que contenían S y T presentaron los valores más altos de $D_{3,2}$ (**Figura 48a**). En presencia de MD los valores de $D_{3,2}$ se redujeron notablemente, siendo muy similares a los obtenidos para todas las ER analizadas. En el caso del parámetro $D_{4,3}$ (**Figura 48b**) las EF presentaron valores mucho más altos que sus respectivas ER y constituyeron grupos muy diferentes entre ellos. Los valores elevados de $D_{4,3}$ se corresponden con el acontecimiento de uno o más procesos de desestabilización que

están ocurriendo en el seno de las emulsiones (Relkin y Sourdet, 2005; Palazolo, 2006).

En general, las ER presentaron una disminución importante en los valores de $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ en comparación con los observados en las EF. Esto podría deberse a la disrupción de las gotas de emulsión en gotitas más pequeñas durante la atomización en el proceso de secado por aspersion, lo cual fue informado previamente por Soottitantawat y col. (2003). Este aspecto tiene una importancia práctica ya que los tamaños pequeños de las gotas, indicados por los valores bajos de $D_{3,2}$, podrían contribuir a reducir la ocurrencia de los procesos de desestabilización después de la reconstitución. Este hecho se refleja en los valores bajos de $D_{4,3}$ obtenidos para cada ER (**Figura 48b**).

Las emulsiones que contienen MD mostraron un comportamiento particular. En el caso de las EF los valores de $D_{3,2}$ fueron relativamente bajos, sin embargo se presentaron valores altos de $D_{4,3}$. En el caso de las ER, los valores de $D_{3,2}$ fueron bajos y en consecuencia los valores de $D_{4,3}$ también fueron menores. Si bien no se observaron diferencias significativas entre los valores de $D_{3,2}$ para las EF y ER, los valores de EF fueron levemente mayores y esto podría indicar que el tamaño inicial de las gotas fue suficientemente grande como para favorecer la desestabilización (valores de $D_{4,3}$ altos).

Con el fin de identificar el tipo de agregación de gotas que ocurre en las emulsiones (floculación o coalescencia), la determinación del tamaño de gota de las EF se hizo también en presencia de SDS, que es un surfactante que actúa disociando los flóculos existentes (solo en el caso de asociación reversible de gotas). El tamaño de gota medido con la adición de SDS no mostrará ningún cambio si la emulsión

presenta coalescencia, pero puede mostrar diferencias o volver a la distribución de tamaño de gota original si la desestabilización ha ocurrido por floculación (Dickinson, 1992). Se observó una asociación de gotas persistente, para las emulsiones T, lo que indica cierto grado de coalescencia entre las gotas. Las emulsiones que contenían S y MD presentaron valores muy bajos de $D_{4,3-SDS}$, lo que indica que prácticamente no se desarrolló coalescencia, y solo se presentó floculación.

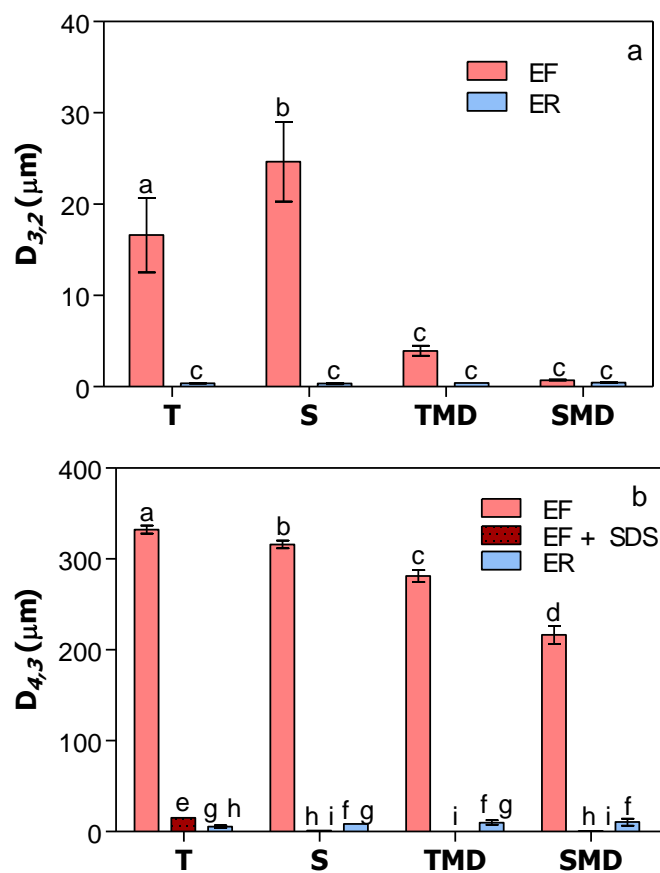


Figura 48. Parámetros obtenidos a partir del análisis de la dispersión estática de luz: $D_{3,2}$ (a) y $D_{4,3}$ (b) para las emulsiones frescas (EF), emulsiones frescas + SDS (EF + SDS) y emulsiones reconstituidas (ER). Los promedios con distintas letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

IV.2.1.1.c Movilidad molecular

Con el fin de estimar la movilidad molecular en las distintas emulsiones, se realizaron mediciones de ^1H -RMN resuelto en el tiempo (**Figura 49**). Se determinaron los tiempos de relajación transversal T_2 asociados a relajaciones de protones relativamente lentas, las cuales estarían relacionadas con poblaciones de moléculas de agua que muestran pocas interacciones con los sólidos (Fullerton y Cameron, 1988; Kou y col., 2000). Para ello se utilizó la secuencia de pulsos CPMG.

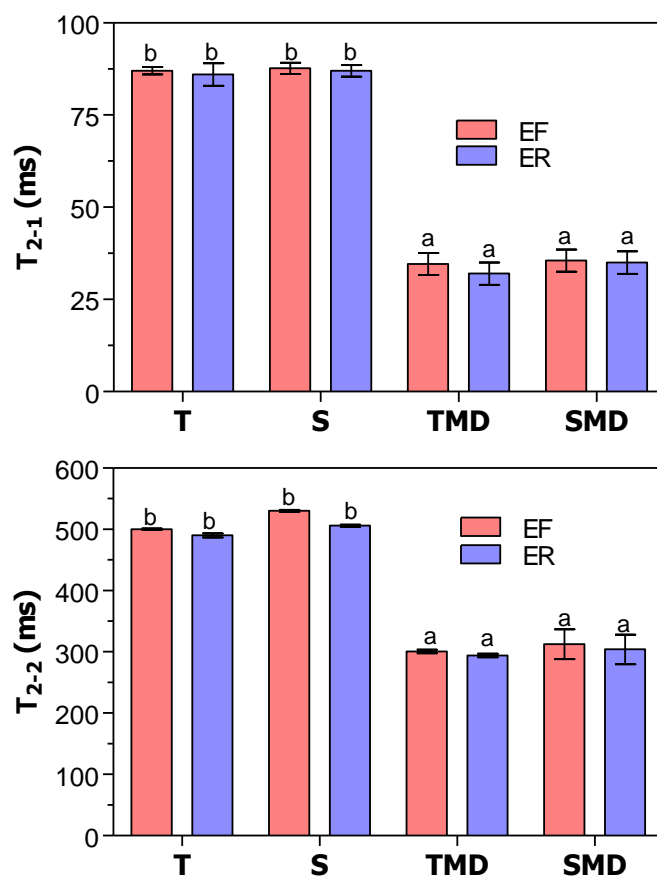


Figura 49. Tiempos de relajación T_2 obtenidos por ^1H -RMN luego de aplicar la secuencia de pulsos CPMG a 25 °C. Los promedios con distintas letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Se encontraron dos poblaciones de diferente movilidad representadas por distintos tiempos de relajación. Las poblaciones menos móviles están representadas por valores de T_2 (T_{2-1}), los cuales fueron de aproximadamente 87 ms y 35 ms para

las formulaciones que contenían azúcares puros y mezclas con MD respectivamente (**Figura 49a**). Las poblaciones más móviles están representadas por valores de T_2 (T_{2-2}) de alrededor de 500 ms para S y T, y 300 ms para SMD y TMD (**Figura 49b**). No hubo diferencias en los valores de T_2 debidas a los azúcares. Tampoco se observaron diferencias entre EF y ER.

La presencia de MD produjo una reducción importante en la movilidad molecular del agua. Esto podría deberse al que el polímero presenta una disposición espacial ramificada en medio acuoso, conjuntamente con un alto peso molecular, lo cual conlleva a una mayor viscosidad (**Figura 46**), que contribuye a la reducción de la movilidad.

IV.2.1.2 Estabilidad de las emulsiones

El tiempo que una emulsión debe permanecer estable depende de la naturaleza del producto alimenticio (Dickinson, 2003). Algunas emulsiones se forman como pasos intermedios en un proceso de fabricación por lo que sólo deben permanecer estables durante unos segundos, minutos u horas, mientras que otras deben permanecer estables durante días, meses o incluso años antes de su consumo (Mc Clements, 1999). En el caso que aquí se presenta, es requerido que las emulsiones se mantengan estables durante el tiempo transcurrido desde su preparación hasta su secado, es decir, un tiempo corto. Por lo tanto, los estudios de estabilidad se realizaron durante dos horas, un período que superaría ampliamente el tiempo requerido. En esta sección se estudió la estabilidad de las emulsiones empleando el análisis del perfil de back scattering.

El análisis del perfil de back scattering (BS) en función del tiempo ofrece la ventaja de permitir la evaluación continua de los procesos involucrados en la desestabilización global de emulsiones en condiciones de quiescencia y sin dilución previa (Palazzolo y col., 2005). Según Mengual y col. (1999), estos perfiles constituyen la huella macroscópica de la emulsión en un momento dado. El perfil de BS es un parámetro que depende directamente del diámetro promedio de la gota (D) (Bawer y col., 1997) y de la fracción volumétrica de la fase dispersa (ϕ), es decir, $BS = f(D, \phi)$ (Cerqueira y col., 2007).

Las **Figuras 50** y **51** muestran los perfiles de BS en función de la longitud del tubo para las EF (**Figura 50**) y ER (**Figura 51**) a distintos tiempos.

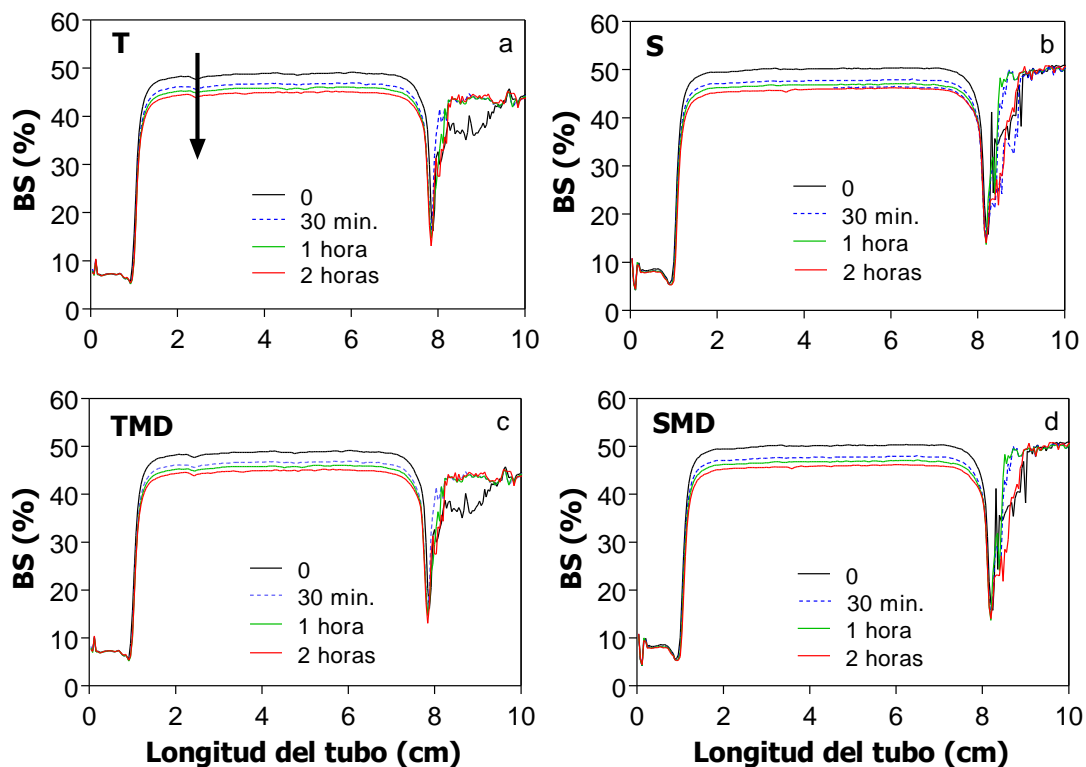


Figura 50. Perfil de Back scattering (BS) en función de la longitud del tubo (la dirección de la flecha indica el incremento del tiempo) en condiciones de reposo para emulsiones frescas (EF): T (a), S (b), TMD (c), y SMD (d).

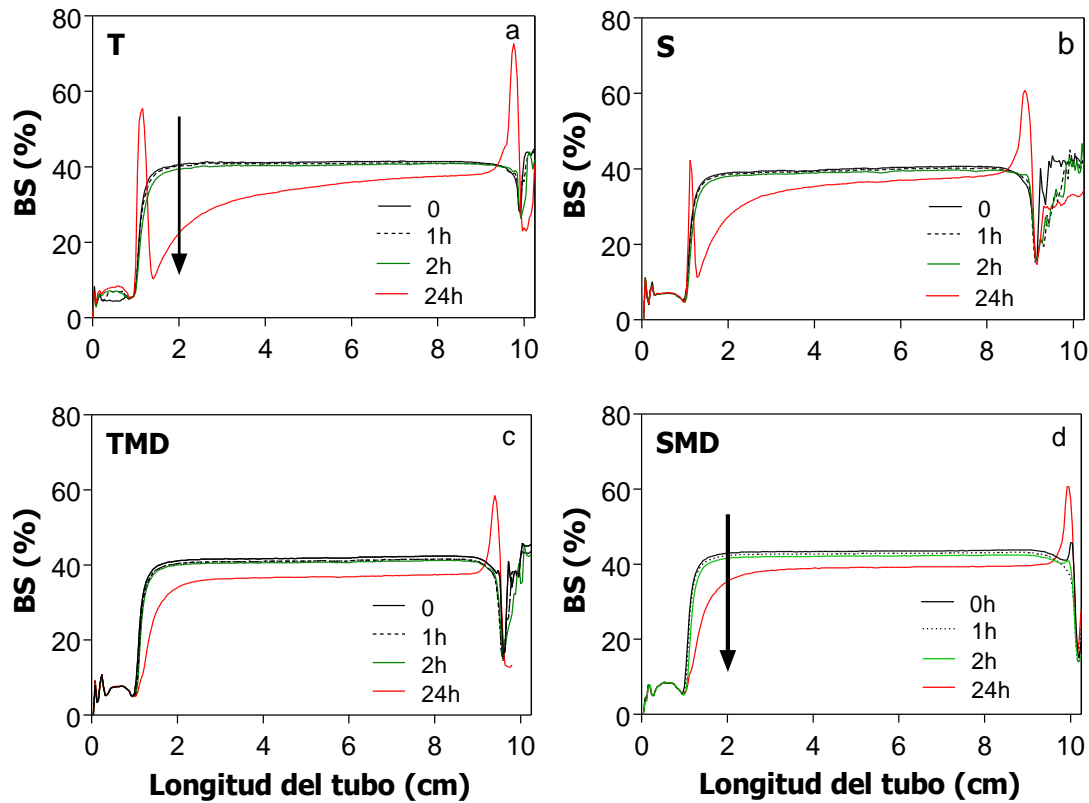


Figura 51. Perfil de Back scattering (BS) en función de la longitud del tubo (la dirección de la flecha indica el incremento del tiempo) en condiciones de reposo para emulsiones reconstituidas (ER): T (a), S (b), TMD (c) y SMD (d).

En general se observó un perfil regular de BS en las dos horas de almacenamiento, indicativo de la ausencia de cremado y sedimentación (Mengual y col., 1999; Palazolo y col., 2004). Sin embargo, en el caso de las EF (**Figura 50**), se observó una disminución uniforme en el promedio de las curvas de BS a lo largo de todo el tubo en el transcurso del tiempo, lo que indica la ocurrencia de floculación (Palazolo, 2004). En este caso se observa que la cinética de desestabilización es relativamente rápida, dado que a los 30 minutos ya se produjo un descenso importante del % de BS y que los cambios a tiempos más largos fueron más leves. Es posible que la desestabilización comience en el mismo proceso de preparación, lo cual se corrobora con los valores elevados de $D_{4,3}$ iniciales (**Figura 48**). El análisis

de BS para las ER no mostró cambios importantes durante 2 horas de almacenamiento (**Figura 51**).

Una aplicación tecnológica potencial de los polvos conteniendo citral encapsulado podría ser su incorporación a jugos cítricos deshidratados, los cuales necesitan ser disueltos en agua para ser consumidos. Una vez preparado, es deseable que la estabilidad del producto se mantenga durante al menos un día. Por esta razón se incluyeron los perfiles de BS correspondientes a 24 horas de almacenamiento para las ER (**Figura 51**). Después de un día de almacenamiento, pudo notarse una disminución de BS en la parte inferior del tubo y un aumento en la parte superior para las emulsiones T y S. Este fenómeno indica el cremado de estas ER (**Figura 51a, b**) (Mengual y col., 1999; Palazolo y col., 2004; Cerdeira y col., 2007). Por otro lado, las emulsiones SMD y TMD (**Figura 51c, d**) a las 24 horas presentaron un cierto grado de floculación, además puede observarse el aumento de BS en la parte superior del tubo lo que indica el ascenso de flóculos. Estos resultados indican que la presencia del polisacárido condujo a un grado de desestabilización menor, probablemente debido al efecto viscosante de la MD. Además, la mayor movilidad molecular observada en las formulaciones sin MD (**Figura 49**) contribuyó a la mayor desestabilización observada en estos sistemas.

IV.2.1.3 Caracterización de los polvos conteniendo citral encapsulado

En esta sección se analizan algunas propiedades físicas de las diferentes formulaciones en polvo conteniendo citral encapsulado por secado spray: las propiedades de sorción de agua a 25 °C, las temperaturas de transición vítrea (T_g) y la movilidad molecular estimada a través de los tiempos de relajación T_2 medidos

por ^1H RMN. Además, se analiza la pérdida del aroma citral luego del secado, por cromatografía gaseosa y por análisis sensorial.

IV.2.1.3.a Propiedades de sorción de agua

Los estudios de sorción de agua se realizaron a humedades relativas (HR) entre 11 y 33 % a 25 °C. Este rango de humedad relativa se seleccionó debido a que este tipo de polvos deshidratados usualmente se mantienen en condiciones de baja humedad principalmente para evitar la ocurrencia de deterioro físico.

En la **Figura 52** se presentan las isotermas de sorción de agua después de 15 días de humidificación a 25 °C para los diferentes polvos. Estos datos deben ser considerados valores de pseudo-equilibrio, como se mencionó en el caso de etanol encapsulado (**Figura 40**), debido a que el equilibrio completo de los azúcares amorfos puede tardar más tiempo (Makower y Dye, 1965; Yu y col., 2008).

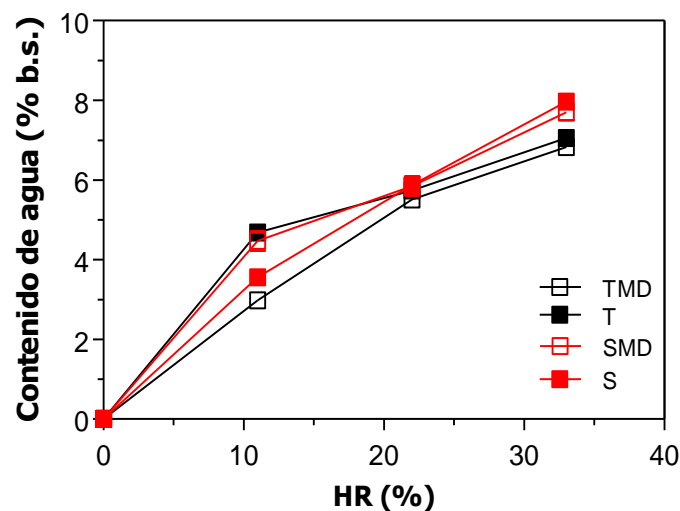


Figura 52. Isotermas de sorción de agua a 25 °C.

Las isotermas de sorción de agua obtenidas para las formulaciones conteniendo trehalosa fueron muy similares a las observadas para el caso de etanol

encapsulado y se observaron pequeñas diferencias con respecto a las formulaciones conteniendo sacarosa (**Figura 40**).

La formulación conteniendo sacarosa no mostró evidencia visual de cristalización después de 15 días de almacenamiento a 33 %HR, de la misma manera que en el caso de etanol encapsulado (sección IV.1.1.1).

IV.2.1.3.b Transiciones térmicas y movilidad molecular

La **Figura 53a** muestra termogramas típicos obtenidos por calorimetría diferencial de barrido (DSC), en los cuales se presentan las transiciones vítreas para las diferentes formulaciones a 11 % de humedad relativa. Las transiciones vítreas fueron evidentes para todos los sistemas analizados y a todas las HR estudiadas, pero solo se muestran las curvas obtenidas a 11 % HR como ejemplo. Los valores de temperatura de transición vítrea (T_g) en función del contenido de agua se muestran en la **Figura 53b**.

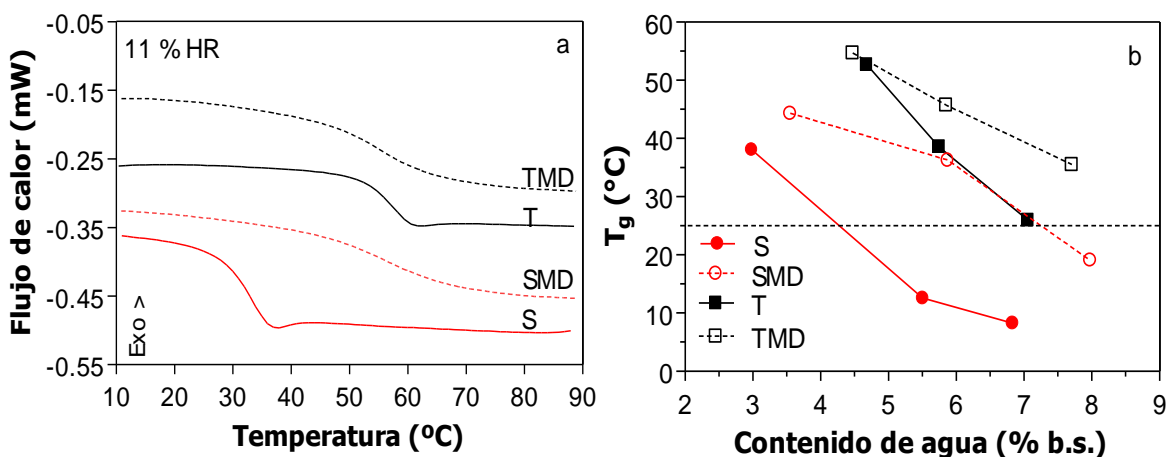


Figura 53. Termogramas obtenidos por DSC donde se presentan las transiciones vítreas de los diferentes polvos a 11 %HR (a), y los valores de T_g en función del contenido de agua (b). La línea de puntos indica la temperatura ambiente (25 °C).

Como se muestra en la **Figura 53b** el mantenimiento del estado vítreo a temperatura ambiente (25 °C) se puede lograr hasta diferentes HR según la formulación: hasta 33 %HR para las formulaciones TMD y T, 22 y 11 %HR, para SMD y S respectivamente. Se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en el caso de etanol encapsulado (**Figura 41**).

De la misma forma que el caso de etanol encapsulado (**Figura 42**), se estimó la movilidad molecular de los polvos determinando los tiempos de relajación transversal (T_2) mediante ^1H RMN después de la aplicación de un pulso único de 90° (método FID). Además, en este caso también se evaluaron los tiempos de relajación T_2 a diferentes temperaturas (entre 15 y 45 °C), de manera de tener las formulaciones en estado vítreo y sobreenfriado.

La **Figura 54** muestra los valores de T_2 a todas las HR estudiadas en función de la variable $T-T_g$, donde T es la temperatura y T_g la temperatura de transición vítreo a diferentes humedades relativas. Se puede observar que en el estado vítreo ($T-T_g < 0$) existe un ligero incremento en los valores de T_2 para todas las formulaciones analizadas. De la misma forma que lo observado en las formulaciones conteniendo etanol encapsulado (**Figura 42**), en la formulación S a 33 %HR se vio un efecto particular, mostrando un gran aumento de los valores de T_2 , superior a la tendencia mostrada a valores inferiores de HR.

Las formulaciones conteniendo mezclas de azúcar y MD mostraron valores similares (ligeramente superiores) de T_2 en comparación con las formulaciones del azúcar correspondiente en el estado vítreo, y no mostraron un aumento importante a temperaturas mayores que T_g a las temperaturas analizadas. Estos resultados

coinciden con los resultados observados en el caso de las formulaciones conteniendo etanol encapsulado (**Figura 42**).

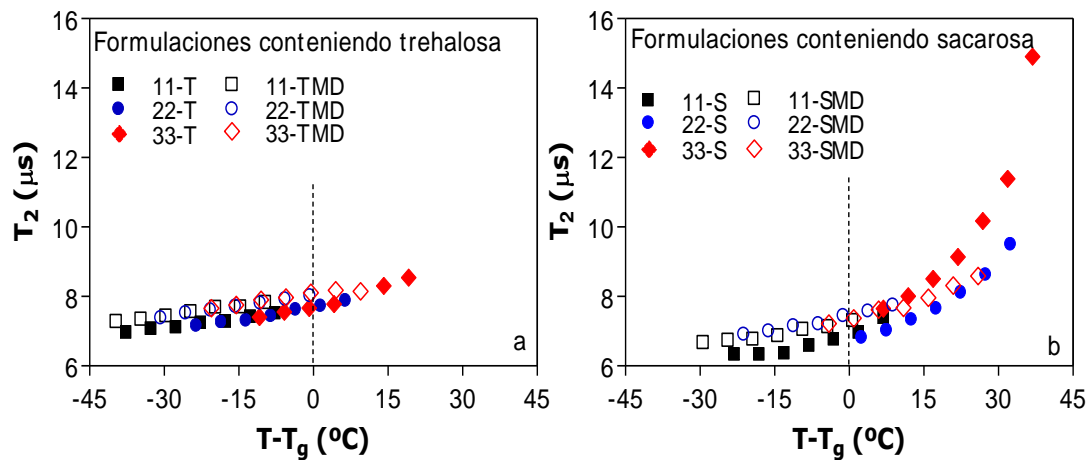


Figura 54. Tiempos de relajación T_2 obtenidos por ^1H RMN en función de la variable $(T-T_g)$, donde T es la temperatura (entre 15 y 45 °C) y T_g la temperatura de transición vítrea a diferentes HR para las para las formulaciones conteniendo trehalosa (a) y sacarosa (b).

IV.2.1.4 Retención de citral

En esta sección se analiza la retención de citral luego del secado spray. En este caso el objetivo fue evaluar la capacidad de las diferentes formulaciones para retener el volátil. Como el citral es un aroma que se podría incorporar en una formulación alimentaria, se decidió hacer tanto un estudio por cromatografía gaseosa como por análisis sensorial. Al cabo del secado, todas las formulaciones presentaron humedades relativas cercanas a 11 %HR, por lo tanto se encontraban en estado vítreo a temperatura ambiente (**Figura 53**).

En una primera instancia se realizó el test de comparación por pares para evaluar si las diferentes formulaciones retenían el citral en forma análoga. Se observó que los seis pares de muestras comparados (T-TMD, T-S, T-SMD, S-TMD, TMD-SMD, S-SMD) se percibieron en forma similar, pues no se presentaron diferencias significativas entre ningún par de muestras (**Tabla 16**). Este resultado

indica que la retención de citral para las formulaciones conteniendo sacarosa y trehalosa fue aproximadamente la misma, en las condiciones utilizadas en el presente trabajo.

Tabla 16. Discriminación entre las muestras a través del método de comparación por pares con elección forzada.

Pares	Muestra más intensa/respuestas totales
T y TMD	19 ^{ns} /30
T y S	16 ^{ns} /30
T y SMD	20 ^{ns} /30
S y TMD	20 ^{ns} /30
TMD y SMD	18 ^{ns} /30
S y SMD	15 ^{ns} /30

ns: no significativo

En una segunda instancia se realizó el análisis cuantitativo de la cantidad retenida de citral en las diferentes formulaciones. Se realizó una curva de calibración empleando soluciones de citral en un rango de concentración de 0 a 0,6 $\mu\text{L}/100\text{mL}$ (**Figura 55**) para calcular la concentración de citral retenida en las diferentes formulaciones.

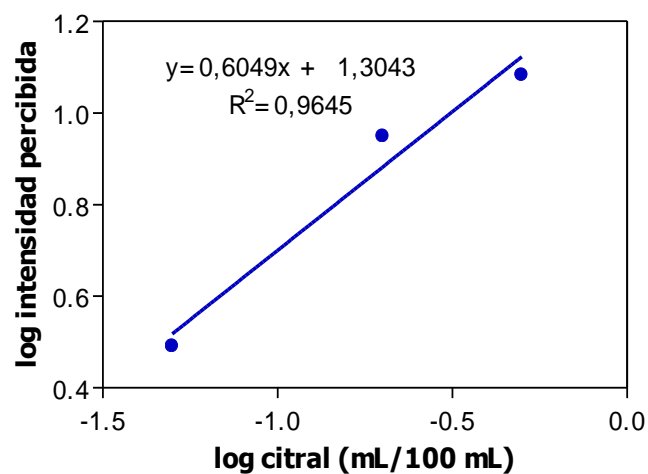


Figura 55. Curva de calibración de las soluciones de citral.

La **Figura 56** muestra la retención de citral evaluada por análisis sensorial y por cromatografía gaseosa (CG). No se observaron diferencias significativas en la retención de citral después del secado spray entre las distintas formulaciones evaluadas. Por análisis sensorial los valores fueron ligeramente mayores para la formulación SMD, mientras que los resultados de CG mostraron valores levemente más elevados para TMD. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas, por consiguiente, ambos pueden ser considerados dentro del error metodológico.

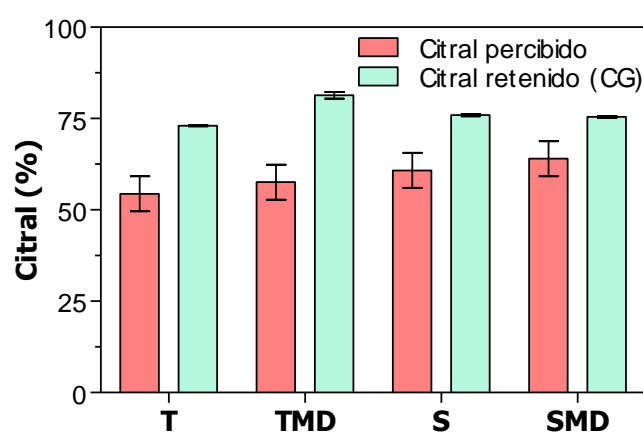


Figura 56. Porcentaje de citral retenido (CG) y percibido (evaluación sensorial) en las diferentes formulaciones. No se observaron diferencias significativas en CG ni en la evaluación sensorial ($p < 0,05$).

La retención analizada por CG alcanzó valores de aproximadamente 75 %. Las emulsiones obtenidas por agitación presentaron tamaños de gota relativamente grandes, que luego del secado spray se redujeron (**Figura 47**). Según Soottitawat y col. (2003), se incrementa la evaporación de los volátiles cuando se produce la ruptura de las gotas en la atomización. Esta podría ser una de las causas de las pérdidas elevadas de citral ocurridas en el secado.

Por otro lado, la retención obtenida para citral fue mucho mayor que la observada en el caso de etanol (**Figura 43**). Probablemente las propiedades del

compuesto encapsulado sean las responsables de estas diferencias, siendo el etanol mucho más volátil que el citral. Además, en este caso no se vieron diferencias en la capacidad de retención entre las formulaciones, y en el caso de etanol, el agregado de MD permitió incrementar la retención al menos 10 % más que para los azúcares solos.

IV.2.2 Aceite esencial de Naranja

IV.2.2.1 Caracterización de las emulsiones

En esta sección se describen los estudios realizados en emulsiones cuya fase continua está constituida por mezclas de maltodextrina (MD) y azúcares (trehalosa y sacarosa) como matrices, y dos almidones modificados comerciales (Capsul y Hi Cap) como emulsificantes. En este caso no se incluyeron formulaciones de azúcares en ausencia de MD (como las empleadas en la sección IV.2.1.1 en las formulaciones conteniendo citral) debido a que se observó que la estabilidad de las mismas era muy inferior a la observada para las mezclas con MD. La fase dispersa es un aceite esencial de naranja comercial. Además se comparan dos métodos de preparación de las emulsiones (agitación a alta velocidad y sonicación). Por otro lado, se analizan las características de las emulsiones reconstituidas de la misma forma que se realizó para el citral en la sección IV.2.1.2. En este caso, solo se estudiaron las ER sonicadas, debido a que se observó que las emulsiones frescas (EF) obtenidas por agitación presentaron muy baja estabilidad (sección IV.2.2.2).

IV.2.2.1.a Reometría

La **Figura 57** muestra las curvas de flujo obtenidas para las EF y ER analizadas a temperatura ambiente. Se analizaron emulsiones obtenidas por agitación a alta velocidad (**Figura 57a y b**) y por sonicación (**Figura 57c-f**).

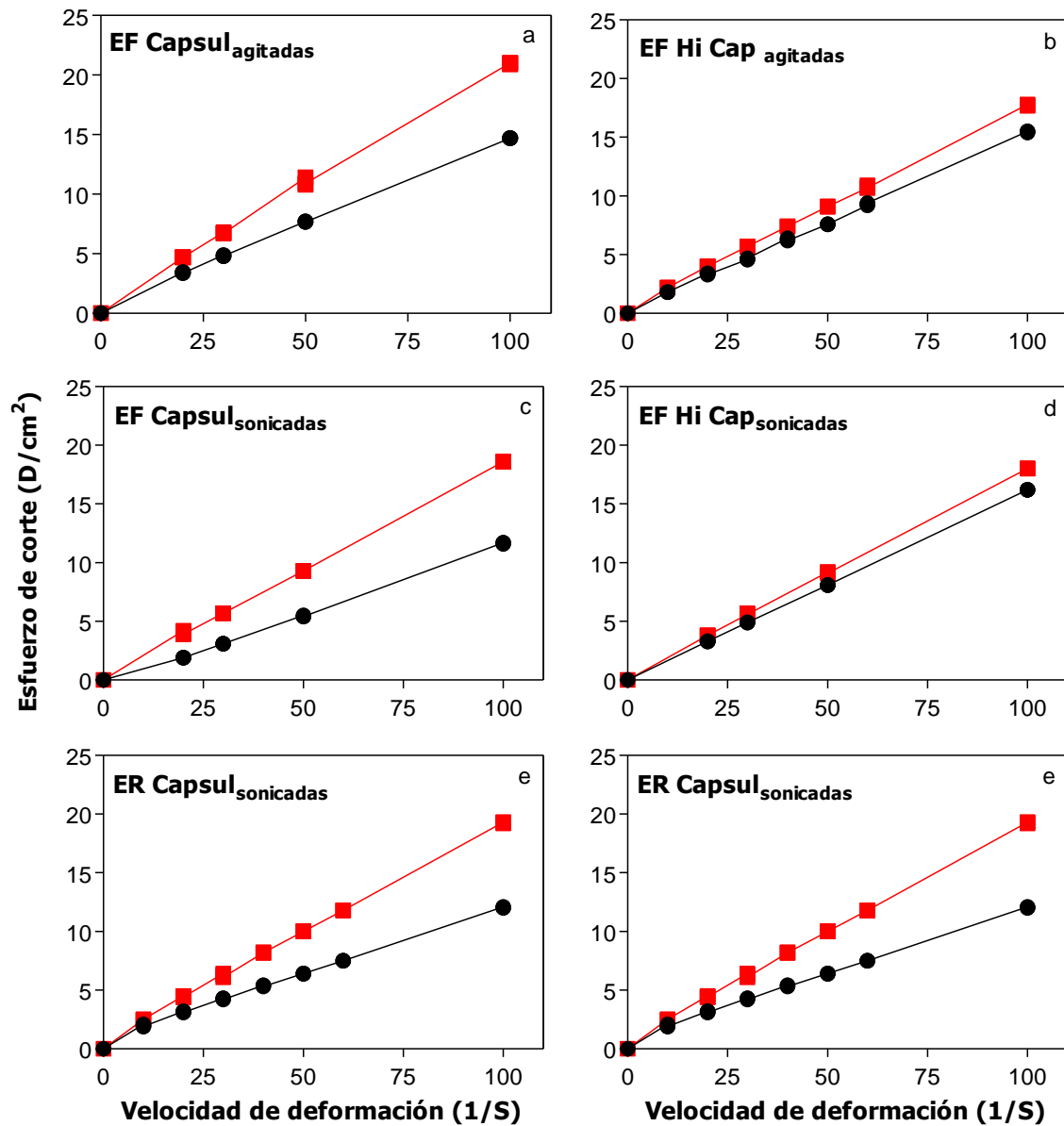


Figura 57. Curvas de flujo de EF (a-d) y ER (e y f) obtenidas empleando los métodos de agitación a alta velocidad y ultrasonido de alta intensidad para las formulaciones SMD (■) y TMD (●).

Para todas las emulsiones, el esfuerzo de corte aumentó linealmente a medida que la aumentaba la velocidad de deformación, mostrando el carácter Newtoniano de las emulsiones.

A partir de las curvas de la **Figura 57** se obtuvieron los valores de viscosidad de las diferentes emulsiones (**Figura 58**). También, en la **Figura 58** se muestran los valores de viscosidad obtenidos para el aceite esencial de naranja y las fases continuas por separado: soluciones acuosas conteniendo los diferentes componentes de la fase continua de las distintas formulaciones. En el caso de las EF, en general no se presentaron diferencias muy importantes para los valores de viscosidad entre los dos métodos empleados ni en cuanto a los almidones utilizados. Por otro lado, los valores de viscosidad para las EF conteniendo sacarosa fueron superiores a los presentados para las formulaciones TMD.

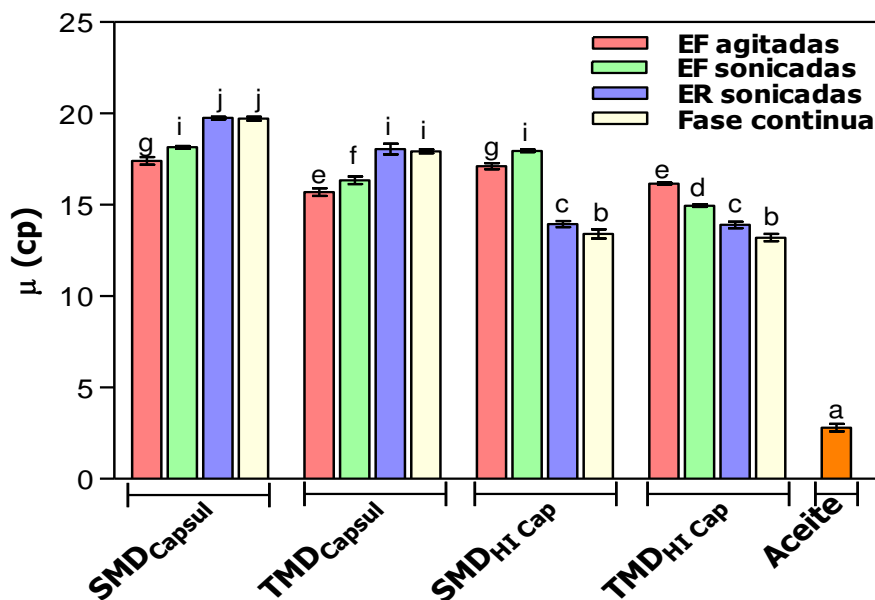


Figura 58. Valores de viscosidad para EF y ER agitadas, ER sonicadas, fase continua (soluciones conteniendo los diferentes componentes de la fase continua de las distintas formulaciones), y aceite esencial de naranja puro. Los promedios con distintas letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Además, las viscosidades de las EF_{Capsul} en general fueron menores a las de sus correspondientes fases continuas. En cambio en presencia de Hi cap se observó un comportamiento opuesto. En cuanto a las ER, el comportamiento fue diferente al de las EF, no se presentaron diferencias importantes entre SMD y TMD, pero si se observaron valores de viscosidad mayores en presencia de Capsul en comparación con las formulaciones conteniendo Hi Cap. Además las ER presentaron viscosidades similares a las de sus correspondientes fases continuas.

En la **Tabla 18** se presentan todos los valores obtenidos de la aplicación de la Ley de la Potencia a los datos experimentales para las diferentes emulsiones. Los valores de índice de consistencia similares a los de viscosidad, y los correspondientes al índice de flujo cercanos a la unidad son indicadores de fluidos con carácter Newtoniano.

Tabla 18. Atributos reológicos que caracterizan a EF, ER y fase continua. Emulsiones preparadas empleando agitación a alta velocidad y ultrasonido de alta intensidad. Los valores de μ corresponden a la viscosidad, K al índice de consistencia y n al índice de flujo.

	Formulaciones	μ (cp)	K (cp)	n
Agitadas	EF SMD _{Capsul}	17,400 ± 0,212 ^b	17,600 ± 0,242 ^b	0,935 ± 0,001
	EF SMD _{Hi Cap}	17,113 ± 0,175 ^c	19,050 ± 0,071 ^c	0,953 ± 0,003
	EF TMD _{Capsul}	15,700 ± 0,212 ^b	18,200 ± 0,135 ^b	0,940 ± 0,001
	EF TMD _{Hi Cap}	16,161 ± 0,053 ^b	17,100 ± 0,071 ^b	0,974 ± 0,001
Sonicadas	EF SMD _{Capsul}	18,150 ± 0,071 ^f	20,600 ± 0,141 ^f	0,970 ± 0,020
	EF SMD _{Hi Cap}	17,950 ± 0,071 ^g	17,421 ± 0,128 ^g	0,905 ± 0,008
	EF TMD _{Capsul}	16,350 ± 0,212 ^f	19,500 ± 0,010 ^f	0,952 ± 0,010
	EF TMD _{Hi Cap}	14,950 ± 0,071 ^g	15,300 ± 0,14 ^g	0,995 ± 0,001
	ER SMD _{Capsul}	19,750 ± 0,071 ^e	22,000 ± 0,010 ^e	0,920 ± 0,070
	ER SMD _{Hi Cap}	13,950 ± 0,071 ^f	15,900 ± 0,114 ^f	0,903 ± 0,003
	ER TMD _{Capsul}	18,050 ± 0,495 ^{d,e}	17,100 ± 0,141 ^{d,e}	0,901 ± 0,010
	ER TMD _{Hi Cap}	13,900 ± 0,141 ^f	15,800 ± 0,283 ^f	0,900 ± 0,001

* Los promedios con distintas letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

IV.2.2.1.b Distribución y tamaño de gota

El método de preparación tiene gran influencia sobre las características de las emulsiones resultantes. Una mayor energía entregada al sistema permite obtener emulsiones de menor diámetro de partícula y más estables, siempre que haya en la fase continua suficiente emulsificante para cubrir esta mayor superficie creada. El tiempo que tarda un emulsificante en adsorberse en la superficie de las gotas recién formadas también es un factor determinante del tamaño de gota final en una emulsión (McClements, 1999).

La **Figura 59** exhibe la distribución de tamaños de gotas en volumen, obtenida mediante la técnica de dispersión estática de luz láser, de las EF agitadas, EF sonicadas y ER sonicadas.

Las emulsiones estudiadas presentaron una distribución de tamaño de gota tendiente a la monomodalidad. Puede verse una distribución Gaussiana mostrando la existencia de una población dominante. Este hecho fue corroborado con la distribución de tamaño de gota en términos de número, donde se observó sólo un pico, indicando la presencia de una única población dominante.

En cuanto al tamaño de gota, las EF agitadas mostraron diámetros promedio de gota entre 2 y 3 micrones. En contraste, las formulaciones sonicadas resultaron submicrónicas, teniendo las EF aproximadamente 0,15 μm en el caso de TMD (**Figura 59b y d**) y 0,24 μm en el caso de SMD (**Figura 59a y c**), y 0,5 μm todas las ER (**Figura 59a-d**). En general no se observaron cambios importantes, con los diferentes emulsificantes empleados.

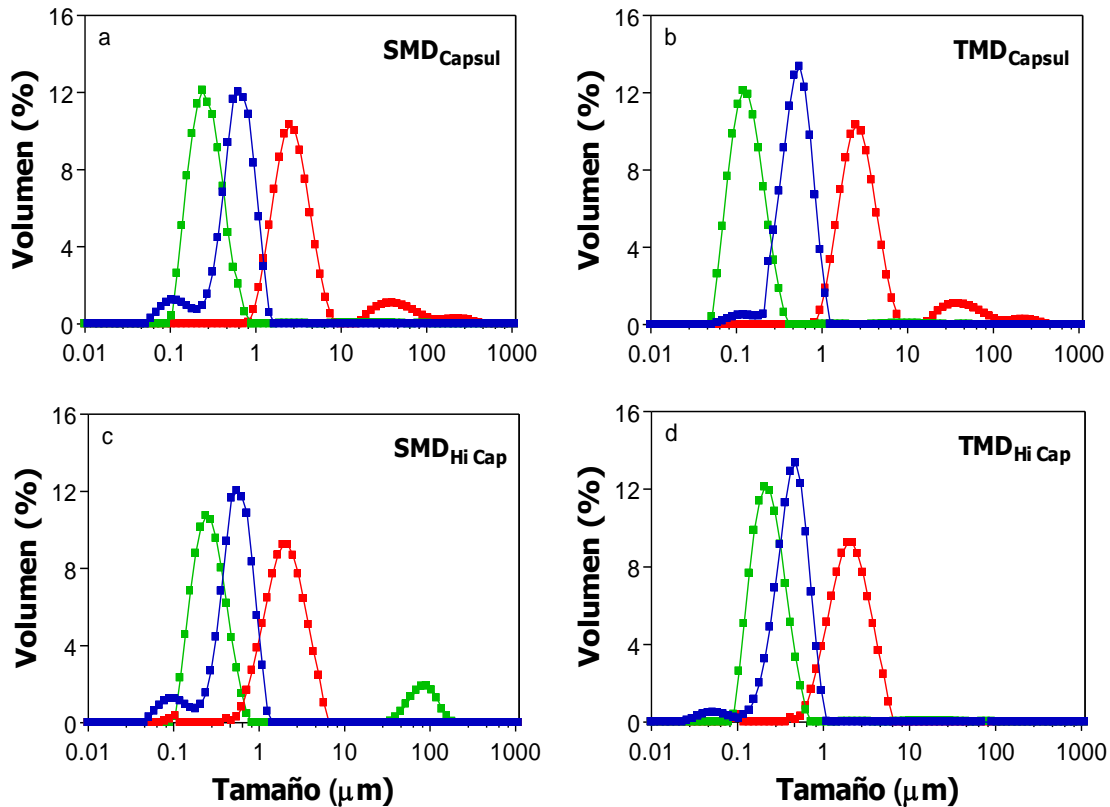


Figura 59. Distribución de tamaños de gota de EF agitadas (■), EF sonicadas, (■) y ER sonicadas (■). SMD_{Capsul} (a), TMD_{Capsul} (b), SMD_{Hi Cap} (c) y SMD_{Hi Cap} (d).

En la **Figura 60** se presentan los valores obtenidos para los diámetros $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$, ambos derivados de la distribución del tamaño de gota. Similarmente a la metodología empleada para las emulsiones conteniendo citral (sección IV.2.1.1.b), se utilizaron estos parámetros para caracterizar la distribución del tamaño de las gotas de las emulsiones conteniendo aceite de naranja.

En cuanto a la variable $D_{3,2}$ (**Figura 60a**), las EF obtenidas empleando el método de agitación a alta velocidad presentaron valores mucho mayores que las EF sonicadas. Por otro lado, las EF agitadas conteniendo Hi Cap presentaron valores menores de $D_{3,2}$ que los observados para las formulaciones conteniendo Capsul. En cuanto al azúcar empleado, en general no se presentaron diferencias muy importantes entre las formulaciones. Las ER presentaron diámetros levemente

mayores a los obtenidos para las EF, esto podría deberse a cambios provocados en el pasaje de las emulsiones por la boquilla del secador spray. Esta característica se diferencia de los resultados observados para las formulaciones conteniendo citral (**Figura 48**), pero se debe a que estas últimas se obtuvieron por agitación, y el diámetro de las EF era originalmente mucho mayor (**Figura 48**).

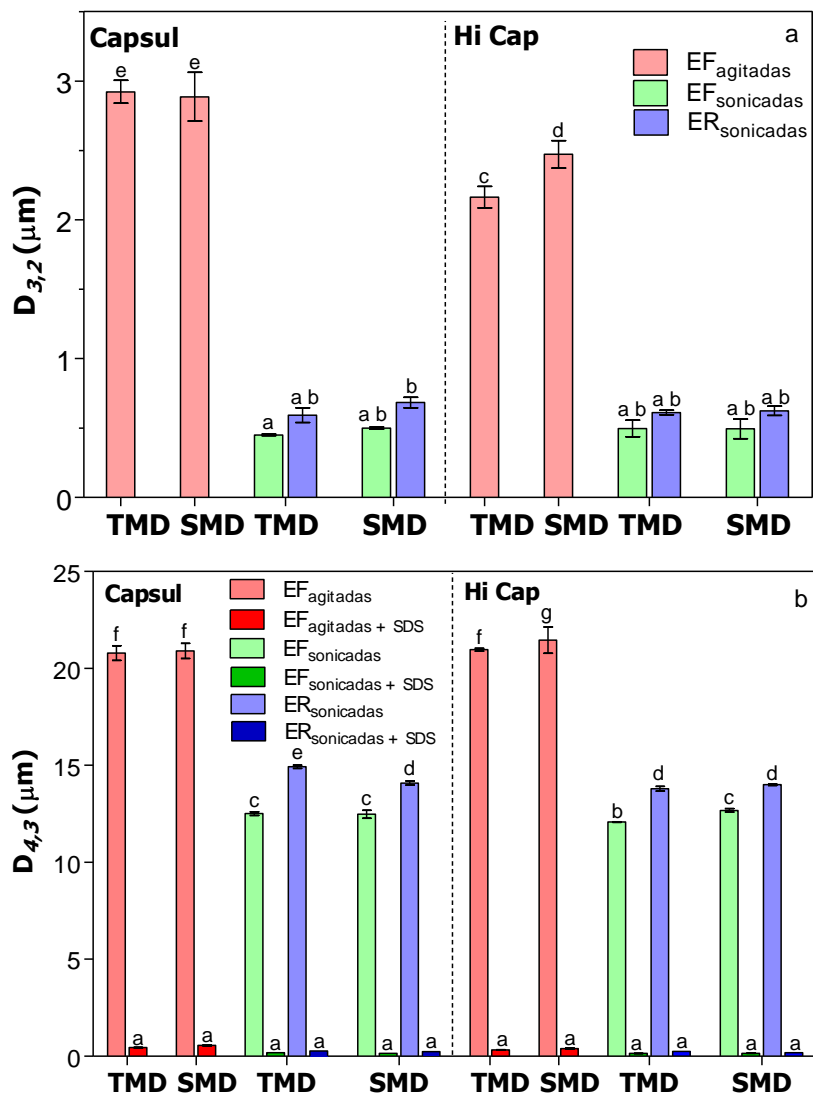


Figura 60. Parámetros obtenidos de las mediciones por dispersión estática de luz: $D_{3,2}$ (a) y $D_{4,3}$ (b) para EF, EF + SDS y ER. Los promedios con distintas letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Se analizó la influencia de la viscosidad sobre el diámetro de gota para las formulaciones conteniendo aceite de naranja encapsulado en comparación con aquellas conteniendo citral (**Figura 61**). Las diferencias observadas en los valores de $D_{3,2}$ no presentan una correlación directa con los resultados de viscosidad de las emulsiones correspondientes.

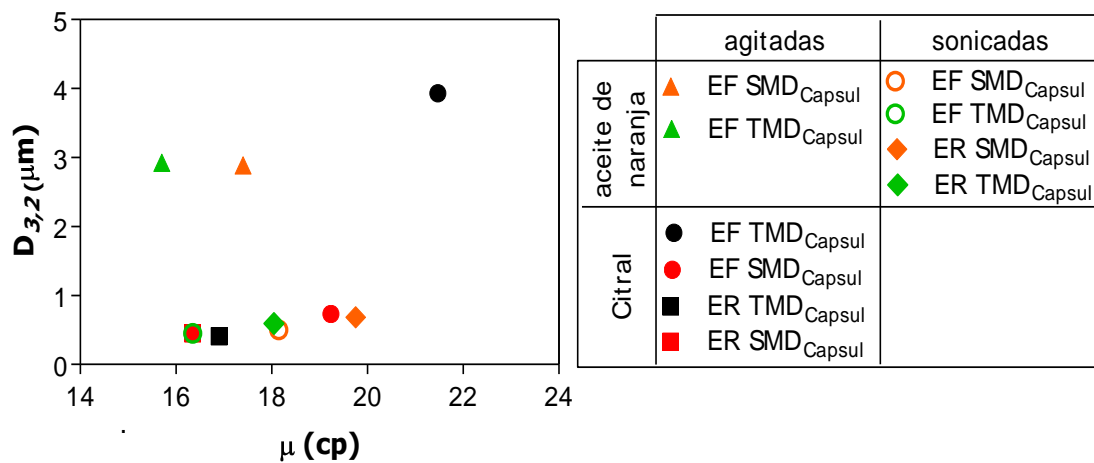


Figura 61. Influencia de la viscosidad sobre el diámetro de gota ($D_{3,2}$) para las formulaciones conteniendo aceite de naranja encapsulado en comparación con las formulaciones conteniendo citral encapsulado.

La variable $D_{4,3}$ se presenta en la **Figura 60b**. Los valores de $D_{4,3}$ fueron más elevados que los de $D_{3,2}$ en todos los casos, siendo más altos para las formulaciones agitadas que para las sonicadas. Se observa que los valores de $D_{4,3}$ son muy inferiores (máximo 22 micrones) que los presentados por las formulaciones conteniendo citral (máximo 332,7 micrones) (**Figura 48b**). El agregado de SDS mostró en todos los casos una reducción significativa de los valores de $D_{4,3}$ indicando la ocurrencia de procesos de floculación en todos los casos analizados.

Jafari y col. (2007) prepararon emulsiones O/W conteniendo d-limoneno, empleando como carriers maltodextrina y almidón modificado, y realizando agitación mecánica y sonicación. Estos autores encontraron que tanto los valores de $D_{3,2}$ como

de $D_{4,3}$ eran tres veces mayores en las emulsiones preparadas con agitación mecánica que las preparadas con ultrasonidos.

IV.2.2.1.c Movilidad molecular

Se estimó la movilidad molecular del agua en las diferentes emulsiones, tanto EF como ER, mediante la determinación de los tiempos T_2 de la misma forma que se analizó para las formulaciones conteniendo citral (IV.2.1.1.c). Para ello se utilizó la secuencia de pulsos CPMG (**Figura 62**).

Se encontraron dos poblaciones de diferente movilidad representadas por distintos tiempos de relajación. Las poblaciones menos móviles están representadas por valores de T_2 (T_{2-1}) de aproximadamente 40 ms (**Figura 62a**), y las poblaciones más móviles por valores de T_2 (T_{2-2}) de aproximadamente 340 ms (**Figura 62b**). Los valores de T_{2-1} fueron similares para todas las formulaciones analizadas, y en el caso de T_{2-2} se observó un leve aumento de movilidad en presencia de sacarosa. No hubo diferencias respecto a los almidones utilizados, ni entre EF y ER. Los resultados fueron similares a los observados para las formulaciones conteniendo citral (**Figura 49**).

IV.2.2.2 Estabilidad de las emulsiones

En esta sección se estudió la estabilidad de las emulsiones empleando el análisis del perfil de back scattering. Los perfiles de BS en función de la longitud del tubo se analizaron inmediatamente después de preparar la emulsión ($t=0$) y a distintos tiempos, para las EF obtenidas empleando el método de agitación de alta velocidad (**Figura 63**). Las formulaciones preparadas por el método de ultrasonido

de alta intensidad se muestran en las **Figuras 64** y **65** para las EF y ER respectivamente.

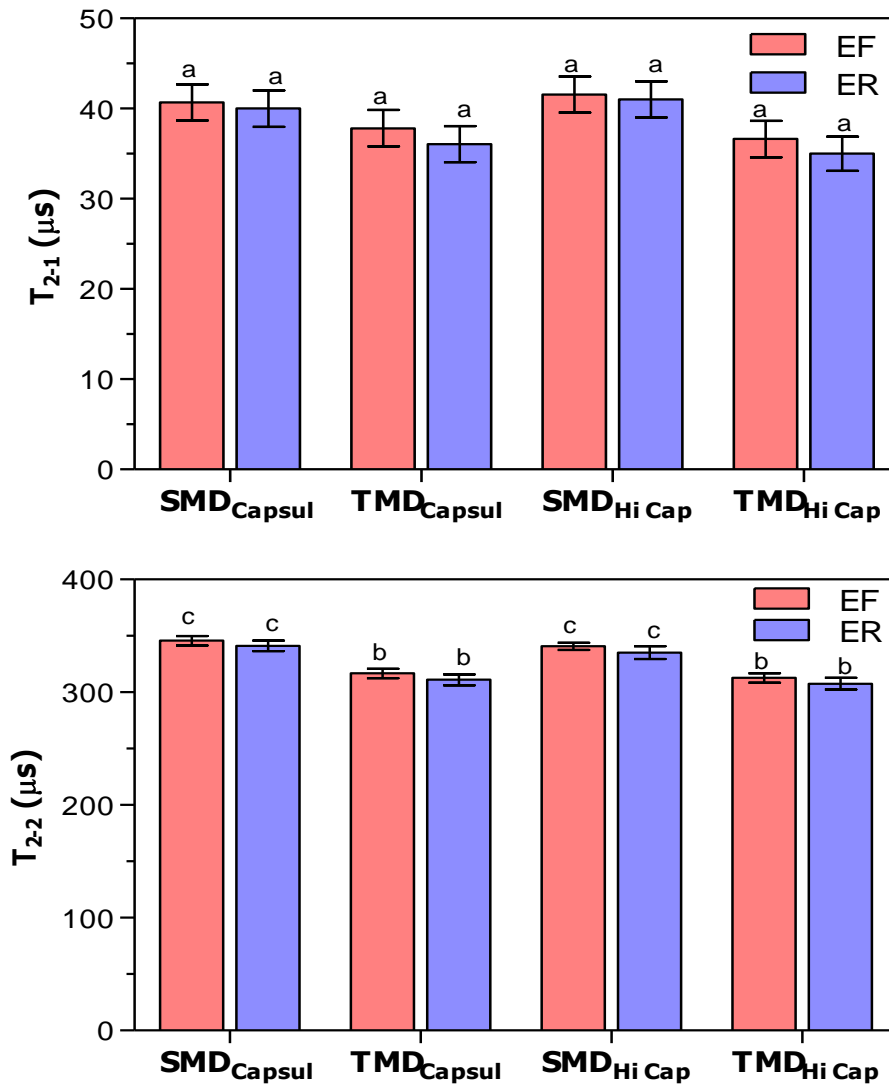


Figura 62. Tiempos de relajación T_2 obtenidos por ^1H -RMN luego de aplicar la secuencia de pulsos CPMG. Los promedios con distintas letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Las EF obtenidas por agitación (**Figura 63**) presentaron una disminución del valor de BS a lo largo del tubo. Este fenómeno, observado desde los 30 minutos de almacenamiento, indica la floculación de las emulsiones (Palazolo y col., 2004; Cerdeira y col., 2007). Además a tiempo cero las EF agitadas presentaron espuma que se manifiesta como un pico en la parte superior del tubo. En el caso de las EF

conteniendo citral el fenómeno de floculación también se presentó a la media hora de almacenamiento aunque no se observó espuma (**Figura 50**).

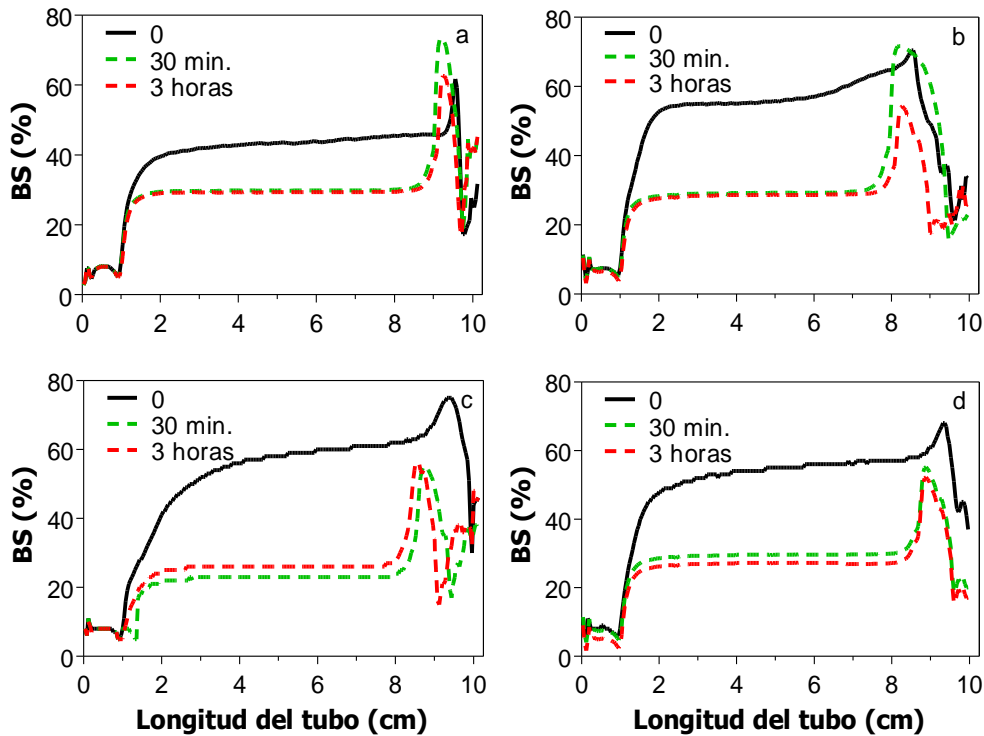


Figura 63. Perfiles de Back scattering (BS) en función de la longitud del tubo (la dirección de la flecha indica el incremento del tiempo) para EF obtenidas empleando agitación a alta velocidad. SMD_{Capsul} (a), TMD_{Capsul} (b), SMD_{HiCap} (c) y TMD_{HiCap} (d).

En el caso de las emulsiones sonicadas también se observó floculación, pero en un nivel mucho menor. Este fenómeno se detectó después de la primera hora de almacenamiento (**Figuras 64** y **65**). En ninguno de los casos se observaron diferencias importantes debidas a la composición de las formulaciones. Como en el caso de citral (**Figuras 50** y **51**), se realizó la evaluación a las 24 horas para las ER considerando que el aceite esencial de naranja encapsulado también podría incorporarse a jugos cítricos deshidratados. Se observó un incremento moderado en la floculación (**Figura 65**). Este comportamiento fue similar a lo observado para el caso de citral (**Figura 51**).

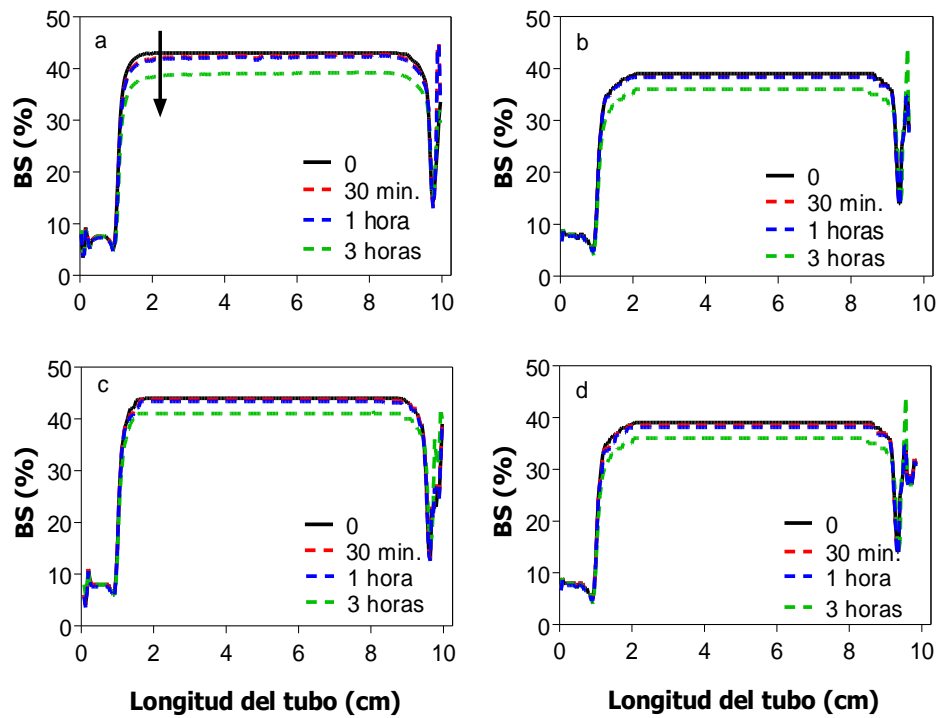


Figura 64. Perfil de Back scattering (BS) en función de la longitud del tubo (la dirección de la flecha indica el incremento del tiempo) para EF sonicadas. SMD_{Capsul} (a), TMD_{Capsul} (b), y SMD_{HiCap} (c) y TMD_{HiCap} (d).

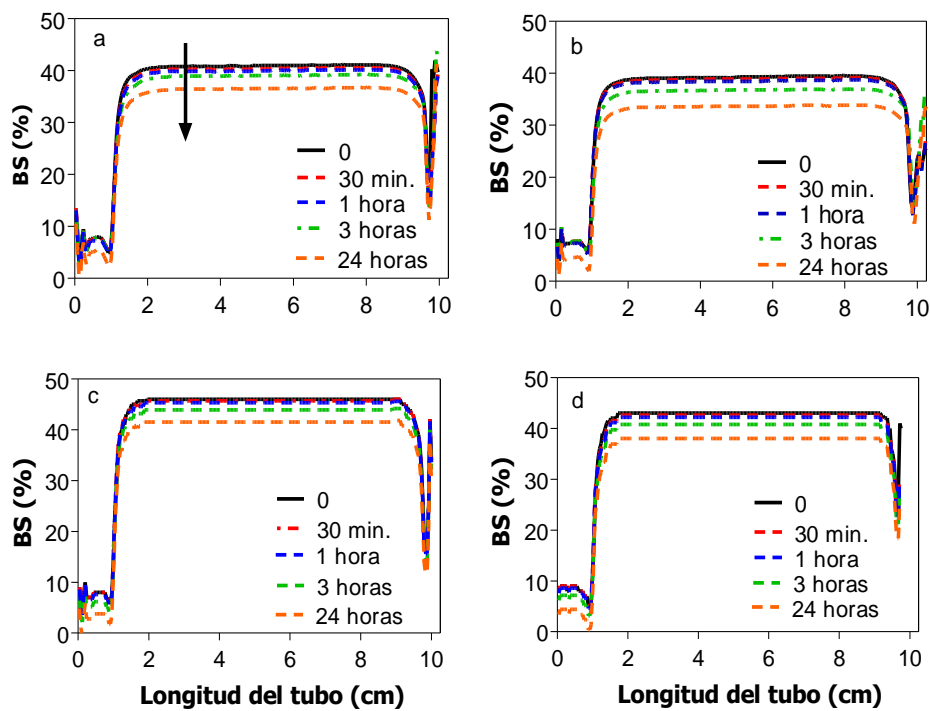


Figura 65. Perfil de Back scattering (BS) en función de la longitud del tubo (la dirección de la flecha indica el incremento del tiempo) para ER sonicadas. SMD_{Capsul} (a), TMD_{Capsul} (b), y SMD_{HiCap} (c) y TMD_{HiCap} (d).

IV.2.2.3 Caracterización de los polvos conteniendo aceite esencial de naranja encapsulado

En esta sección se analizan algunas propiedades físicas para las diferentes formulaciones conteniendo aceite esencial de naranja encapsulado por secado spray. Estas formulaciones se obtuvieron generando las emulsiones por sonicación, debido a que se observó que las emulsiones obtenidas por agitación presentaron muy baja estabilidad.

Con el fin de caracterizar las diferentes formulaciones se determinaron: las propiedades de sorción de agua a 25 °C, las temperaturas de transición vítrea (T_g), y la movilidad molecular de los sólidos y el agua fuertemente asociada a los sólidos mediante la determinación de los tiempos de relajación (T_2) por ^1H RMN. Se seleccionó el mismo rango de humedad relativa (entre 11 y 33 %) empleado en el caso de las formulaciones conteniendo etanol y citral encapsulado.

Además, se analizó la pérdida del aceite de naranja de luego del secado y en el almacenamiento a dos temperaturas (25 y 37 °C), por cromatografía gaseosa y por análisis sensorial.

IV.2.2.3.a Propiedades de sorción de agua

En la **Figura 66** se presentan las isotermas de sorción de agua después de 15 días de humidificación a 25 °C para los diferentes polvos conteniendo aceite de naranja encapsulado. Como se mencionó en la sección IV.1.1.1, los valores de contenido de agua deben ser considerados en pseudo-equilibrio (Makower y Dye, 1965; Yu y col., 2008).

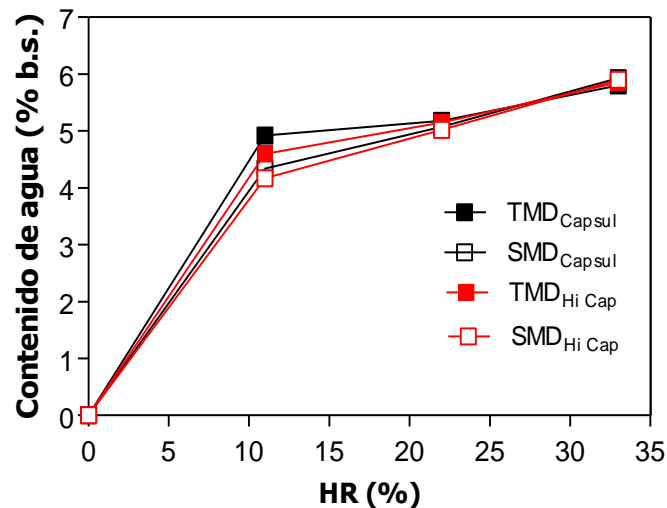


Figura 66. Isotermas de sorción de agua a 25 °C.

En general, las formulaciones presentaron contenidos de agua inferiores a los obtenidos para las correspondientes conteniendo citral encapsulado (**Figura 52**) indicando la influencia del volátil encapsulado sobre las propiedades de sorción.

IV.2.2.3.b Transiciones térmicas y movilidad molecular

La **Figura 67a** muestra termogramas típicos obtenidos por calorimetría diferencial de barrido (DSC), en donde se presentan las temperaturas de transición vítrea (T_g) para las diferentes formulaciones a 11 %HR. Los valores de T_g en función del contenido de agua se presentan en la **Figura 67b**. Se observó que los valores de T_g para las formulaciones SMD resultaron inferiores a los de las formulaciones TMD. Además se vio que el mantenimiento del estado vítreo se logró a temperatura ambiente (25 °C) para las formulaciones TMD hasta 33 %HR. En cambio las formulaciones SMD mantuvieron el estado vítreo hasta 22 %HR. Se obtuvieron valores de T_g mayores que los correspondientes a las formulaciones conteniendo

citral (**Figura 53**). Esto podría deberse a que los contenidos de agua fueron inferiores a los mostrados en el caso de citral.

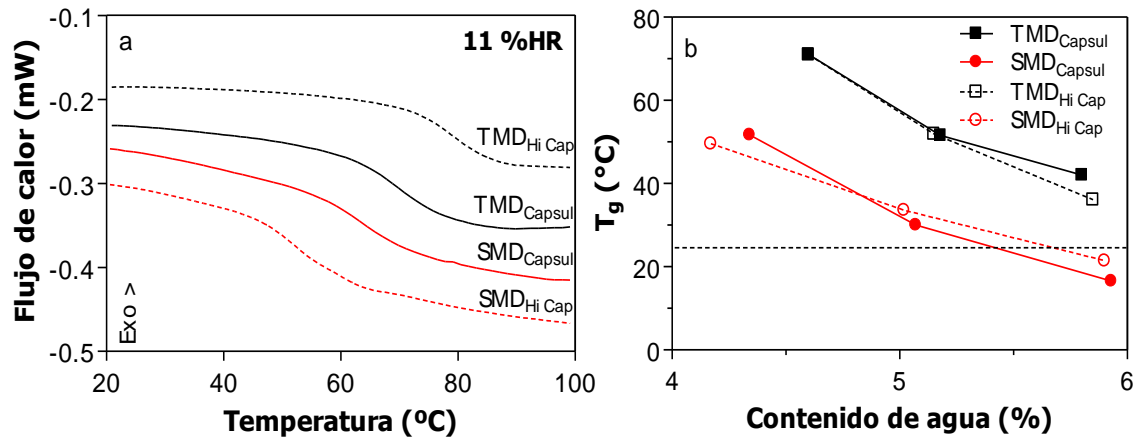


Figura 67. Termogramas obtenidos por DSC en donde se presentan las transiciones vítreas de los diferentes polvos a 11 %HR (a), y los valores de T_g en función del contenido de agua (b). La línea de puntos indica la temperatura ambiente (25 °C).

En la **Figura 68** se presentan los valores de los tiempos de relajación transversal (T_2) obtenidos mediante ^1H RMN después de la aplicación de un pulso único de 90° (método FID) a todas las HR estudiadas en función de la variable $T-T_g$. Como en los casos anteriores (etanol y citral), el análisis se llevó a cabo en un rango de temperatura entre 15 y 45 °C. En general se observó que en el estado vítreo ($T-T_g < 0$) existe un leve incremento en los valores de T_2 para todas las formulaciones, de la misma forma que lo mostrado en presencia de etanol (**Figura 42**) y citral (**Figura 54**). Por otro lado, en este caso se observó un comportamiento diferente del presentado por las formulaciones conteniendo etanol (**Figura 42**) y citral (**Figura 54**), mostrando valores de T_2 superiores tanto para TMD como para SMD. Estos resultados indican un efecto específico del aceite de naranja sobre la movilidad en los polvos dado que teniendo contenidos de agua más bajos que en el caso de citral mostraron una mayor movilidad molecular.

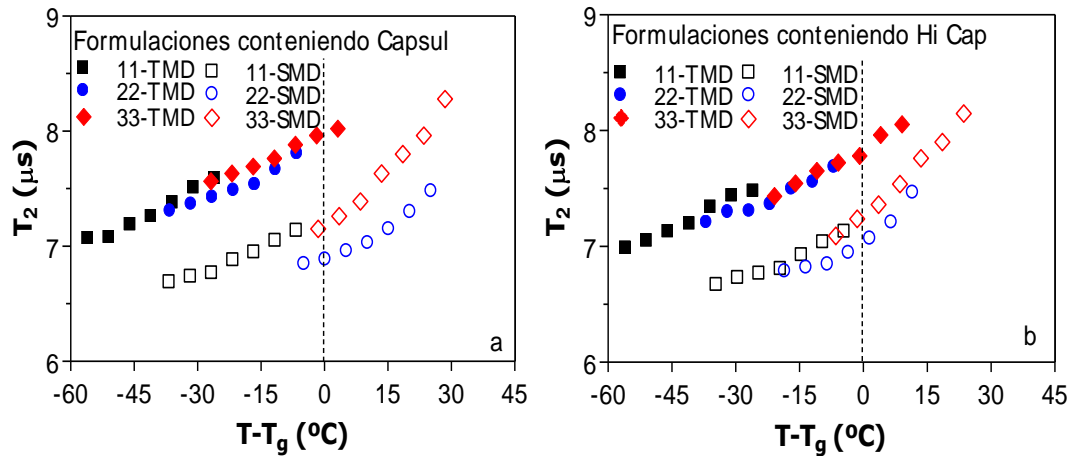


Figura 68. Tiempos de relajación T_2 obtenidos por ^1H RMN en función de la variable $(T-T_g)$, donde T es la temperatura (entre 15 y 45 °C) y T_g la temperatura de transición vítrea a diferentes HR para las formulaciones conteniendo Capsul (a) y Hi Cap (b).

IV.2.2.3.c Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En la **Figura 69** se presenta la morfología externa de los polvos conteniendo aceite esencial de naranja encapsulado. Se observó que las formulaciones conteniendo Hi Cap presentaron gotas esféricas con una superficie lisa, sin la percepción de aceite superficial. Estos resultados concuerdan con los de Penbunditkul y col. (2011), quienes estudiaron la morfología externa de polvos secados por spray conteniendo aceite de bergamota y Hi Cap en una concentración de sólidos del 40 % p/p.

En cuanto a las formulaciones conteniendo Capsul se observaron gotas más alargadas, pero con una superficie lisa al igual que las formulaciones conteniendo Hi Cap. Soottitawat y col. (2005) observaron morfologías similares en al encapsular d-limoneno por secado spray, utilizando como carriers goma arábica (GA), Hi Cap, o la mezcla 50:50 GA/MD en una concentración de sólidos del 20 % p/p.

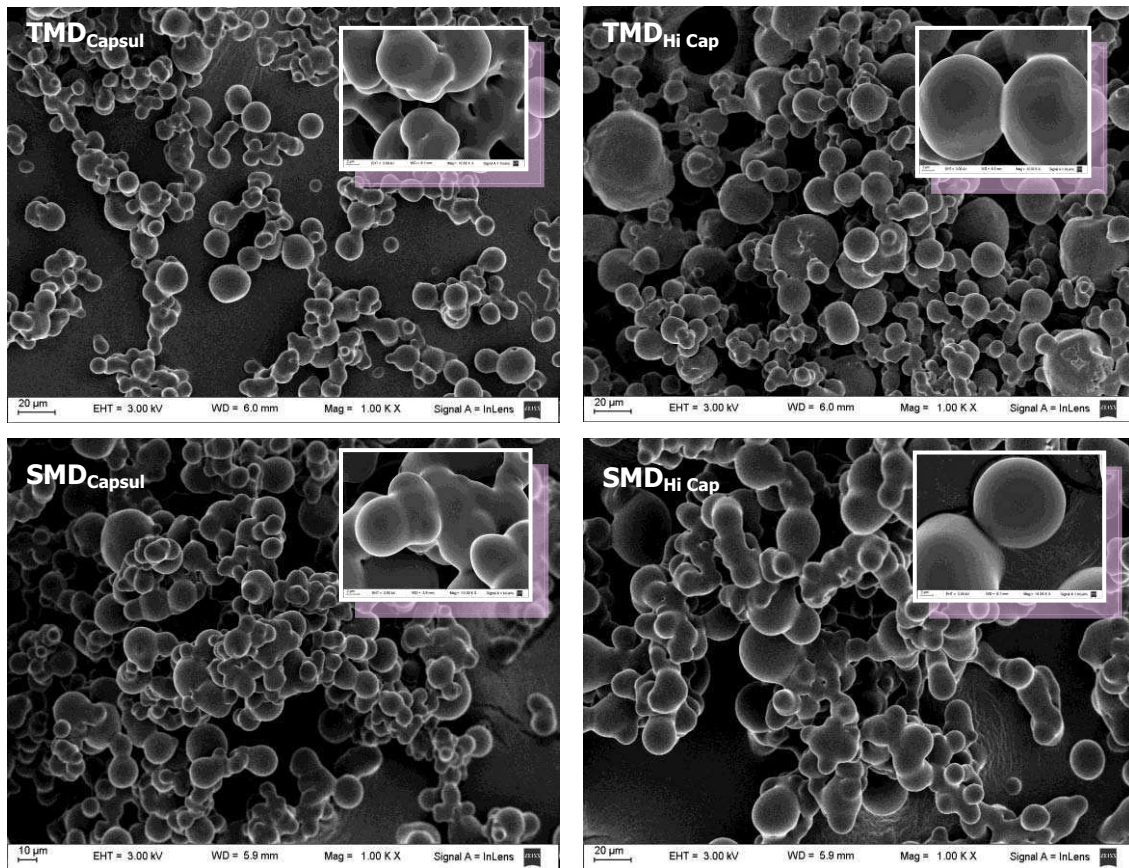


Figura 69. Micrografías SEM de la superficie de las partículas de los polvos conteniendo aceite esencial de naranja encapsulado empleando un aumento de 1000x. Las figuras insertas muestran un aumento de 5000x.

IV.2.2.4 Retención de aceite esencial de naranja

En esta sección se analiza la retención del aceite esencial de naranja luego del secado spray. En base a los resultados observados en los estudios sobre las propiedades físicas, se seleccionaron las condiciones de interés para evaluar la retención de aceite esencial de naranja. Por lo tanto en esta sección se analiza la capacidad de las diferentes formulaciones para retener el volátil, teniendo en cuenta el almacenamiento a diferentes temperaturas (temperatura ambiente, 25 °C y una condición más desfavorable, 37 °C). Al cabo del secado, las formulaciones se almacenaron durante 15 días a 11 %HR con el fin de unificar la HR para comparar los comportamientos en los tratamientos posteriores.

Teniendo en cuenta que el aceite esencial de naranja es un aroma que se podría incorporar en una formulación alimentaria, se decidió hacer tanto un estudio por cromatografía gaseosa como por análisis sensorial. En una primera instancia se realizó la prueba de Agrupamiento de muestras similares (Sorting task) con las formulaciones almacenadas a distintos tiempos. Se seleccionaron las muestras que presentaban las mayores diferencias entre si con el fin de realizar luego un perfil descriptivo del aroma de naranja.

IV.2.2.4.1 Análisis por cromatografía gaseosa

Estudio de la retención global de aceite esencial de naranja

En la **Figura 70** se presenta el porcentaje de aceite esencial de naranja retenido por las diferentes formulaciones al cabo de 15 días de almacenamiento a 11 %HR a 25 °C (tiempo cero).

No se observaron diferencias estadísticas en cuanto a la retención de aceite esencial de naranja por parte de las formulaciones. Teniendo en cuenta la composición inicial (**Tabla 12**) se vio que todas las formulaciones perdieron un 20 % del aroma. En cuanto a los distintos azúcares y almidones modificados empleados, se observa que la formulación TMD_{HiCap} presentó un leve incremento en la retención (78,8 %) y que SMD_{Capsul} experimentó la retención más baja (72,3 %), aunque las diferencias no son estadísticamente significativas. Los porcentajes obtenidos fueron similares a los observados en el caso de la encapsulación de citral (**Figura 56**).

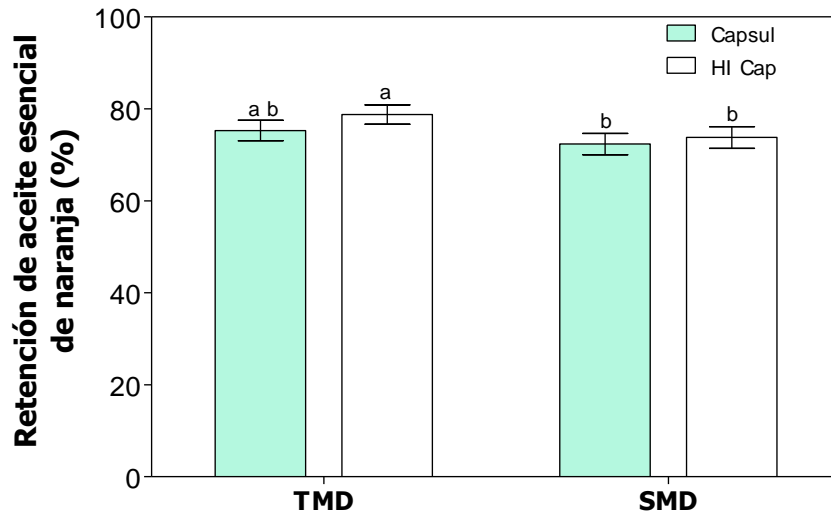


Figura 70. Porcentaje de aceite esencial de naranja retenido en las distintas formulaciones almacenadas 15 días a 11 %HR a 25 °C. Los promedios con distintas letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

En la **Figura 71** se muestra el porcentaje de aceite esencial de naranja, retenido por las cuatro formulaciones, durante el almacenamiento a dos temperaturas: 25 °C (**Figura 71a**) y 37 °C (**Figura 71b**). En general se observa que hubo una pérdida gradual del aroma en el tiempo, siendo las formulaciones TMD las que retuvieron mayores porcentajes de aroma. Además, se observaron pérdidas mucho mayores a 37 °C, alcanzando valores inferiores al 55 % a los 9 meses de almacenamiento. Con respecto al efecto de los almidones empleados como emulsificantes, se presentó un comportamiento diferente para los dos azúcares empleados. En presencia de sacarosa fue indistinto el almidón utilizado, mientras que en presencia de trehalosa se observaron pérdidas mayores cuando se utilizó Capsul.

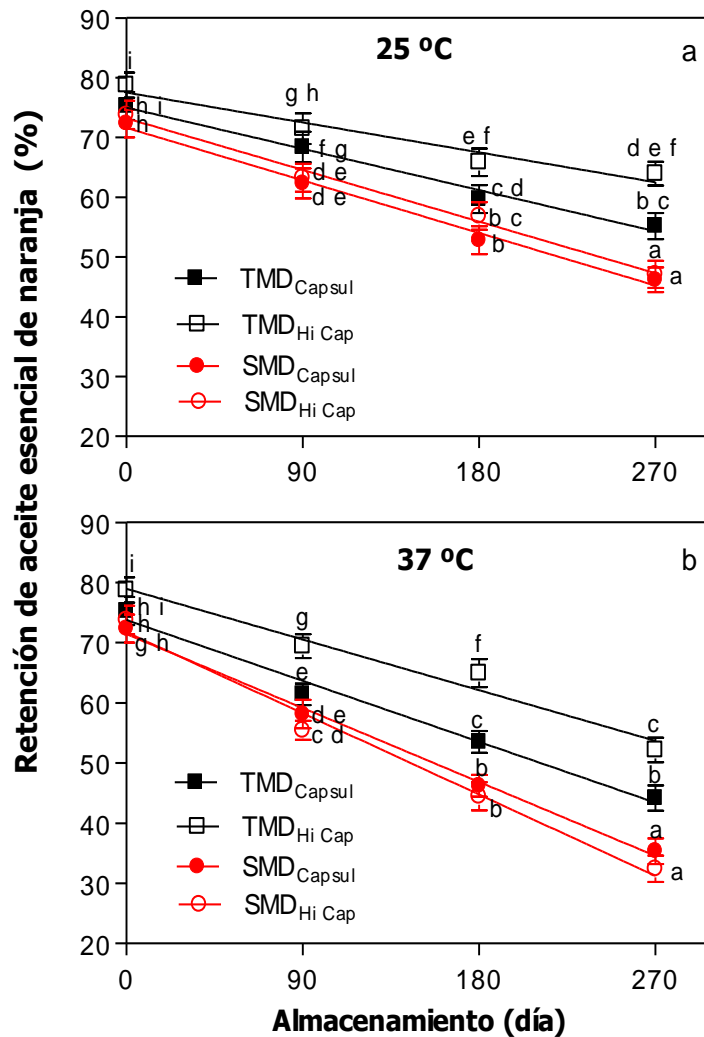


Figura 71. Porcentaje de aceite esencial de naranja retenido en las distintas formulaciones almacenadas a 25 °C (a) y 37 °C (b). Los promedios con distintas letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Descripción de los perfiles cromatográficos

Para realizar el estudio del efecto de los diferentes tratamientos se emplearon los cinco componentes volátiles mayoritarios representativos del aroma de aceite esencial de naranja.

El análisis del espacio cabeza de las diferentes formulaciones mostró que los componentes volátiles encontrados en mayor proporción fueron terpenos (α -pineno, sabineno, mirceno, y limoneno) habiendo también n-octanol y heptanal. Todos los

compuestos encontrados han sido extensamente reportados en la literatura como característicos de la naranja (Radford y col., 1974; Ahmed y col., 1978; Jordán y col., 2001).

En la **Tabla 17** se presenta la concentración de los principales compuestos volátiles hallados en el espacio de cabeza al cabo de los 15 días de almacenamiento a 11 %HR a 25 °C (tiempo cero). El volátil mayoritario encontrado en el aceite de naranja fue el limoneno y se observaron diferencias significativas en la retención entre las distintas formulaciones: $TMD_{Capsul} > TMD_{Hi\ Cap} > SMD_{Hi\ Cap} > SMD_{Capsul}$. El resto de los volátiles se encontraron en menor proporción y en cantidades similares en los distintos polvos.

Tabla 17. Concentraciones de los componentes volátiles del aceite esencial de naranja encapsulado en diferentes formulaciones obtenidas por SPME-CG a tiempo cero.

Componentes volátiles	Concentración (ppm)			
	TMD_{Capsul}	$TMD_{Hi\ Cap}$	SMD_{Capsul}	$SMD_{Hi\ Cap}$
<i>Alcoholes</i>				
n-octanol	0,17 ± 0,01 ^a	0,10 ± 0,01 ^a	0,36 ± 0,00 ^a	0,19 ± 0,01 ^a
<i>Aldehídos</i>				
Heptanal	nd	0,20 ± 0,023 ^a	nd	nd
<i>Terpenos</i>				
α-pineno	0,50 ± 0,02 ^a	0,37 ± 0,03 ^a	0,49 ± 0,04 ^a	0,51 ± 0,03 ^a
Sabineno	0,23 ± 0,02 ^a	0,19 ± 0,02 ^a	0,33 ± 0,04 ^a	0,30 ± 0,02 ^a
Mirceno	3,62 ± 0,36 ^a	2,42 ± 0,02 ^a	3,93 ± 0,02 ^a	3,26 ± 0,03 ^a
Limoneno	300,09 ± 9,00 ^c	313,94 ± 8,15 ^d	288,36 ± 9,00 ^b	294,08 ± 13,01 ^{b, c}

Los promedios con distintas letras son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

nd: no detectado

En las **figuras 72** y **73** se presenta la concentración de los componentes volátiles del aceite esencial de naranja encapsulado en las cuatro matrices: TMD_{Capsul} y $TMD_{Hi\ Cap}$ (**Figura 72**); SMD_{Capsul} y $SMD_{Hi\ Cap}$ (**Figura 73**), almacenadas a dos temperaturas 25 °C (líneas continuas) y 37 °C (líneas punteadas). Los volátiles se agruparon de acuerdo a los niveles de retención en tres grupos (baja, media y alta

concentración). En todos los casos se produjo una disminución de la concentración de todos los volátiles en el almacenamiento, y en general las pérdidas fueron mayores para las muestras almacenadas a 37 °C. Además, se observaron efectos específicos debidos al tipo de matriz empleada.

A fin de simplificar el análisis de los resultados y teniendo en cuenta las diferencias entre los componentes volátiles, se armaron grupos de componentes de acuerdo con su estructura química.

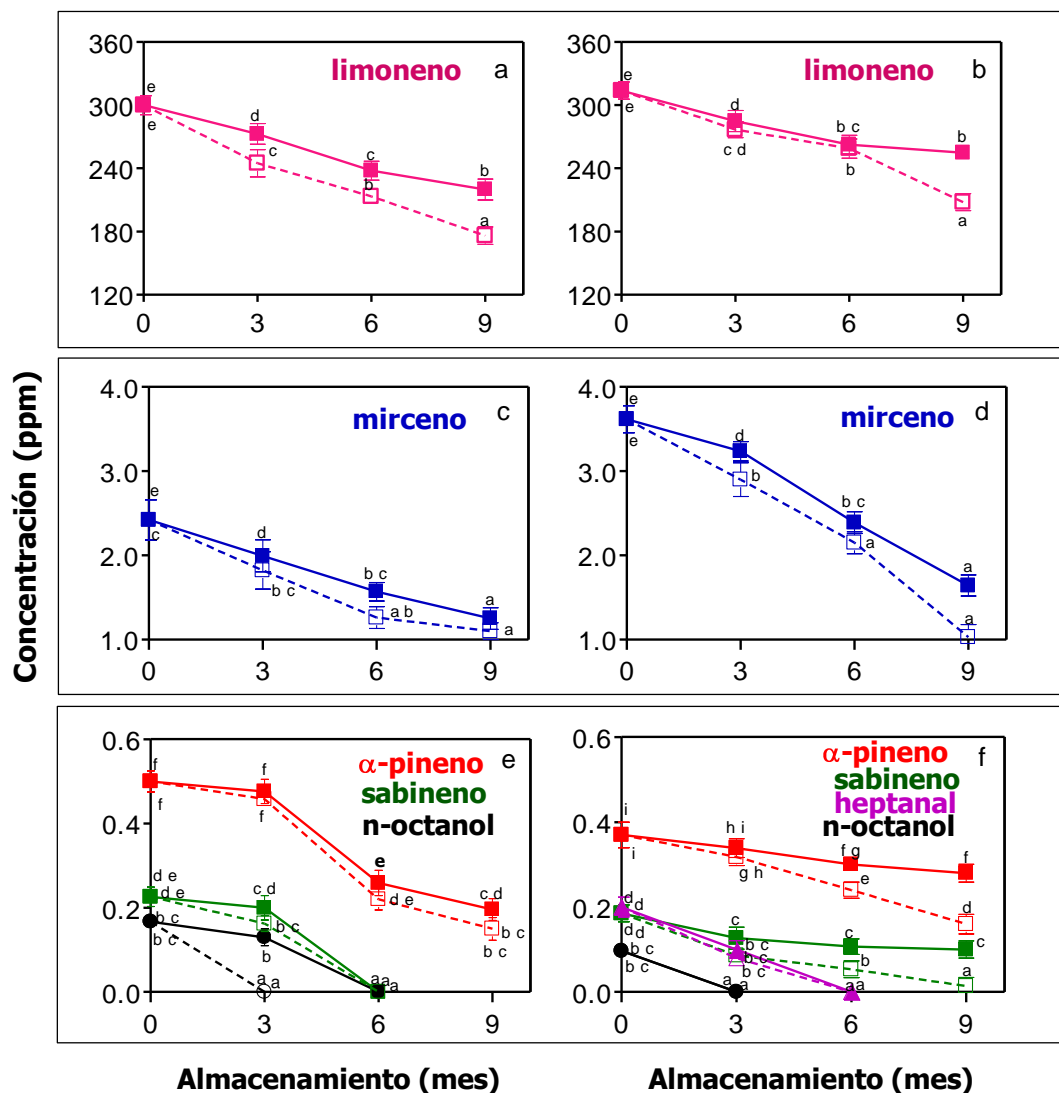


Figura 72. Concentración de los componentes volátiles del aceite esencial de naranja en las formulaciones: TMD_{Capsul} (a, c y e), TMD_{Hi Cap} (b, d y f) almacenadas a dos temperaturas 25 °C (líneas continuas) y 37 °C (líneas punteadas). Los promedios con distintas letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

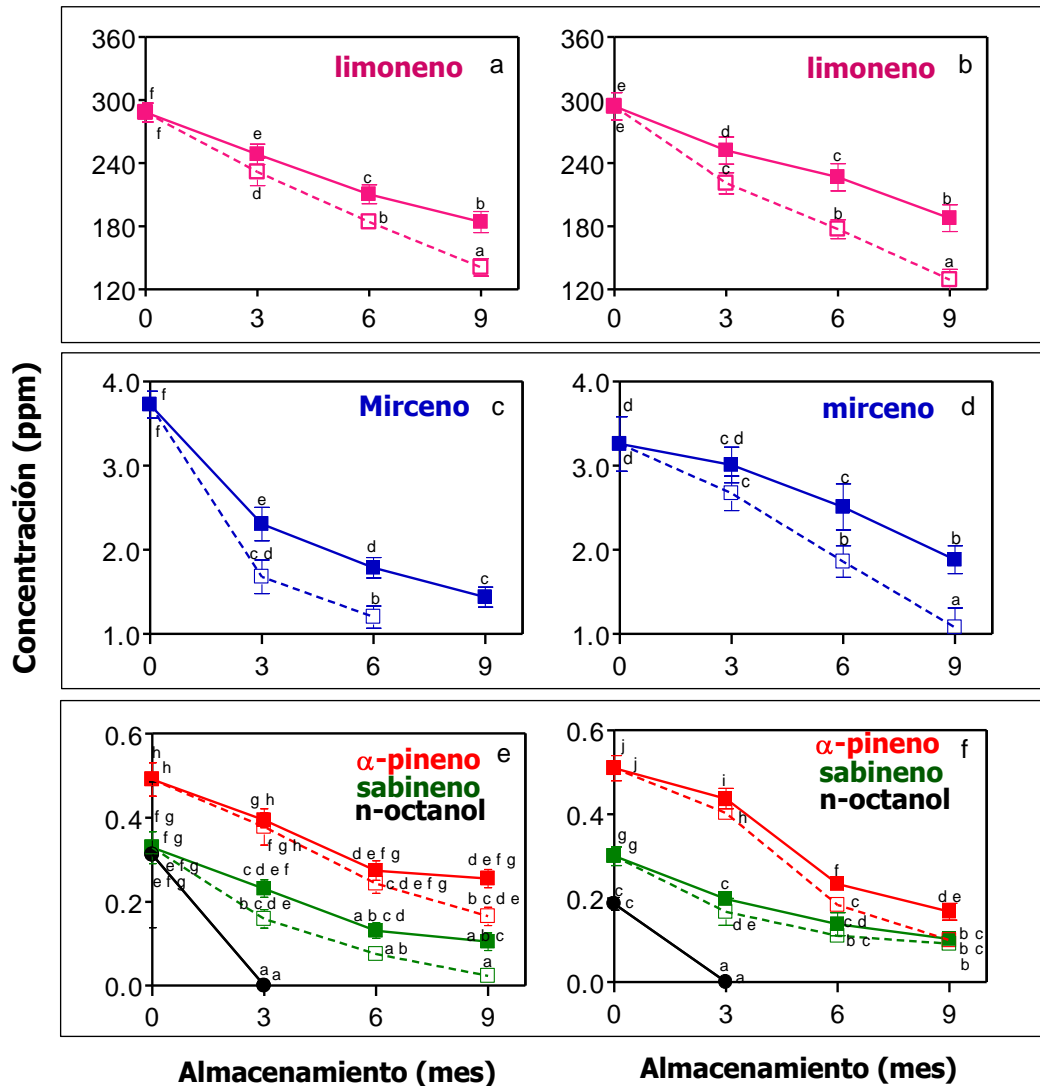


Figura 73. Concentración de los componentes volátiles del aceite esencial de naranja en las formulaciones: SMD_{Capsul} (a, c y e), SMD_{Hi Cap} (b, d y f) almacenadas a dos temperaturas 25 °C (líneas continuas) y 37 °C (líneas punteadas). Los promedios con distintas letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Alcoholes

Este grupo está constituido por el n-octanol. Este compuesto solo se retuvo en la formulación TMD_{Capsul} a 25 °C hasta los 3 meses (no presentando diferencia significativa con los valores iniciales). En el resto de los casos analizados, el n-octanol no fue detectable. Este hecho podría deberse a su elevada volatilidad, lo que conlleva la pérdida del mismo durante el almacenamiento. Estos resultados

concuerdan con los presentados por Coggins y col. (1969), en un estudio de volátiles en aceite de naranja realizado durante 38 semanas, donde detectaron que el contenido en n-octanol disminuía durante la experiencia. Así mismo son coincidentes con lo publicado por Nisperos-Carriedo y Shaw en 1990, quienes al comparar los componentes volátiles del jugo fresco y pasteurizado de naranja, detectaron cantidades muy bajas de octanol, en el orden de trazas.

Aldehídos

Este grupo está constituido por el heptanal. Este compuesto solo se presentó en la formulación TMD_{Hi Cap} y su concentración disminuyó significativamente en el tiempo a ambas temperaturas, siendo indetectable desde los 6 meses de almacenamiento. El heptanal contribuye de manera importante al aroma del aceite esencial de naranja y es considerado como uno de los estándares de identidad en el aceite esencial de naranja (Arctander, 1969; Boelens y Gemert, 1987; Shaw, 1991). Según estos autores una disminución en la concentración significa una pérdida importante en la calidad del aroma.

Terpenos

Este grupo está constituido por limoneno, mirceno, α -pineno y sabineno. Los hidrocarburos terpénicos son componentes de naturaleza apolar y volatilidad media. Estos componentes han sido considerados por Shaw (1991) como importantes contribuyentes al aroma del zumo de naranja. Además, en la cáscara de naranja los componentes mayoritarios o más importantes son de naturaleza terpénica (en su mayoría monoterpenos). El componente más abundante por un largo margen es el

limoneno, y su concentración oscila entre 79 y 83 % del total de volátiles (Ikeda y col., 1962).

En el presente trabajo el limoneno es el componente mayoritario, teniendo una concentración inicial cercana a los 300 ppm en todos los casos analizados. Teniendo en cuenta las diferentes formulaciones se observó que las que contenían trehalosa mostraron niveles más elevados de retención que las que contenían sacarosa. Además, la formulación TMD_{Hi Cap} pudo retener mayor concentración de limoneno en el tiempo que el resto de las formulaciones analizadas, no observándose diferencias significativas entre las dos temperaturas estudiadas hasta los 6 meses.

El mirceno también ha sido considerado como un componente habitual de la naranja. Selli y col. (2002) lo han detectado como el segundo componente más abundante en la cáscara de naranja. En el caso de este compuesto, la disminución en el almacenamiento fue muy notable para todas las formulaciones, perdiéndose casi por completo al cabo de los 9 meses de almacenamiento a 37 °C. Además, el comportamiento de retención en el almacenamiento fue muy particular. Para las formulaciones TMD, el tipo de almidón empleado fue muy importante desde el punto de vista de la concentración inicial presente en los polvos, en presencia de Capsul esta concentración fue muy baja en comparación a la observada en presencia de Hi Cap (**Figura 72c y d**). Por el contrario, en las formulaciones SMD se vio una mayor concentración inicial de mirceno en presencia de Capsul.

En relación al α -pineno y al sabineno, estos componentes también se han caracterizado por su contribución al aroma del aceite esencial aportando notas de pino y aroma especiado respectivamente (Arctander, 1969; Mazid y col., 2011). En el caso de estos compuestos, la pérdida fue notable al cabo de los tres meses de

almacenamiento para todas las formulaciones. Con respecto al sabineno, para las formulaciones TMD, el tipo de almidón empleado influyó en la retención, en presencia de Hi Cap se perdió por completo luego de los 6 meses de almacenamiento (**Figura 72e**). Por el contrario, en las formulaciones SMD se vio una mayor concentración de sabineno en presencia de Hi Cap.

IV.2.2.4.2 Evaluación sensorial

- Evaluación discriminativa (Sorting task)

En la **Figura 74** se presenta el análisis multivariado de escalamiento multidimensional de la prueba de agrupamiento que permite examinar la relación entre los atributos definidos por los asesores (**Tabla 13**) y las formulaciones (**Tabla 14**).

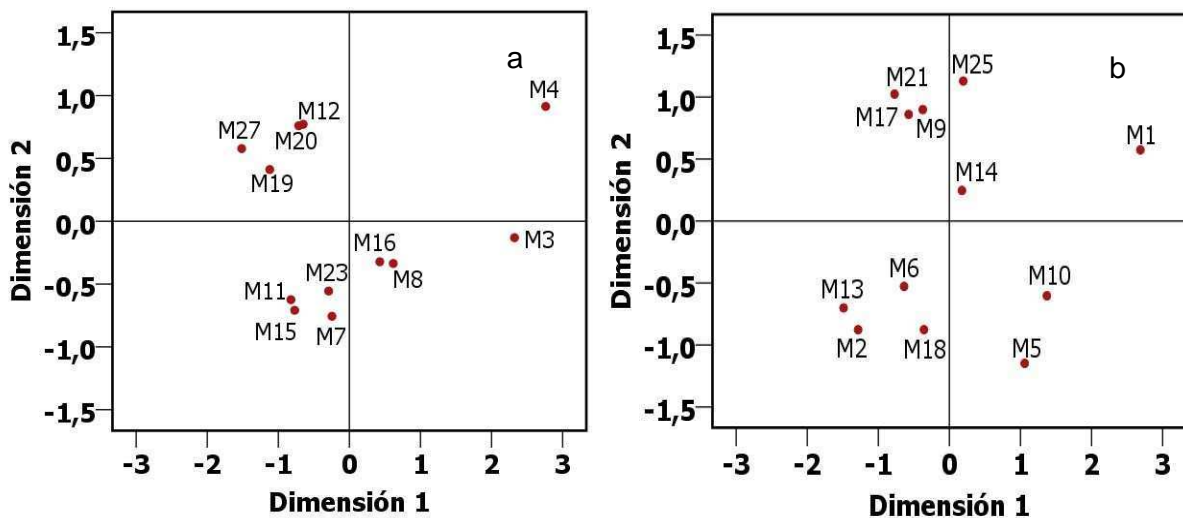


Figura 74. Análisis multivariado de escalamiento multidimensional, para las formulaciones conteniendo SMD (a) y TMD (b).

Las formulaciones conteniendo SMD (**Figura 74a**) están claramente agrupadas y pudo observarse que las muestras a tiempo cero (M3 y M4) se percibieron

diferentes del resto. En el caso de las formulaciones conteniendo TMD (**Figura 74b**), ocurrió lo mismo con una de las muestras a tiempo cero (M1), pero M2 se ubicó dentro de un grupo con muestras correspondientes a distintos tiempos de almacenamiento. Esto puede deberse a que las muestras se percibieron en forma similar o a que el panel no distinguió pequeñas diferencias entre las muestras almacenadas a distinto tiempos.

A partir del agrupamiento de las muestras (**Figura 74**) se seleccionaron las muestras que se percibían en forma diferente, teniendo en cuenta además, que hubiera formulaciones representativas de todas las condiciones estudiadas. Las muestras de nueve meses no se incluyeron porque se observó que no presentaban diferencias respecto a las almacenadas durante seis meses, como se detalla más adelante.

La selección se realizó teniendo en cuenta los siguientes criterios:

- Las muestras M12 y M20 (**Figura 74a**) correspondientes a formulaciones conteniendo $SMD_{Hi\ Cap}$ almacenadas a 37 °C durante 3 y 6 meses respectivamente, prácticamente fueron percibidas como muestras iguales, por lo tanto, sólo se llevó al perfil M20.
- Por otro lado, el grupo M7, M11, M15, M23 (**Figura 74a**) (formulaciones conteniendo SMD_{Capsul} almacenadas durante 3, 6 y 9 meses, respectivamente) presentó características similares, por lo que se decidió no llevar al perfil a M7 y considerar las condiciones mas avanzadas de almacenamiento. Asimismo, se observa que a los 9 meses no hay mucha diferencia con las muestras almacenadas a 6 meses (M15 similar a M23; M19 similar a M27) por este motivo se decidió no evaluar las muestras

almacenadas durante 9 meses. Lo mismo se observó con M9, M17 y M25 (**Figura 74b**) (formulaciones conteniendo TMD_{Capsul} almacenada a 37°C durante 3, 6 y 9 meses, respectivamente), en relación a los 9 meses de almacenamiento.

- Además, se descartaron M5 y M6 (**Figura 74b**) (TMD_{Capsul} y TMD_{Hi Cap} respectivamente almacenadas durante 3 meses a 25 °C), porque se percibieron muy parecido a M2 que es una muestra perteneciente a la condición inicial.

Con el fin de realizar el perfil descriptivo con aquellas formulaciones que presentaban las mayores diferencias entre si, se seleccionaron las siguientes muestras: M1, M2, M3, M4, M8, M9, M10, M11, M13, M14, M15, M16, M17, M18, M19 y M20.

- Perfil aromático descriptivo

El Análisis de Componentes Principales del perfil aromático descriptivo se muestra en la **Figura 75**. Los dos primeros componentes explicaron el 71,7% de la variación total entre las muestras. El Componente Principal 1 (CP1) está explicado fundamentalmente por los atributos: pungente, vitamina C y naranja verde, hacia el lado derecho; y por cáscara y limón hacia el lado izquierdo. CP2 está explicado principalmente por los descriptores frutado, naranja en polvo y naranja fresca.

Como puede observarse las formulaciones conteniendo sacarosa (SMD) se agruparon en los dos cuadrantes del lado derecho, mientras que las de trehalosa (TMD) lo hicieron sobre los dos cuadrantes del lado izquierdo. Esto está indicando

que las muestras encapsuladas en estos dos tipos de formulaciones presentaron un perfil aromático diferente.

Las formulaciones conteniendo SMD retuvieron esencialmente naranja verde y vitamina C, determinando una alta sensación de pungencia (especialmente la M3) que luego va disminuyendo durante el almacenamiento, cambiando el perfil aromático hacia aromas de naranja madura. Las formulaciones conteniendo TMD retuvieron principalmente los aromas relacionados con limón, cáscara y jugo en polvo, observándose también una disminución en la intensidad de estos atributos durante el almacenamiento.

El análisis de conglomerados (clusters) determinó la agrupación de las muestras en cuatro grupos (representados en la **Figura 75** mediante elipses).

Las muestras M3 y M4 (tiempo cero) se agruparon con M8 (3 meses a 25 °C), insinuando que la formulación $SMD_{Hi\ Cap}$ tuvo una protección ligeramente superior en comparación con las formulaciones SMD_{Capsul} en estos tres primeros meses de almacenamiento a 25 °C debido a que no se diferencia de la condición inicial. El segundo grupo incluyó las muestras M11, M15, M16, M19 y M20 (formulaciones conteniendo SMD), donde se observa como ya se mencionó una disminución en la intensidad de los atributos presentados por las muestras a tiempo cero. El tercer grupo, integrado por M14, M17 y M18, demostró que las tres formulaciones conteniendo TMD almacenadas durante 6 meses, fueron descritas principalmente con el descriptor jugo en polvo. El cuarto grupo incluyó las muestras M1, M2, M9, M10 y M13 que corresponden a tiempo cero y almacenamientos de 3 meses a 37 °C y 6 meses a 25 °C, indicando que se percibieron en forma similar a la condición inicial siendo los atributos limón y cáscara los que predominaron. Teniendo en cuenta

que estos descriptores están muy relacionados (ya que la cáscara de naranja contiene un alto contenido de limoneno, aroma característico de la naranja y el limón), las formulaciones conteniendo trehalosa podrían almacenarse un tiempo prolongado sin que se altere la percepción del perfil de aroma.

IV.2.2.4.3 Comparación de datos cromatográficos y sensoriales

La relación entre los compuestos volátiles determinados por SPME-GC-MS y los atributos sensoriales se estudió a través de una regresión de cuadrados mínimos parciales (Partial Least Square Regression - PLS) la cual se muestra en la **Figura 76**. Los primeros dos factores explicaron el 71,7 % de la varianza entre los atributos sensoriales (X) y los compuestos identificados por cromatografía (Y).

Se observó una alta correlación entre el atributo sensorial naranja fresca y el compuesto químico α -pineno. El α -pineno está presente en el aceite esencial de cáscara de naranja fresca, el aporte de este compuesto se debe a que los cítricos suelen producir terpenos defensivos que luego le proporcionan al aceite esencial respectivo notas de pino y un toque de frescura (Mazid y col., 2011). Las formulaciones conteniendo sacarosa están representadas principalmente por pineno.

Por otro lado se correlacionaron los atributos naranja madura, mermelada de naranja y mandarina con el descriptor mirceno. El mirceno segundo componente más abundante en la cáscara de naranja, también está presente en la composición del aceite esencial de mandarina (Jordan y col., 2001; Selli y col., 2002) y en la caña de azúcar. Su olor se describe como cítrico, dulce y afrutado. Las formulaciones conteniendo sacarosa también están representadas por mirceno.

Se pudo ver una alta correlación entre los atributos sensoriales cáscara de naranja y jugo en polvo con el compuesto químico limoneno. La cáscara de naranja contiene un alto contenido de limoneno, aroma característico de la naranja y el limón. Las formulaciones conteniendo TMD retuvieron principalmente los aromas relacionados con los atributos limón y cáscara, observando que si bien disminuye la intensidad de estos atributos durante el almacenamiento, esta diferencia no afecta ya que conserva las características originales durante el almacenamiento.

El heptanal contribuye de manera importante al aroma del aceite esencial de naranja y es considerado como uno de los estándares de identidad en el aceite esencial de naranja (Arctander, 1969; Boelens y Gemert, 1987; Shaw, 1991), tiene un olor penetrante a fruta. Las formulaciones conteniendo trehalosa estuvieron representadas por heptanal.

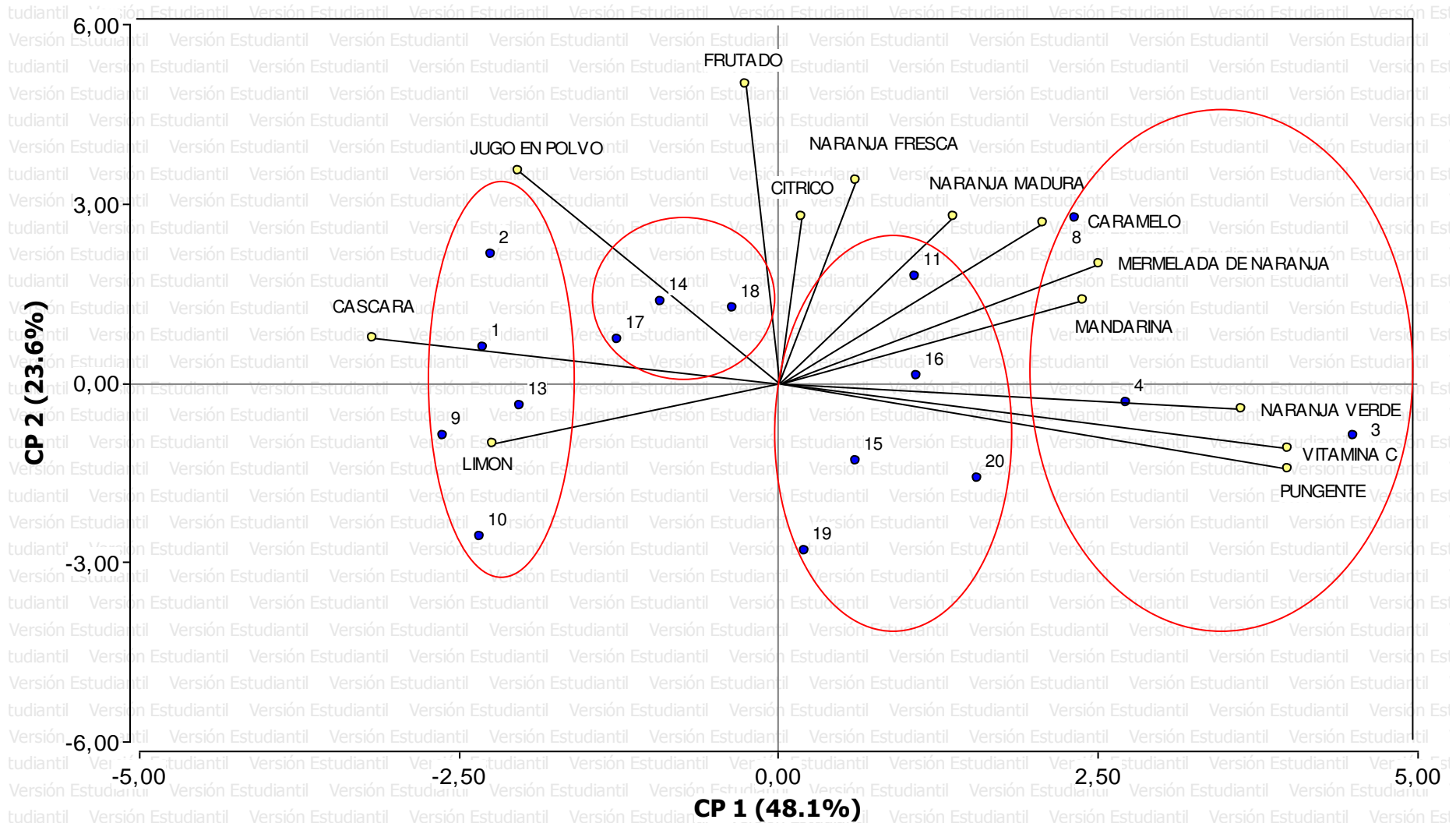


Figura 75. Análisis de Componentes Principales del perfil aromático descriptivo (La identificación de las muestras se presenta en la **Tabla 14**).

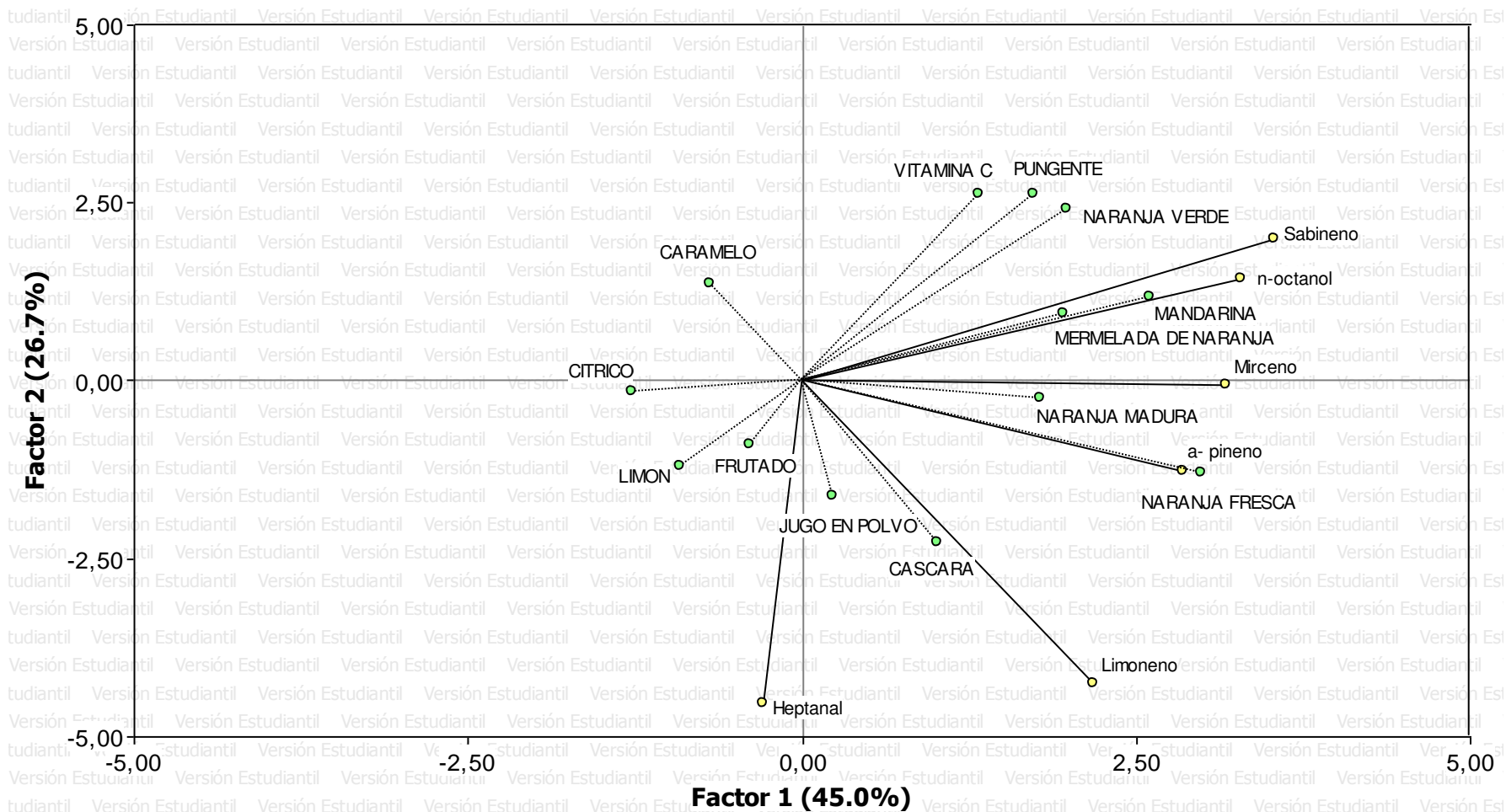


Figura 76. Regresión de cuadrados mínimos parciales (Partial Least Square Regresión – PLS) entre los atributos del perfil aromático (●) y los compuestos químicos evaluados por cromatografía gaseosa (●).

IV.2.3 Resultados relevantes

- Las emulsiones frescas conteniendo sacarosa y trehalosa presentaron propiedades con leves diferencias entre si que en general se hicieron mas parecidas en las ER. Este hecho indicaría que en principio ambos azúcares pueden ser empleados en el desarrollo de formulaciones para encapsular aromas cítricos.
- Las formulaciones en ausencia de MD presentaron mayores tamaños de gota y menor estabilidad indicando la importancia de la incorporación de polímeros en las matrices carrier empleadas para la encapsulación.
- El método empleado para la preparación de las emulsiones influye en el tamaño de gota obtenido y en la estabilidad. La agitación a alta velocidad conduce a la obtención de gotas de mayor tamaño que la sonicación como se vio para las formulaciones conteniendo aceite esencial de naranja. En este sentido la estabilidad de las emulsiones sonicadas fue mayor. Es importante notar que las formulaciones conteniendo citral preparadas por agitación presentaron tamaños de gota pequeños y equivalentes a los obtenidos por sonicación en las formulaciones conteniendo aceite de naranja. Esto se vio reflejado en emulsiones relativamente estables. Por lo tanto el volátil encapsulado influye sobre las propiedades y la estabilidad de las emulsiones.
- Considerando la posibilidad de incorporar los aromas encapsulados en jugos cítricos deshidratados, se analizó la estabilidad de las emulsiones luego de un día de almacenamiento y se observó que solo se produjo un cierto grado de floculación. Este es un resultado prometedor en relación

con la aplicación de estas formulaciones como ingredientes que se incorporen a jugos cítricos deshidratados.

- Las formulaciones en polvo conteniendo citral encapsulado no presentaron diferencias significativas en cuanto a la retención del aroma ni a la percepción sensorial. Este hecho indicaría que en principio la composición de la formulación permitiría su uso en forma indistinta. Sin embargo al analizar las propiedades físicas de los polvos se advierte que las formulaciones conteniendo trehalosa serían más adecuadas para el almacenamiento.
- Las formulaciones en polvo conteniendo aceite de naranja encapsulado presentaron diferencias en la retención del volátil que dependieron de la composición. En general se observó mayor retención en las formulaciones con trehalosa en comparación con las de sacarosa. Además se obtuvieron perfiles diferentes de acuerdo al azúcar empleado, indicando que se podrían desarrollar dos tipos de aromas de naranja de acuerdo a distintas preferencias de los consumidores. Un aspecto a destacar es que las formulaciones conteniendo trehalosa conservaron las características aromáticas originales en el almacenamiento.

V. Conclusiones

En cuanto a la retención de volátiles:

- En este trabajo se observaron diferencias entre los distintos volátiles analizados. En el caso de etanol y de aceite esencial de naranja la retención fue mayor para las formulaciones conteniendo trehalosa que para aquellas conteniendo sacarosa. En cambio, en el caso de citral las retenciones fueron similares para ambos azúcares. Estos resultados indicarían que los volátiles encapsulados no se retienen de manera equivalente en las diferentes formulaciones, mostrando que no se puede generalizar el comportamiento de una dada formulación empleada para la encapsulación de volátiles.
- En el caso de la encapsulación de aceite esencial de naranja, el perfil sensorial obtenido fue muy diferente para las formulaciones conteniendo sacarosa o trehalosa. Estos resultados coincidieron con la obtención de perfiles cromatográficos diferentes, mostrando la retención diferencial de distintos componentes aromáticos para las distintas formulaciones. Este hecho indicaría la importancia del azúcar seleccionado para el desarrollo de aromas encapsulados y la posibilidad de diseñar aromas en polvo diferentes a partir de un mismo aroma original.
- En el caso de la encapsulación de etanol se observó que la formulación de maltodextrina tuvo menor retención del volátil que las mezclas con azúcares. En sistemas complejos, formados por azúcares y polisacáridos, los azúcares de bajo peso molecular podrían ubicarse en los huecos a nivel molecular de las largas cadenas de polímeros entrelazadas y por lo tanto disminuir la liberación de los compuestos volátiles. Además los azúcares

podrían tener más interacciones a nivel molecular con el etanol y evitar que difunda dentro de la matriz polimérica.

En cuanto a la preparación de los aromas encapsulados:

- El método empleado para la preparación de las emulsiones influye en las características de la emulsión obtenida y en su estabilidad. Sin embargo, estas propiedades dependen del volátil a encapsular. En el caso de citral, se generaron emulsiones empleando agitación a alta velocidad, y se obtuvieron tamaños de gota reducidos y una buena estabilidad. Por el contrario, en el caso del aceite esencial de naranja, el método de agitación no fue adecuado, por lo tanto se empleó el método de sonicación, con el cual se obtuvieron muy buenos resultados.

En cuanto a las propiedades físicas de los polvos:

- En este trabajo se observó que la presencia de maltodextrina permitió obtener formulaciones en polvo con mejores propiedades físicas (particularmente valores de T_g más elevados) para poder realizar el almacenamiento de los polvos en condiciones más amplias de humedad y temperatura que en el caso de formulaciones conteniendo solo azúcares.
- Las formulaciones conteniendo trehalosa presentaron valores más elevados de T_g que aquellas conteniendo sacarosa, corroborando que en presencia de trehalosa se pueden realizar almacenamientos en condiciones más desfavorables sin alterar las características físicas de los polvos

- Las formulaciones en polvo conteniendo aceite de naranja mostraron propiedades físicas (sorción de agua, transiciones vítreas y movilidad molecular) diferentes a las observadas con citral y etanol. Estos resultados indican la importancia de analizar las propiedades físicas en las formulaciones completas conteniendo el aroma, para la selección adecuada de las condiciones de almacenamiento.

En general, se logró obtener formulaciones constituidas por mezclas de azúcares y maltodextrina, conteniendo aromas cítricos encapsulados, que mostraron altos niveles de retención de los aromas y buena estabilidad al reconstituir los polvos. Estos son resultados prometedores con respecto a la incorporación de estas formulaciones a jugos cítricos deshidratados.

VI. Bibliografía

- Ablett S., Darke A., Izzard M. y Lillford P. J. (1993). Studies of the glass transition in malto-oligomers. En: *The Glassy State of Foods*. Ed. Blanshard y Lillford. Loughborough, Leicestershire, UK, Nottingham University Press. pp. 189-206.
- Abramovič H., y Klofutar C. (2002). Water sorption isotherms of some maltodextrin samples. *Acta Chim. Slov.*, 49: 835-844.
- Adams R.P. (2007). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography /Mass Spectrometry, 4th Ed., Allured: Carol Stream, IL.; Wiley/NIST Mass Spectral Library.
- Aguilera J.M., (2003). Moisture Sorption Isotherms. En *Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering*. Ed. Heldman. Marcel Dekker, New York. pp. 676-679.
- Aguilera J.M., Levi G., y Karel M. (1993). Effect of water on glass transition and caking of fish protein hydrolyzates. *Biotechnol. Prog.*, 9: 641-645.
- Ahmed E.M., Denninson R.A., Dougherty R.H., y Shaw P.E. (1978). Effect of non-volatile orange juice components, acid, sugar and pectin on the flavor threshold of d-limonene in water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 192–194.
- Anandaraman S. y Reineccius G.A. (1986). Stability of encapsulated orange peel oil. *Food Technology*, 40, 88–93.
- Anglea S., Karathanos V., y Karel M. (1993). Low temperature transitions in fresh and osmotically dehydrated plant materials. *Biotechnol. Prog.*, 9, 204-209.
- Anton M., Beaumal V., Brossard C., Llamas G., y le Denmat M. (2002). Droplet flocculation and physical stability of oil-in-water emulsions prepared with hen egg yolk. En: *Food emulsions and dispersions*. Ed. Anton. Kerala, India. pp. 15-28.
- Arctander S. (1969). Perfume and Flavor Chemicals. Ed. Arctander Montclair, New Jersey. Pp. 833, 1592, 2397.
- Arthur C.L., y Pawliszyn J. (1990). Solid-phase microextraction with thermal desorption using silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 62, 2145–2148.
- ASTM (1975). Manual on Sensory Testing and Methods, STP 434. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.

- Ayala A., y Montes M. (2004). Almidones aniónicos y catiónicos. Tesis "procesamiento de cereales y oleaginosas". Universidad Autónoma de Tamaulipas. México.
- Barbosa-Cánovas G., y Vega-Mercado H. (1996). Osmotic dehydration. En *Dehydration of foods engineering series*. Ed. Chapman y Hall. New York, pp. 265-288.
- Belitz H., y Grosch W. (1987). Carbohydrates. En *Food Chemistry*. Ed. Heidelberg. Springer, Verlag. pp. 217-225.
- Bell L. (1996). Nonenzymatic browning in reduced-moisture amorphous systems as impacted by water activity and glass-rubber transition. Poster presentado en ISOPOW VI Meeting, Santa Rosa, California, Marzo 2-8.
- Bell L., y Hageman M. (1994). Differentiating between the effects of water activity and glass transition dependent mobility on a solid state chemical reaction: aspartame degradation. *J. Agric. Food Chem.*, 42:2398-2401.
- Bellows R., y King C. (1973). Product collapse during freeze drying of liquid foods. *AIChE Symp. Ser.*, 69, (132), 33-41.
- Beristain C.I., Azuara E., y Vernon-Carter E.J. (2002). Effect of water activity on the stability to oxidation of spray dried encapsulated orange peel oil using mesquite gum as wall material. *Journal of Food Science*, 67, 206-211.
- Beristain C.I., Vazquez A., Garcia H.S., y Vernon-Carter E.J. (1996). Encapsulation of orange peel oil by cocrystallization. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 29, 645-647.
- Berlin E., Anderson B. y Pallansch M. (1973). Water sorption by dried dairy products stabilized with carboxymethyl cellulose. *J. Dairy Science*, 56: 685-689.
- Boelens M.H., y van Gemert L.J. (1987). Organoleptic properties of aliphatic aldehydes. *Perfum. Flavor*, 12, 31-43.
- Bonazzi C., y Dumoulin E. (2011). Quality Changes in Food Materials as Influenced by Drying Processes. En: *Modern Drying Technology: Volume 3 - Product Quality and Formulation*. Eds. Tsotsas y Mujumdar. Wiley-VCH, Verlag y Co. Weinheim, Germany, pp. 5-16.
- Brazel C.S. (1999). Microencapsulation: offering solution for the food industry. *Cereal Foods World*, 44, 388-393.

- Britten M., y Giroux H.J. (1991) Coalescence index of protein-stabilized emulsions. *Journal of Food Science*. 56, 792-795 .
- Buera M., y Karel, M. (1995). Effect of physical changes on the rates of nonenzymic browning and related reactions. *Food Chem.*, 52: 167-173.
- Busso Casati C., Schebor C., Zamora M.C., y Chirife J. (2007). Glass transition temperatures and some physical and sensory changes in stored spray-dried encapsulated flavours. *LWT - Food Science and Technology*, 40, 1792-1797.
- Calviño A.M. (1995). Sentidos químicos: gusto, olfato y trigémico. En: Enciclopedia iberoamericana de psiquiatría. Vol II 1º Ed. Buenos Aires. pp 1083-1093.
- Campo E., Ballester J., Langlois J., Dacremont C., y Valentin D. (2010). Comparison of conventional descriptive analysis and a citation frequency-based descriptive method for odor profiling: An application to Burgundy Pinot noir wines. *Food Quality and Preference*, 21 (1), 44-55.
- Cardona S., Schebor C., Buera M.P., Karel M., y Chirife J. (1997). Thermal Stability of Invertase in Reduced-Moisture Amorphous Matrices in Relation to Glassy State and Trehalose Crystallization. *Journal of Food Science*, 62(1), 105-112.
- Carr H.Y., y Purcell E.M. (1954). Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. *Physical Review*, 94(3): 630-638.
- Cerdeira M., Palazolo G.G., Candal R.J., y Herrera M.L. (2007). Factors Affecting Initial Retention of a Microencapsulated Sunflower Seed Oil/Milk Fat Fraction Blend. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84, 523–531.
- Chamblee T.S., Clark B.C. (1993). Bioactive Volatile Compounds from Plants. En: *ACS Symposium Series*. Ed. Teranishi, Buttery y Sugisawa. Washington. pp. 88.
- Chang Y.P., Cheah P.B., y Seow C.C. (2000). Plasticizing-antiplasticizing effects of water on physical properties of tapioca starch films in the glassy state. *Journal of Food Science*, 65(3), 445-451.
- Chirife J., y Karel M. (1973). Contribution of adsorption to volatile retention in a freeze-dried food model containing PVP. *Journal of Food Science*, 38, 768.
- Chollet S., Lelièvre M., Abdi, H., y Valentin D. (2011). Sort and beer: Everything you wanted to know about the sorting task but did not dare to ask. *Food Quality and Preference*, 22, 507–520.
- Clegg J.S., y Filosa M.F. (1961). Trehalose in the cellular slime mold, *Dictyostelium mucoroides*. *Nature*, 192, 1077-1078.

- Colaco C.A.L.S., y Roser B. (1995). Trehalose - A multifunctional additive for food preservation. En: Food packaging and preservation. Ed. Mathlouthi. Blackie Professional, London. pp. 123–140.
- Colquhoun I., y Goodfellow B. (1994). Nuclear magnetic resonance spectroscopy. En: *Spectroscopic Techniques for Food Analysis*. Ed. Reingald. VCH Publishers Inc New York. pp. 87-145.
- Crowe J.H., y Crowe L.M. (2000). Preservation of mammalian cells-Learning nature's tricks. *Nat Biotechnol*, 18(2):145-146.
- Crowe L.M., Mouradian R., Crowe J.H., Jackson S.A., y Womersley C. (1984). Effects of carbohydrates on membrane stability at low water activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 769, 141-150.
- Crowe L.M., Womersley C., Crowe J.H., Reid D., Appel L., y Rudolph A. (1986). Prevention of fusion and leakage in freeze-dried liposomes by carbohydrates. *Biochim Biophys Acta*, 861:131–140.
- Dalgleish D.G. (2004). Food emulsions: Their structures and properties. En *Food emulsions*. Eds. Friberg, Larsson, Sjöblom. Marcel Dekker, New York, USA. pp. 1-44.
- Damodaran S. (2005). Protein stabilization of emulsions and foams. *Journal of Food Science*, 70(3), 54-66.
- Deis R.C. (1997). Spray-drying-innovative use of an old process. *Food Product Design*, 7, 97–113.
- Dickinson E. (1992). *Introduction to Food Colloids*. Oxford University Press, Oxford.
- Dickinson E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17, 25-39.
- Dugo G., Cotroneo A., Verzera A., Bonaccorsi I. (2002). En: *Citrus: The Genus Citrus*. Eds. Dugo y Di Gaicomo. Taylor y Francis, London. pp. 201.
- Dumoulin E., Bimbenet J.J., (1998)a. Mechanical, physical and chemical phenomena during food drying: consequences on properties of dried products. Proceedings of 11th International Drying Symposium, August 19–22, Halkidiki, Greece, Volume A, 711–718.
- Dumoulin E., Bimbenet J.J., (1998)b. Spray drying and quality changes. En: The properties of water in foods, ISOPOW 6 Symposium. Ed. Reid. Blackie Academic & Professional, London, UK, pp. 209-232.

- Elbein A.D., Pan Y.T., Pastuszak I., y Carroll D. (2003). New insights on trehalose: Amultifunctional molecule. *Glycobiology*, 13(4):17R–27R.
- Elbein AD. (1974). The metabolism of alpha, alpha - trehalose. *Adv Carbohydr Chem Biochem*, 30:227–256.
- Fenema O.R. (2000). Food Chemistry, Third Edition. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 45-53.
- Flink J. (1983). Structure and structure transitions in dried carbohydrate materials. En: Physical Properties of Food. Eds. Peleg y Bagley. Inc Westport, CT.: AVI Publishing Co. pp. 473-521.
- Flink J., y Karel M. (1970). Effects of process variables on retention of volatiles in freeze-drying. *J. Food Sci.*, 35: 444-446.
- Flink J., y Karel M. (1972). Mechanisms of retention of organic volatiles in freeze-dried systems. *J. Food Technol.*, 7: 199-211.
- Flink J., Karel L., (1969). Studies on mechanisms of retention of organic volatiles. En freeze-dried systems. 29th Annual Meeting of the Institute of Food Technologists, Chicago, USA. May 11–15
- Ford L.D., Borwankar R.D., Pechak D., y Schwimmer B. (1997). Dressings and Sauces. En: Food Emulsions. Eds. Friberg, Larsson, y Sjöblom. CRC Press.
- Foster K.D., Bronlund J.E., y Paterson A.H.J. (2005). Glass transition related cohesion of amorphous sugar powders. *Journal of Food Engineering*, 77, 4, 997-1006.
- Franks F. (1994). Long term stabilization of biologicals. *Biotech*, 12: 253-256.
- Friberg S.E. (1997). Emulsion stability. En: Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients. Ed. Risch. Food Emulsions: Third edition. Eds. Friberg y Larsson. Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 1-55.
- Fullerton G.D., y Cameron I.L. (1988). Relaxation of biological tissues, En: *Biomedical Magnetic Resonance Imaging*. Eds. Wehrli, Shaw, Kneeland. VCH, Verlagsgesellschaft, New York. pp. 115-155.
- Gabriele D., Migliori M., Di Sanzo R., Oliviero Rossi C., Ruffolo S.A., y de Cindio B. (2009). Characterisation of dairy emulsions by NMR and rheological techniques. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 619-628.
- Galmarini M.V., Zamora M.C., Baby R., Chirife J., y Mesina V. (2007). Aromatic profiles of spray-dried encapsulated orange flavours: influence of matrix composition on the aroma retention evaluated by sensory analysis and

- electronic nose techniques. *International Journal of Food Science & Technology*, 43:1569–1576.
- Galmarini M.V. (2010). Estudios sensoriales y físico-químicos del disacárido trehalosa en relación a su uso como ingrediente funcional en alimentos. PhD Thesis Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Gejl-Hansen F., y Flink J. (1977). Freeze-dried carbohydrate containing oil-in-water emulsions: Microstructure and fat distribution. *J. Food Sci.*, 42: 1049-1055.
- Gerschenson L., Bartholomai G., y Chirife J. (1981). Structural collapse and volatile retention during heating and rehumidification of freeze-dried tomato juice. *J. Food Sci.*, 46: 152-156.
- Goubet I., Le Quere J.L. y Voilley A. (1998). Retention of aroma compounds by carbohydrates: influence of their physicochemical characteristics and of their physical state. *Journal of Agricultural of Food Chemistry*, 48, 1981–1990.
- Greenspan L. (1977). "Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions." *Journal of Research of the National Bureau of Standards. Section A. Physics and Chemistry*, 81: 89-95.
- Hartel R., y Shastry A. (1991). Sugar crystallization in food products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 30: 49-112.
- Higashiyama T. (2002). Novel functions and applications of trehalose. *Pure Appl Chem*, 74(7):1263–1269.
- Hunter R.J. (1993). *Introduction to modern colloid science*, Oxford University Press, Oxford.
- Ibarz., y Barbosa-Cánovas (2005). Tecnología de alimentos. Operaciones unitarias en la Ingeniería de alimentos. Ediciones mundi prensa. Editorial Aedos. Mexico. pp. 614-621.
- Iglesias H.A., Chirife J., y Buera M.P. (1997). Adsorption isotherm of amorphous trehalose. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75(2): 183-186.
- Iglesias H.A., y Chirife J. (1978). Delayed crystallization of amorphous sucrose in humidified freeze-dried model systems. *Food Tech*, 13:137-144.
- Ikeda R.M., Stanley W.L., Vannier S.H., y Spitler E.M. (1962). Monoterpene hydrocarbon composition of some essential oils. *J. Food Sci.* 27, 455-458.
- Jackson L.S., y Lee K. (1991). Microencapsulation in the food industry. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 24, 289–297.

- Jafari S., He Y., y Bhandari B. (2007). Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques. *Journal of Food Engineering*, 82, 478-488.
- Jetti R.R., Yang E., Kurinianta A., Finn C., y Qian M.C. (2007). Quantification of selected aroma-active compounds in strawberries by headspace solid-phase microextraction gas chromatography and correlation with sensory descriptive analysis. *Journal of Food Science*, 72 (7), 487-496.
- Jordan M.J., Tillman T.N., Mucci B., y Laencina, J. (2001). Using HS-SPME to Determine the Effects of Reducing Insoluble Solids on Aromatic Composition of Orange Juice. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, 34, 244-250.
- Jouppila K. (1999). *Crystallization of amorphous carbohydrates: Studies on lactose and starch*. Helsinki, Finlandia.
- Jurado E., Bravo V., Camacho F., Vicaria J.M., y Fernández-Arteaga A. (2007). Estimation of the distribution of droplet size, interfacial area and volume in emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 295(1-3), 91-98.
- Kaasen I., McDougall J., y Storm A.R. (2004). Analysis of the otsBA operon for osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *Gene*, 145, 9-15.
- Kalichevsky M.T., y Blanshard J.M.V. (1992). A study of the effect of water on the glass transition of 1:1 mixtures of amylopectin, casein and gluten using DSC and DMTA. *Carbohydrate Polymers*, 19(4), 271.
- Karlberg M., Thuresson K. y Lindman B. (2005). Hydrophobically modified ethyl(hydroxyethyl)cellulose as stabilizer and emulsifying agent in macroemulsions. *Colloids and surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, 262, 158-167.
- Kenyon M.M., y Anderson R.J. (1988). Maltodextrins and low-dextrose equivalence corn syrup solids: Production and technology for the flavor industry. En: *Flavor Encapsulation*; ACS Symposium Series 370. Eds. Risch y Reineccius. American Chemical Society, Washington, DC.
- Kim C.K., Choi J.Y., Yoon Y.S., Gong J.P., Choi H.G., Kong J.Y., Lee B.J. (1994). Preparation and evaluation of dry elixir for the enhancement of dissolution rate of poorly water-soluble drugs. *Int. J. Pharm.* 106, 25-32.

- Kim C.K., Yoon Y.S. (1995). Developement of digoxin dry elixir as a novel dosage form using a spray-drying technique. *J. Microencapsulation* 12, 547–556.
- Kim C.K., Yoon Y.S., Kong J.Y. (1995). Preparation and evaluation of flurbiprofen dry elixir as a novel dosage form using a spray-drying technique. *Int. J. Pharm.* 120, 21–31.
- Kim Ch-T., Shin F.F., Champagne E.T., y Daigle K. (1999). Effects of phosphorylating salts and temperature on the preparation of rice starch phosphates by extrusion. *Starch/Stärke*. 51(8-9): 260-286.
- Klinkesorn U., Sophanodora P., Chinachoti P., y McClements D.J. (2004). Stability and rheology of corn oil-in-water emulsions containing maltodextrin. *Food Research International*, 37, 851–859.
- Komes D., Lovric T., Kovacevic Ganic K., Gajdos Kljusturic J., y Banovic M. (2005). Trehalose improves flavour retention in dehydrated apricot puree. *International Journal of Food Science and Technology*, 40, 425–435.
- Komes D., Lovric T., Kovacevic Ganic K., y Gracin L. (2003). Study of trehalose addition on aroma retention in dehydrated strawberry puree. *Food Technology Biotechnology*, 41(2), 111-120.
- Kou Y., Dickinson L.C., y Chinachoti P. (2000). "Mobility characterization of waxy corn starch using wide-line ^1H nuclear magnetic resonance." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11): 5489-5495.
- Kubota M. 2005. New features and properties of trehalose. *New Food Industry*, 47(3):17–29.
- Kubota M. 2008. Trehalose-producing enzymes. *Fine Chem.*, 37(1):28-35.
- Labuza T. 1975. Interpretation of sorption data in relation to the state of constituent water. En: *Water Relations of Foods*. Ed. Duckworth. Academic Press, New York. pp. 155-172.
- Labuza T., Tannenbaum S., y Karel M. 1970. Water content and stability of low-moisture and intermediate moisture foods. *Food Technol.*, 24, 12: 543-550.
- Land D.G. (2006). Perspectives on the effects of interactions on flavor perception: an overview. En: *Flavor–food interactions*. Ed. Leland. ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington. pp. 2-11.

- Le Meste M., Champion G., Roudart G., Blond G., y Simatos D. (2002). Glass transition and food technology : A critical appraisal. *JFS: Consice Reviews and Hypothesis in Food Science*, 67-7, 2444-2458.
- Lee S-W., Kim M-G., Kim C-K. (1999). Encapsulation of ethanol by spray drying technique: effects of sodium lauryl sulphate. *International Journal of Pharmaceutics*, 187, 193–198.
- Levi G., y Karel M. 1995. Volumetric shrinkage (collapse) in freeze-dried carbohydrates above their glass transition temperature. *Food Res. Intl.*, 28: 145-151.
- Levine H., y Slade L. (1986). Polymer physico-chemical approach to the study of commercial starch hydrolysis products. *Carbohyd. Polym.*, 6: 213-244
- Levine H., y Slade L. (1988). (Collapse) phenomena - a unifying concept for interpreting the behaviour of low moisture foods. En: *Food Structure - Its Creation and Evaluation* Ed. Blanshard y Nitchell. Butterworths, London. pp.149-180.
- Levine H., y Slade L. (1991). A food polymer science approach to structure property relationship in aqueous food systems: Non-equilibrium behavior of carbohydrate-water systems. En: *Water relationships of foods*. Eds. Levine y Slade. New York: Plenum Press. pp. 29-101.
- Levine H., y Slade L. 1992. Glass transitions in foods. En: *Physical chemistry of foods* Eds. Schwartzberg y Hartel. Dekker, New York. pp. 83-221.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., y Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release; a review. *International Journal of Food Science y Technology*, 41(1), 1-21.
- Makower B., y Dye W.B. (1965). Equilibrium Moisture Content and Crystallization of Amorphous Sucrose and Glucose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4,72-77.
- Mazid M., Khan T.A., Mohammad F. (2011). Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine*, 3, (2), 232-249.
- Mc Clements D.J. (1999). Emulsion formation. En: *Food emulsions: principles, practice and techniques*. Ed. Mc Clements. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. pp. 161-183.

- Meiboom S., y Gill D. (1958). Modified spin-echo method for measuring nuclear magnetic relaxation times. *Rev. Scient. Instr.*, 29: 688–691.
- Meilgaard M.C., Strauss S., Carr B.T. y Civille G.V. (1999). *Sensory Evaluation Techniques*. Boca Raton, Florida, USA, CRC Press LLC.
- Mengual O., Meunier G., Cayre´ I., Puech K., y Snabre P. (1999). Turbiscan MA 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. *Talanta*, 50(2), 445-456.
- Menting L.C., Hoogstad B., y Thieijssen H.A.C. (1970). Aroma retention during the drying of liquid foods. *Journal of Food Technology*, 13, 265-280.
- Moreau L., Kim H.J., Decker E.A., y McClements, D.J. (2003). Production and Characterization of Oil-in-Water Emulsions Containing Droplets Stabilized by Lactoglobulin; Pectin Membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(22), 6612-6617.
- Nagy S., y Shaw P.E. (1990) En: *Food Flavours, Part C: The Flavour of Fruits*. Eds. Morton y Macleod. Elsevier, New York. pp.93.
- Nelson K., y Labuza T. (1994). Water activity and food polymer science: implications of state on Arrhenius and WLF models in predicting shelf life. *J. Food Eng*, 22: 271-287.
- Nijhuis H.H., Torringa H.M., Muresan S., Yuksel D., Leguijt C., y Kloek W., (1998). Approaches to improving the quality of dried fruit and vegetables. *Trends Food Sci. Technol.* 9, 13–20.
- Ohtake S., y Wang J. (2011). Trehalose: Current Use and Future Applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100, 2020–2053.
- on the glass transition and ice crystal growth in ice cream. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 510-516.
- Palazolo G. (2006). Formación y estabilidad de emulsiones O/W preparadas con proteínas nativas y desnaturalizadas de soja. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- Palazolo G., Sorgentini D., y Wagner J. (2005). Coalescence and flocculation in o/w emulsions of native and denatured whey soy proteins in comparison with soy protein isolates. *Food Hydrocolloids*, 19(3), 595-604.
- Palzer, S. (2005). Review: Food structures for nutrition, health and wellness. *Trends in Food Science and Technology*, 20(5): 194-200.

- Pan, L.G., Tomás, M.C., y Añón, M.C. (2002) Effect of sunflower lecithins on the stability of water-in-oil and oil-in-water emulsions. *J Surfactants Deterg*, 5:135-143.
- Patist A. y Zoerb H. (2005). Preservation mechanisms of trehalose in food biosystems. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*, 40, 107-113.
- Penbunditkul P., Yoshii H., Ruktanonchai U., Charinpanitkul T., y Soottitantawat, A. (2011). Effect of feed liquid viscosity on flavor retention of bergamot oil encapsulated in spray-dried modified starch powder. International Congress on Engineering and Food. Athens, Greece. May 22-26.
- Popplewell L.M., Black J.M., Norris L., y Porzio M. 1995. Encapsulation systems for flavors and colors. *Food Technol.* 49(5): 76-78.
- Portmann M. O., y Birch G. (1995). Sweet taste and solution properties of α,α -trehalose. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 69, 275 – 281.
- products. Proceedings of 11th International Drying Symposium, August 19–22, Halkidiki, Greece, Volume A. pp. 711–718.
- Radford T., Tawashima K., Friedel P.K., Pope L.E., y Gianturco M.A. (1974). Distribution of volatile compounds between the pulp and serum of some fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22, 1066-1070.
- Rawle A. (2005). Basic principles of particle analysis. Malvern Mastersizer Limited, technical paper.
- Ré M.I. (1998). Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology*, 16(6), 1195-1236.
- Reglamento Técnico Mercosur sobre aditivos (MERCOSUR/GMC/RES. N° 10/06).
- Reineccius, G.A. (1991). Role of carbohydrates in flavor encapsulation. *Food Technol.* 45(3):144-146.
- Reineccius G.A. (2006). Flavor chemistry and technology. 2da edición, CRC Press.
- Relkin P., y Sourdet S. (2005). Factors affecting fat droplet aggregation in whipped frozen protein-stabilized emulsions. *Food Hydrocolloids*, 19(3), 503-511.
- Richards J., y Benoît J.P. (2000). Microencapsulation. En: *Techniques de l'ingénieur*. J. 2210 Paris. pp. 1–20.
- Risch S.J. (1988). Encapsulation of flavours by extrusion. En: *Flavour Encapsulation*. Ed. Risch y Reineccius. ACS Symposium Series 370, DC: American Chemical Society, Washington. pp. 103–109.

- Rocha Mier T., 1993. Influence despretraitements et des conditions de sechage sur la couleur et l'arome de la menthe (*Mentha spicata* Huds.) et du basilic (*Ocimum basilicum*). Diss., ENSIA, Massy, France.
- Roos Y. (1992). Reaction kinetics and thermodynamics in food systems; Part II, Phase transitions and transformations. En: *Handbook of Food Engineering*. Eds. Lund y Heldman. New York, Marcel Dekker.
- Roos Y. (1993). Melting and glass transitions of low-molecular weight carbohydrates. *Carbohydr. Res.*, 238: 39-48.
- Roos Y. (1995). Phase Transitions in Food. New York, NY: Academic Press.
- Roos Y. (1995)b. The physical state of amorphous materials. En: *Phase Transitions in Foods*. Ed. Taylor. Academic Press, New York. Pp. 26-34.
- Roos Y. (1995)c. Time-dependent phenomena. En: *Phase Transitions in Foods*. Ed. Taylor. Academic Press, New York. pp. 193-240.
- Roos Y. (2002). Glass transition and water activity. En: *IFT's Pre-Meeting Continuing Education Program. Fundamentals of Water Activity*, California, USA.
- Roos Y. H. (1998). Role of water in phase – transition phenomena in foods. *Phase/State Transitions in Foods*, M. Rao y R. W. Hartel, Marcel Dekker.
- Roos Y., Jouppila K., & Zielasko. (1996). Non-enzymatic browning-induces water plasticization. *J. Thermal Anal.*, 47: 1437-1450.
- Roos Y., y Himberg M.J. (1994). Non-enzymatic browning behaviour, as related to glass transition of a food model at chilling temperatures. *J. Agric. Food Chem.*, 42 (4): 893-898.
- Roos Y., y Karel M. (1991). Phase transition of mixtures of amorphous polysaccharides and sugars. *Biotechnology Progress*, 7, 49–53.
- Roos Y., y Karel M. (1991)a. Phase transitions of mixtures of amorphous polysaccharides and sugars. *Biotechnol. Prog*, 7: 49-53.
- Roos Y., y Karel, M. (1990). Differential scanning calorimetry study of phase transitions affecting the quality of dehydrated materials. *Biotechnol. Prog*, 6: 159-163.
- Roser B. (1991). Trehalose drying: A novel replacement for freeze-drying. *BioPharm* 5:47–53.
- Roser B.J., Blair J. (1996). Rapidly soluble oral solid dosage forms, methods of

- Rouseff R. 2007. Citrus Flavor. Capítulo 6 En: R.G. Berger (Ed.). *Flavours and fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. Springer-Verlag, Berlin.
- Rouseff R.L., Perez-Cacho P.R., Jabalpurwala, F. (2009). Historical Review of Citrus Flavor Research during the Past 100 Years. *J. Agric. Food Chem.*, 57 (18), 8115-8124.
- Ruan, R.R., Wang, X., Chen, P.L., Fulcher, R.G., Pesheck, P., y Chakrabarti, S. (1996). Quantitative analysis of wheat starch-water suspensions by pulsed NMR spectroscopy measurements. *Carbohydrate Research*, 295, 185-194.
- Rugraff Y.L., Desbois P., y Le Botlan D.J. (1996). Quantitative analysis of wheat starch-water suspensions by pulsed NMR spectroscopy measurements. *Carbohydrate Research*, 295,185-194.
- Schebor C., Mazzobre M.F., y Buera M.P. (2010). Glass transition and time-dependent crystallization behavior of dehydration bioprotectant sugars. *Carbohydrate Research*, 345,303-308.
- Schrooyen P., Meery R., Kruif C. (2001). Microencapsulation: its application in nutrition. *Proceedings of the Nutrition Society* 60(4): 475-479.
- Selli, S., Cabaroglu, T., & Canbas, A. (2002). Flavour components of orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *International Journal of Food Science and Technology*, 38, 587–593.
- Senoussi A., Dumoulin E.D., Berk Z. (1995). Retention of Diacetyl in Milk during Spray-Drying and Storage. *J. Food Sci.*, 60, 894-897.
- Shahidi F., y Han X.Q. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33, 501–547.
- Shaw P.E. (1991) En: *Volatile Compounds in Foods and Beverages*. Ed. Maarse Dekker, New York. pp. 305.
- Simatos D., Blond G., y Perez, J. 1995. Basic physical aspects of glass transition. En: Food Preservation by Moisture Control. Eds. Barbosa-Cánovas y Welti-Chanes. pp. 3-31.
- Simulation Study of the Interaction of Trehalose with Lipid Membranes. *Langmuir*, 20 (18), 7844–7851.
- Slade L., y Levine H. 1987. Structural stability of intermediate moisture foods - a new understanding. En Food Structure - Its Creation and Evaluation. Eds. Mitchell y Blanshard London: Butterworths. pp. 115-147.

- Slade L., y Levine, H. 1991. Beyond water activity: Recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 30: 115-360.
- Smith, D.C.; Forland, S.; Bachanos, E.; Matejka, M. y Barrett, V. (2001). Qualitative Analysis of Citrus Fruit Extracts by GC/MS: An Undergraduate Experiment. *Chem. Educator*, 6, 28-31.
- Soottitawat A., Bigeard F., Yoshii H., Furuta T., Ohkawara M., y Linko M. (2005). Influence of emulsion and powder size on the stability of encapsulated d-limonene by spray drying. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6, 107- 114.
- Soottitawat, A., Yoshii, H., Furuta, T., Ohkawara, M., y Linko, P. (2003). Microencapsulation by Spray Drying: Influence of Emulsion Size on the Retention of Volatile Compounds. *Journal of Food Science*, 68(7), 2256-2262.
- Sperling L. H. (1986). Introduction to Physical Polymer Science. John Wiley y Sons, New York.
- Sperling L. H. (2005). Introduction to Physical Polymer Science. Jhon Wiley y Sons, New York.
- Tadros Th.F. (1994). Fundamental principles of emulsion rheology and their applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 91, 215-225.
- Tamura H., Yang R.H., Sugisawa H. (1993) Bioactive Compounds from Plants. En: *ACS Symposium Series*. Eds. Teranishi, Buttery y Sugisawa, American Chemical Society, vol 525 Washington. pp. 121.
- Tant M., y Wilkes G. 1981. An overview of the nonequilibrium behavior of polymer glasses. *Polym. Eng. Sci.*, 21: 874-895.
- Teixeira, M.I., Andrade, L.R., Farina, M. y Rocha-Lea M.H.M. (2004). Characterization of short chain fatty acid microcapsules produced by spray drying. *Materials Science and Engineering* , 24, 653–658.
- Thijssen, H.A.C. (1971). Flavour retention in drying pre-concentrated food liquids. *Journal of applied chemistry & biotechnology*, 21, 372–377.
- Thijssen H.A.C., y Rulkens W.H. (1968). Retention of aromas in drying food liquids. Ingenieur, Chapter 45. pp. 80.
- Thomas D.J. y Atwell W.A. (1999). Starches. St Paul, MN: Eagan Press.

- To E., y Flink J. (1978) b. Collapse, a structural transition in freeze dried carbohydrates. II. Effect of solute composition. *J. Food Technol.*, 13: 567-581.
- To E., y Flink J. (1978) c. Collapse, a structural transition in freeze dried carbohydrates. III. Prerequisite of recrystallization. *J. Food Technol.*, 13: 583-594.
- To E., y Flink J. (1978) a. Collapse, a structural transition in freeze dried carbohydrates. I. Evaluation of analytical methods. *J. Food Technol.*, 13: 551-565.
- Ubbink J., y Schoonman A. (2003). Flavor delivery systems. En: *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology, on-line edition*. Wiley, New York.
- Villarreal M.A., Díaz S.B., Disalvo E.A., y Montich, G.G. (2004). Molecular Dynamics
- Vittadini E. y Chinachoti P. (2003). Effect of physico-chemical and molecular mobility parameters on *Staphylococcus aureus* growth. *International Journal of Food Science & Technology*, 38(8): 841-847.
- Voilley A., Sauvageot F., y Simatos D. (1973). Coefficients de volatilité relative et rétention au cours de la lyophilisation de quelques alcools. En: Proceedings of the XIII International Congress of Refrigeration, Volume 3, Avi Publishing Co., Westport, Conn. pp. 639-647.
- Vrentas J.S. y Duda J.L. (1978). A free-volume interpretation of the influence of the glass transition on diffusion in amorphous polymers. *Journal of applied polymer science*, 22:2325–2339.
- Waalkens-Berendsen D.H., Shigoyuki A., Kurimoto, M. (2002). Trehalose: A review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food Chem Toxicol* 40(7):871–898.
- Wagner J.R. (2000). Propiedades superficiales en Caracterización funcional y estructural de proteínas. Ed. Bartholomai y Pilosof Buenos Aires, Eudeba.
- Walstra P. (1983). Formation of emulsions in Encyclopedia of emulsion technology. Vol. 1: Basic theory. Becher, P. (ed). New York: Marcel Dekker, Inc. P.p. 57-127.
- Walstra P. (1996). Disperse systems: basic consideration. En Food Chemistry. Ed. Fennema. Marcel Dekker, NY-USA. Pp. 149.
- Watanabe Y., Fang X., Minemoto, Y., Adachi, S. y Matsuno, R. (2002). Suppressive effect of saturated Lascorbate on the oxidation of linoleic acid encapsulated

- with maltodextrin or gum arabic by spray-drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3984–3987.
- Weiss, E. A. (1997). *Essential Oil Crops*. Cab International. (pp. 417-511), New York, USA.
- Whelan A.P., Regand A., Vega C., Kerry J.P. y Goff H.D. 2008. Effect of trehalose
- White G. y Cakebread S., 1966. The glassy state in certain sugar-containing food products. *J. Food Technol.*, 1:73.
- Whorton C., y Reineccius G. (1995). Evaluation of the mechanisms associated. American Chemical Society, Washington. pp. 143-160.
- Yang X., y Peppard T. (1994). Solid-Phase Microextraction for Flavor Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42 (9), 1925–1930.
- Yáñez Fernández J., Salazar Montoya U., Chaires Martínez J.A., Jiménez L., Hernández M., Márquez Robles E.G., y Ramos Ramírez E. (2005). Aplicaciones Biotecnológicas de la Microencapsulación. *Mundo alimentario*, 1, 24-30.
- Yu X., Kappes S.M., Bello-Pérez L.A., y Schmith S.J. (2008). Investigating the Moisture Sorption Behavior of Amorphous Sucrose Using a Dynamic Humidity Generating Instrument. *JFS E: Food Engineering and Physical Properties*, 73, 25-35.