



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Instituto de Ciencias Agropecuarias
Área Académica de Ingeniería Agroindustrial e Ingeniería en
Alimentos

**Caracterización fisicoquímica y morfológica del almidón
de maíz modificado enzimáticamente y su efecto
protector y de bioaccesibilidad de ácido ascórbico**

Tesis que para obtener el grado de:
Maestro en Ciencia de los Alimentos

PRESENTA
Q.A. ROMÁN LEYVA LÓPEZ

Director: Dr. Apolonio Vargas Torres
Co-Director: Dra. Heidi María Palma Rodríguez

Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México, 2018



COORDINACION DE INVESTIGACION Y POSGRADO DEL ICAP

Actas de la reunión del Comité de Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos
Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis intitulada: **“Caracterización fisicoquímica y morfológica del almidón de maíz modificado enzimáticamente y su efecto protector y de bioaccesibilidad de ácido ascórbico”**, que desarrolla el estudiante Román Leyva López.

Asistentes:

Dr. Apolonio Vargas Torres

Dra. Heidi María Palma Rodríguez

Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández

Dra. María del Rocío López Cuellar

A. Revisión de Trabajo de Tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por la estudiante, comunicando a el estudiante, Román Leyva López, oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. El estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

B. Acuerdos

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que el estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

ATENTAMENTE

“AMOR, ORDEN Y PROGRESO”

Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 17 de octubre del 2018.

Dr. Apolonio Vargas Torres

Dra. Heidi María Palma Rodríguez

Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández

Dra. María del Rocío López Cuellar

Handwritten signatures of the committee members over horizontal lines.



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Dios por haberme ayudado durante toda mi vida a decidir y permitir lograr mis objetivos; en segundo lugar quiero agradecer a mi familia, quienes me han apoyado, aguantado y dado motivación y consejos tanto para mi vida profesional como personal.

Este proyecto no hubiera sido posible sin la ayuda de los doctores que me impartieron parte de su conocimiento y experiencias en todo este tiempo de la Maestría.

Por ultimo, quiero mencionar el apoyo incondicional brindado por parte de mis amigos (Joel, Ofé, Lore y Gre) que estuvieron conmigo en mis buenos y malos momentos, ayudándome a seguir adelante.

Gracias a todos, estoy completamente seguro que tuve que haber decidido lo mejor para que Dios pusiera a cada uno de ustedes en mi camino.

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió el efecto del tratamiento de hidrólisis enzimática a las 16 y 20 horas sobre las características morfológicas, fisicoquímicas y estructurales de almidón de maíz, y su efecto protector en microcápsulas de ácido ascórbico.

Para obtener el almidón modificado, la hidrólisis enzimática se llevó a cabo con las enzimas α -amilasa y amilogucosidasa, resultando un aumento del número de poros y del área superficial afectada conforme se expuso más tiempo el almidón a la acción enzimática. El contenido de amilosa aumentó conforme el tiempo de hidrólisis enzimática, dando como resultados $22.2\pm 0.3\%$, $27.4\pm 0.2\%$ y $28.7\pm 0.4\%$ para almidones nativo e hidrolizados 16 y 20 h respectivamente. La cristalinidad del gránulo de almidón se estudió con la técnica de difracción de rayos X, y la hidrólisis enzimática modificó el patrón de difracción de rayos X y aumentó significativamente la cristalinidad, presentando valores de 28.1%, 40.1% y 60.8% en la parte nativa, la hidrolizada por 16 horas y 20 horas respectivamente. Las propiedades térmicas mostraron menores valores de ΔH y aumento en las temperaturas de gelatinización en los almidones hidrolizados enzimáticamente en su comparación con los nativos. La determinación del tamaño de partícula del almidón de maíz nativo e hidrolizados durante 16 y 20 h se determinó mediante difracción de rayos láser y mostró valores de 15.83, 14.97 y 14.72 micrómetros respectivamente. Se puede observar una ligera reducción con el aumento del tiempo de hidrólisis, posiblemente debido a la erosión enzimática superficial.

Los almidones modificados enzimáticamente (16 y 20 h) en mezcla con goma arábica en una proporción 85:15 fueron utilizados para encapsular ácido ascórbico mediante secado por aspersion. Se evaluaron las características morfológicas de las microcápsulas mediante microscopía electrónica de barrido, el tamaño de partícula, la a_w y humedad, la eficiencia de microencapsulación (superficie y retención), la estabilidad de ácido ascórbico mediante un estudio de envejecimiento acelerado y la bioaccesibilidad mediante un estudio de digestión *in vitro* y su cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Las

microcápsulas obtenidas con almidones hidrolizados enzimáticamente en mezcla con goma arábiga se compararon con controles (microcápsulas de malanga y con microcápsulas de goma arábiga). Las microcápsulas formadas por almidón modificado de maíz más goma arábiga presentaron morfología variada, con una distribución tamaño de partícula diferente. Las microcápsulas formadas con almidón nativo de malanga formaron agregados similares a “palomitas de maíz”. Las microcápsulas obtenidas con almidones modificados enzimáticamente presentaron un menor porcentaje de retención de vitamina C, con valores alrededor del 70% y las otras compuestas de malanga y goma arábiga alrededor del 90%; sin embargo, la degradación de ácido ascórbico fue menor durante el almacenamiento en el almidón hidrolizado enzimáticamente por 16 horas. Entre las microcápsulas obtenidas con los almidones modificados, las obtenidas con almidón de maíz modificado por 16 horas presentaron una degradación de ácido ascórbico significativamente menor durante el almacenamiento. Las microcápsulas que presentaron menor a_w y contenido de humedad fueron las formadas por goma arábiga, seguidas de las de almidón modificado por 16 horas en mezcla con goma arábiga.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|----|
| I. INTRODUCCIÓN..... | 8 |
| II. MARCO TEÓRICO | 10 |
| 2.1. Microencapsulación..... | 10 |
| 2.2. Morfología de las microcápsulas | 11 |
| 2.3. Procesos de encapsulación | 13 |
| 2.3.1. Secado por aspersión..... | 16 |
| 2.4. Materiales microencapsulantes..... | 17 |
| 2.4.1. Almidón..... | 18 |
| 2.4.2. Almidón como material pared | 21 |
| 2.4.3. Almidón modificado enzimáticamente | 22 |
| 2.5. Materiales microencapsulados..... | 29 |
| 2.5.1. Vitaminas..... | 29 |
| 2.6. Mecanismos de liberación..... | 34 |
| III. JUSTIFICACIÓN..... | 35 |
| IV. OBJETIVOS..... | 36 |
| 4.1. Objetivo general | 36 |
| 4.2. Objetivos específicos | 36 |
| V. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 37 |
| 5.1. Materiales | 37 |
| 5.2. Métodos..... | 37 |
| 5.2.1. Almidón de maíz (Parte experimental I)..... | 37 |
| 5.2.1.1. Hidrólisis enzimática del almidón | 37 |
| 5.2.1.2. Almidón total..... | 40 |
| 5.2.1.3. Contenido de amilosa..... | 40 |
| 5.2.1.4. Caracterización morfológica de los almidones | 41 |
| 5.2.1.4.1. Microscopía electrónica de barrido (MEB) | 41 |
| 5.2.1.5. Caracterización estructural de los almidones..... | 41 |
| 5.2.1.6. Caracterización fisicoquímica de los almidones | 42 |
| 5.2.1.6.2. Análisis rápido de viscosidad | 43 |

| | |
|---|----|
| 5.2.2. Microcápsulas (Parte experimental II)..... | 44 |
| 5.2.2.1.1. Microencapsulación de vitamina C..... | 44 |
| 5.2.2.3. Actividad de agua de las microcápsulas..... | 45 |
| 5.2.2.4. Caracterización morfológica de las microcápsulas..... | 45 |
| 5.2.2.6. Eficiencia de encapsulación-Cuantificación de ácido ascórbico..... | 46 |
| 5.2.2.7. Estabilidad de la vitamina C microencapsulada- Prueba de envejecimiento acelerado | 46 |
| 5.2.2.8. Bioaccesibilidad de vitamina C- Modelo de digestión In vitro..... | 47 |
| 5.2.3. Análisis estadístico | 50 |
| VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES | 51 |
| 6.1 Almidón total | 51 |
| 6.2 Hidrólisis enzimática de almidón de maíz | 52 |
| 6.3 Contenido de amilosa en almidones de maíz nativo e hidrolizados | 54 |
| 6.4 Difracción de rayos X en almidones de maíz nativo e hidrolizados..... | 55 |
| 6.5 Tamaño de partícula de almidones de maíz nativo e hidrolizados..... | 57 |
| 6.6 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) | 60 |
| 6.7 Análisis Rápido de Viscosidad (RVA)..... | 62 |
| 6.8 Formación de microcápsulas y tamaño de partícula | 63 |
| 6.9 Caracterización microscópica de las microcápsulas | 64 |
| 6.10 Actividad de agua y contenido de humedad de las microcápsulas | 64 |
| 6.11 Eficiencia de encapsulación | 67 |
| 6.12 Estudio de envejecimiento acelerado..... | 69 |
| 6.13 Modelo de digestion in vitro de microencapsulados..... | 73 |
| VII. CONCLUSIONES | 78 |
| VIII.REFERENCIAS | 79 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|---|----|
| Cuadro 1. Métodos de encapsulación y su aplicación en diferentes materiales (Palma-Rodriguez, 2012). | 15 |
| Cuadro 2. Características de partículas de ácido ascórbico obtenidas mediante diferentes técnicas de encapsulación..... | 33 |
| Cuadro 3. Composición y concentraciones de compuestos utilizados en los jugos digestivos en el modelo de digestión <i>in vitro</i> (Modificado de Hur, Decker y McClements, 2009). | 49 |
| Cuadro 4. Parámetros de análisis de perfil térmico, mediciones realizadas a los tratamientos de almidón, mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) ¹ . .. | 61 |
| Cuadro 5. Parámetros de análisis de perfil de viscosidad, mediciones realizadas a los tratamientos de almidón, mediante uso del Analizador Rápido de Viscosidad (RVA) ¹ | 63 |
| Cuadro 6. Parámetros de análisis fisicoquímicos en las microcápsulas..... | 68 |
| Cuadro 7. Parámetros de eficiencia de encapsulación en las microcápsulas obtenidas..... | 68 |
| Cuadro 8. Efecto del material pared sobre el porcentaje de liberación de AA en cada fase de la digestión <i>in vitro</i> | 77 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estructura de los diferentes tipos de microcápsulas: a) estructura simple regular, b) estructura simple irregular, c) multipared, d) multinúcleo y e) matriz. ... | 12 |
| Figura 2. Esquema de técnicas de microencapsulación..... | 14 |
| Figura 3. Diferentes enzimas implicadas en la degradación del almidón.. .. | 24 |
| Figura 4. Diagrama experimental parte I. | 38 |
| Figura 5. Diagrama experimental parte II. | 39 |
| Figura 6. Representación esquemática del modelo de digestión <i>in vitro</i> | 48 |
| Figura 7. Micrografías por microscopía electrónica de barrido (x1000) de almidón hidrolizado enzimáticamente 12 horas (A), 16 horas (B), 20 horas (C) y (x4000) de almidón hidrolizado enzimáticamente 12 horas (D), 16 horas (E) y 20 horas (F).. | 53 |
| Figura 8 . Patrones de difracción de rayos X de los almidones nativos y modificados por hidrólisis enzimática | 56 |
| Figura 9. Distribución de tamaño de partícula en las diferentes muestras de almidón. | 59 |
| Figura 10. Termograma de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). | 61 |
| Figura 11. Micrografías por microscopía electrónica de barrido de microencapsulados de: almidón hidrolizado enzimáticamente 16 horas + goma arábica (6:1 p/p) x1000 (A) y x3500 (E), almidón hidrolizado enzimáticamente 20 horas + goma arábica (6:1 p/p) x1000 (B) y x3500 (F), malanga x1000 (C) y x3500 (G) y goma arábica x1000 (D) y x3500 (H). | 66 |
| Figura 12. Envejecimiento acelerado de microencapsulados de ácido ascórbico (H.R. 52.5% y temperatura 55°C)..... | 72 |
| Figura 13. Curva de calibración de ácido ascórbico en determinación por HPLC-UV | 74 |
| Figura 14. Cromatogramas HPLC-UV correspondientes a la curva de calibración de ácido ascórbico. | 75 |
| Figura 15. Cromatogramas HPLC-UV correspondientes a la digestión en la fase salival en el día uno de los microencapsulados con ácido ascórbico..... | 76 |

I. INTRODUCCIÓN

La microencapsulación constituye un enfoque prometedor para proteger ingredientes activos y/o sustancias sensibles al ambiente, reducir la reactividad y mejorar la estabilidad de los compuestos en el exterior, y/o permitir una liberación controlada del material del núcleo al ambiente exterior, entre otros (Bansode, Banarjee, Gaikwad, Jadhav y Thorat, 2010; De Azeredo, 2005; Desai y Park, 2005; Singh, Hemant, Ram y Shivakumar, 2010). Los trabajos publicados reportan la incorporación de varias moléculas bioactivas, por ejemplo, enzimas (Estevinho, Carlan, Blaga y Rocha, 2016), saborizantes (Estevinho, Rocha, Santos y Alves, 2013), vitaminas (Estevinho, Carlan, Blaga y Rocha, 2016; Nesterenko, Alric, Silvestre y Durrieu, 2014), fármacos, probióticos, entre otros en pequeñas partículas. Aunque se han desarrollado muchas técnicas de encapsulación, el secado por aspersión es el método de encapsulación comúnmente empleado. Sin embargo, la elección del material pared puede ser crítica, ya que afecta la eficiencia de encapsulación y la estabilidad de las microcápsulas resultantes. Una buena elección para un material de pared debe basarse en sus propiedades fisicoquímicas tales como solubilidad en agua, baja viscosidad, peso molecular, formación de película y propiedades emulsionantes (Gharsallaoui, Roudaut, Chambin, Voilley y Saurel, 2007). Los biopolímeros como proteínas y carbohidratos (almidones modificados) han sido aprobados para uso alimentario y percibidos como "etiqueta amigable", utilizándose en industrias alimentarias y farmacéuticas para este propósito (Piorkowski y McClements, 2013).

Los almidones modificados enzimáticamente atraen la atención debido a su gran capacidad de adsorción por los poros formados (Zhang, Cui, Liu y Gong, 2012). Estos almidones contienen abundantes poros desde la superficie hasta el centro de los gránulos, aumentando la superficie de contacto, y actuando como excelentes absorbentes naturales. En la industria alimentaria, los almidones porosos se utilizan como colorantes, especias, aromatizantes, edulcorantes y también para la adsorción de compuestos bioactivos tales como aceites, minerales, lípidos, β -caroteno, licopeno, vitaminas, entre otros (Belingheri, Giussani, Rodriguez, Ferrillo

y Vittadini, 2015; Luo, Cheng, Chen y Fu, 2013; Majzoobi, Hedayati y Farahnaky, 2015).

Por otro lado, la vitamina C es un compuesto bioactivo conocido históricamente por sus beneficios nutricionales para la salud. Tiene amplia aplicación como antioxidante, y proporcionando protección en la calidad sensorial y nutricional de los alimentos (Desai, Liu y Park, 2006). Desafortunadamente, es altamente inestable y reactivo; de hecho, experimenta una rápida degradación por diferentes mecanismos (Bastos, Araujo y Leao, 2009). La microencapsulación es una alternativa para estabilizar el ácido ascórbico y para controlar su liberación.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Microencapsulación

La microencapsulación se define como una tecnología de empaque de materiales sólidos, líquidos o gaseosos en una escala de micrómetros, cápsulas que pueden liberar su contenido a velocidades controladas bajo condiciones específicas (Gharsallaoui et al., 2007). En un sentido amplio, la tecnología de encapsulación en el procesamiento de alimentos incluye el recubrimiento de partículas diminutas de ingredientes (por ejemplo, acidulantes, grasas y sabores), así como ingredientes enteros (pasas, nueces y productos de confitería), que pueden llevarse a cabo mediante técnicas de microencapsulación y macrorevestimiento respectivamente (Desai et al., 2006). El desarrollo de productos microencapsulados inició en los años 50's, con la microencapsulación de tinta con gelatina, obteniendo microcápsulas sensibles a la presión, para la fabricación de papel copia sin carbón (Palma-Rodríguez, 2012). En la industria alimentaria, el uso de la microencapsulación ha sido útil para disminuir o eliminar limitaciones cuando se requiere la aplicación de ingredientes y aditivos alimentarios sensibles a ciertas condiciones de almacenamiento, como luz, temperatura, pH, entre otros (Augustin, Sanguansri, Margetts y Young, 2001; Gibbs, Kermasha, Alli y Mulligan, 1999).

Una de las principales ventajas de la microencapsulación es la formación de una barrera entre el ingrediente a encapsular y el medio ambiente, esto con la finalidad de proteger el ingrediente encapsulado de la oxidación, calor, acidez, alcalinidad, humedad o evaporación; además de disminuir o impedir el contacto o interacción con otros ingredientes. Otro punto crítico e importante es la liberación controlada del ingrediente encapsulado, esto bajo condiciones específicas (pH, temperatura, velocidad de agitación, acción enzimática, etc.) (Palma-Rodríguez, 2012).

El material por proteger es generalmente un líquido, pero también puede ser un sólido o un gas, el cual es conocido como material núcleo, activo, fase interna o carga útil. El material de revestimiento es llamado cápsula, material pared,

membrana, acarreador o caparazón (Gibbs et al., 1999). La liberación del contenido de la micropartícula a velocidades controladas puede ser desencadenada por cizallamiento, solubilización, calor, pH o acción enzimática (Nesterenko, Alric, Silvestre y Durrieu., 2013).

Otras ventajas de la microencapsulación son: la capacidad de transformar ingredientes líquidos en polvos con la finalidad de prevenir el aglutinamiento, modificar las propiedades del ingrediente a encapsular (tamaño de partícula, estructura, solubilidad), disminuir o evitar sabores u olores desagradables, evitar pérdidas nutricionales y mejorar el manejo de un ingrediente antes de su procesamiento (Kuang, Oliveira y Crean, 2010; Shahidi & Han, 1993).

La eficiencia de encapsulación así como la liberación controlada del ingrediente encapsulado, dependen de la composición y estructura del material pared, así como de las condiciones de almacenamiento y aplicación de las microcápsulas (por ejemplo: temperatura, pH, presión, humedad, etc.) (Gharsallaoui et al., 2007 & Madene, Jacquot, Scher y Desobry, 2006).

2.2. Morfología de las microcápsulas

La estructura general de una microcápsula consiste de dos componentes: el ingrediente encapsulado y el revestimiento (Palma-Rodriguez, 2012).

En su forma más simple, una microcápsula es una esfera pequeña entre 1-5000 μm de tamaño, con una pared uniforme rodeándola (Nesterenko et al., 2013; Fang y Bhandari, 2010). Prácticamente, el núcleo puede ser un material cristalino, una partícula adsorbente, una emulsion o una suspensión.

Dependiendo de la tecnología de proceso utilizada para producir microcápsulas, así como material núcleo y pared del cual se formará, se pueden producir muchas morfologías, pero las dos principales son: cápsula mononuclear, la cual tiene un solo núcleo envuelto por una capa, mientras que los otros son agregados, es decir muchos núcleos envueltos en una matriz (Fang & Bhandari, 2010; Gharsallaoui et al, 2007; Nazzaro, Orlando, Fratianni y Coppola, 2012;

Nesterenko et al., 2013). También se pueden producir microcápsulas con múltiples paredes o capas. En la Figura 1 se presentan diferentes tipos de morfologías de distintas microcápsulas.

Aunque la palabra cápsula implica una estructura de núcleo y cubierta, el término microcápsulas admite no solo partículas o gotas encerradas en la membrana, sino también dispersión en la matriz sólida que carece de una fase de pared externa distintiva, así como de tipos intermedios. En términos de arquitectura, las cápsulas se pueden dividir en dos grupos: aquellas en las que el núcleo está claramente concentrado en la región central, rodeado por una película definida y continua del material pared, y aquellas en las que el núcleo es uniformemente dispersado en una matriz. El primer grupo puede ser clasificado como sistema del tipo reservorio, y caracteriza las verdaderas microcápsulas; y el segundo, clasificado como microsferas. La principal diferencia entre las microcápsulas y las microsferas está en el hecho de que, en las microsferas, una pequeña fracción del material encapsulado permanece expuesto en la superficie, lo que es evitado por la verdadera encapsulación. Sin embargo, el término encapsulación ha sido utilizado en su sentido más amplio, englobando tanto la formación de microcápsulas como de microsferas (Singh, et al., 2010).

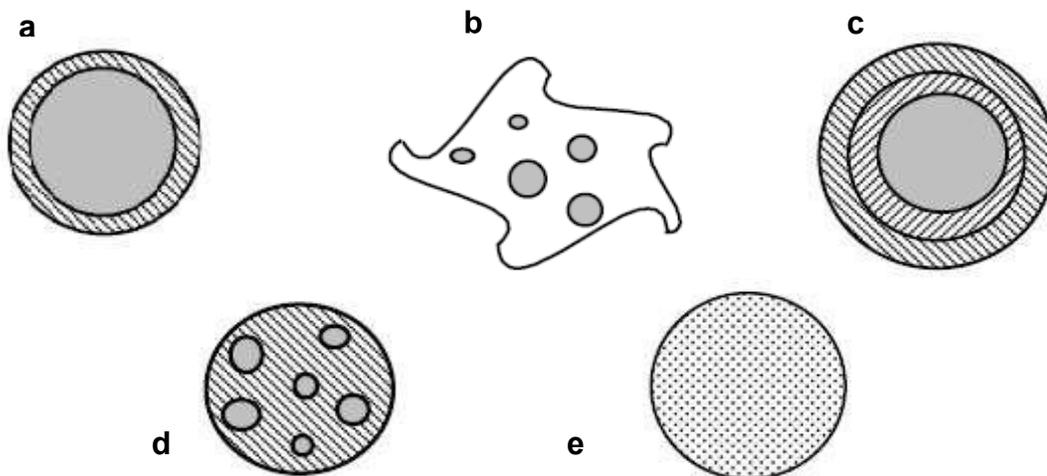


Figura 1. Estructura de los diferentes tipos de microcápsulas: a) estructura simple regular, b) estructura simple irregular, c) multipared, d) multinúcleo y e) matriz (Modificado de Gibbs et al., 1999).

Al realizar la microencapsulación, se deben conocer las propiedades que el centro activo puede proporcionar al producto final, esto para seleccionar el material pared más adecuado. Además de las diversas condiciones de proceso a las que el centro activo será sometido antes de ser liberado. Otras características importantes que se deben considerar son: la concentración óptima del centro activo, el tamaño de partícula final, así como el mecanismo de liberación del centro activo (Augustin et al., 2008).

2.3. Procesos de encapsulación

La encapsulación del centro activo se puede llevar a cabo por diferentes métodos. La elección del método o proceso de encapsulación depende de las propiedades del centro activo y el material pared a utilizar, del mecanismo de liberación, del tipo de proceso, así como de la morfología de la microcápsula y del tamaño de partícula deseado, la biodegradabilidad y el costo del proceso. Los diferentes métodos de encapsulación han sido divididos en dos grupos: procesos químicos y mecánicos (Madene et al., 2006), se pueden observar en la Figura 2.

Los dos grupos se han empleado para encapsular una amplia gama de materiales activos (Cuadro 1).

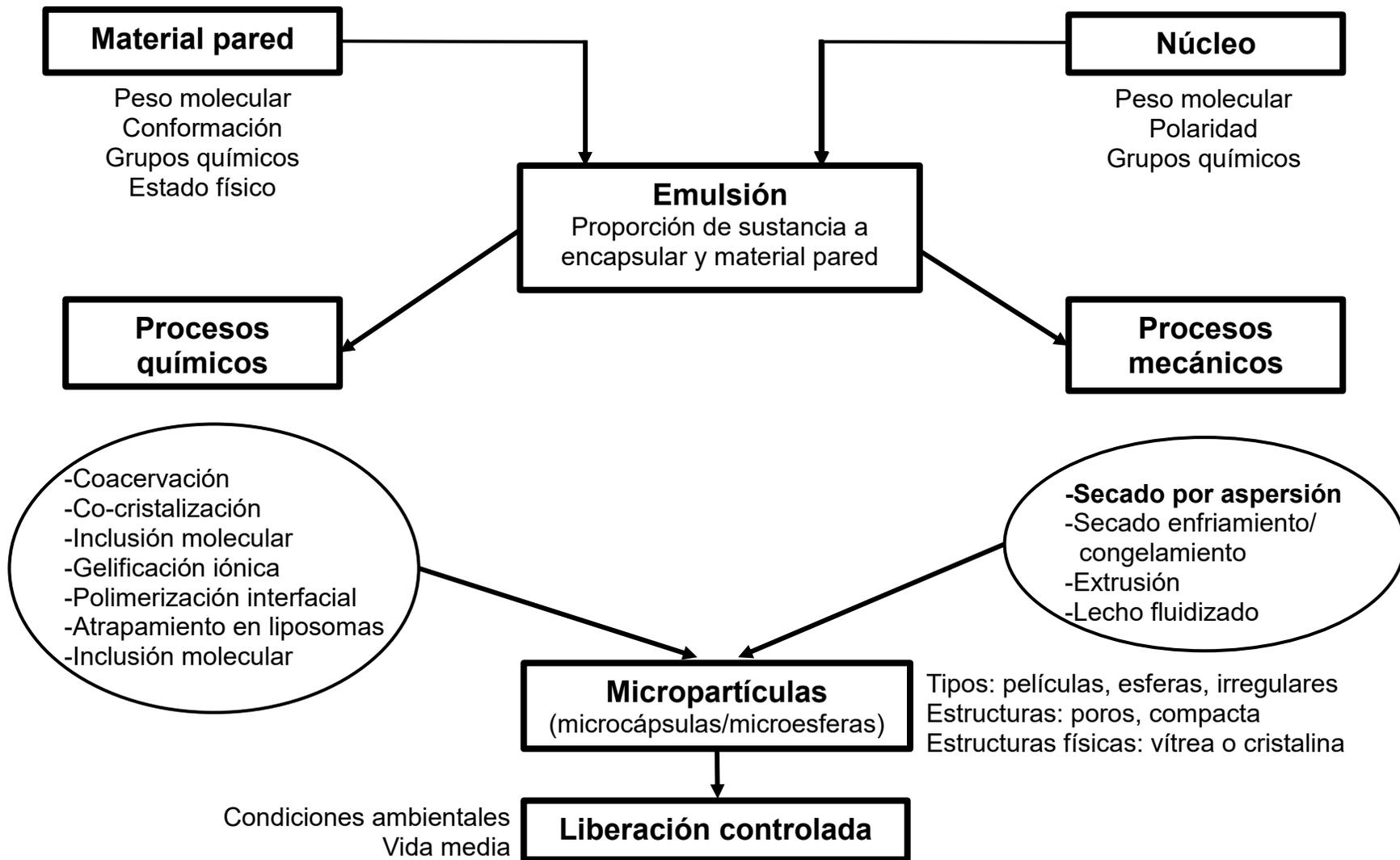


Figura 2. Esquema de técnicas de microencapsulación (Modificado de Madene et al., 2006).

Cuadro 1. Métodos de encapsulación y su aplicación en diferentes materiales (Palma-Rodriguez, 2012).

| Método | Material pared | Centro activo | Referencias | |
|------------------|------------------------------------|---|---|---|
| Químico | Coacervación | Alginato Gelatina- Acacia | Ácido fólico Vitamina A palmitato (Madziva H., Kailasapathy K. y Phillips, 2006) (Junyaprasert, Mitrevaj, Sinhaipanid y Wurster, 2001) | |
| | Complejos de inclusión | Ciclodextrina | Sabores (Reineccius, Reineccius y Peppard, 2005) | |
| | Atrapamiento por liposomas | Fosfolípidos Liposomas | Vitamina C Sulfato ferroso/Vit. C (Kirby, 1991) (Kosaraju, Tran y Lawrence, 2006) | |
| Mecánico | Extrusión | Goma Xantana | <i>B. lactis</i> (McMaster, Kokott y Mazutti, 2005) | |
| | Recubrimiento por lecho fluidizado | Gelatina, Carbohidratos, lípidos | Vitamina C (Knezevic, Gosak, Hraste y Jalsenjako, 1998) | |
| | Aspersión por congelamiento | Lípidos | Vitamina C, sulfato ferroso (Schrooyen, van der Meer y Kruif, 2001) | |
| | Secado por aspersion | Almidón modificado | β -caroteno | (Loksuwan, 2007) |
| | | Maltodextrina/ Goma arábica, Qitosano | Vitamina C | (Righetto y Netto, 2006; Desai y Park, 2005b) |
| Goma de mesquite | | Aceite de cárdamo | (Beristain, Garcia y Vernon, 2001) | |
| | Goma arábica | Ácido linoléico | (Fang, Shima y Adachi, 2005) | |

2.3.1. Secado por aspersion

Aunque se han desarrollado muchas técnicas para microencapsular compuestos, el secado por aspersion es la tecnología más comúnmente usada en la industria de los alimentos debido a su bajo costo y equipo disponible (Gharsallaoui et al., 2007). Al disminuir el contenido y la actividad de agua, el secado por aspersion generalmente se usa para asegurar la estabilidad de productos, evitar el riesgo de degradaciones, reducir los costos de transporte y almacenamiento y finalmente para obtener un producto con propiedades específicas como solubilidad.

El secado por aspersion es una operación unitaria mediante la cual un producto líquido es atomizado en una corriente de gas caliente para obtener un polvo instantáneamente. El gas generalmente usado es aire. El líquido inicial alimentado al aspersor puede ser una solución, una emulsión o una suspensión. Dependiendo del material inicial alimentado y de las condiciones de operación, el secado por aspersion produce un polvo muy fino (Gharsallaoui et al., 2007); razón por la cual es una técnica común para producir encapsulados de alimentos (Ahmed, Akter, Lee y Eun, 2010; Ferrari, Marconi y Aguirre, 2012; Medina, García, Calderas y González, 2013;).

La calidad de los polvos producidos depende de las características de la solución alimentada (viscosidad, velocidad de flujo, etc.), el aire de secado (temperatura, presión y flujo), contacto entre el aire caliente y las gotas en la cámara de secado, así como el tipo de atomizador utilizado (Ferrari et al., 2012). Se considera una microencapsulación eficiente mediante secado por aspersion cuando se alcanza una máxima cantidad de material núcleo dentro de las partículas de polvo, una buena estabilidad de las microcápsulas, prevención de pérdida de compuestos volátiles, y una extensión de la vida útil del producto. Por lo cual resulta importante conocer las características del material a secar, así como las especificaciones deseadas del polvo (Medina et al., 2013). La conveniencia del uso de esta técnica radica en los tiempos cortos de producción y la factibilidad económica, lo cual es un parámetro crucial para aquellos productos sensibles al

calor, debido a que promueve una alta retención de sabor, olor y nutrientes (Ahmed et al., 2010; Ferrari et al., 2012).

2.4. Materiales microencapsulantes

El material pared afecta la estabilidad de las micropartículas, la eficiencia del proceso y el grado de protección del centro activo. Los materiales comúnmente usados son polímeros sintéticos y biopolímeros tales como carbohidratos, grasas, ceras y proteínas de origen animal y vegetal. En la industria alimentaria, se encuentran: azúcares, polisacáridos naturales y modificados, así como polímeros sintéticos (Bakowska y Kolodziejczyk, 2011; Fang y Bhandari, 2010). Cada grupo de materiales tiene ciertas ventajas y desventajas. Por esta razón, muchos revestimientos son en realidad formulaciones compuestas de cualquiera o todas las anteriores. La elección de los materiales pared depende de una serie de factores que incluyen: objetivos y requisitos esperados del producto; naturaleza del material del núcleo; el proceso de encapsulación; y si el material de recubrimiento está aprobado por la FDA (Estados Unidos) o por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (Zuidam, 2010).

La funcionalización de cadenas poliméricas de los materiales pared hace posible obtener micropartículas con nuevas propiedades, por ejemplo, la resistencia a la acción de agentes químicos.

Para la encapsulación de compuestos, el material pared no debe tener reactividad con el material del núcleo; deben estar presentes en una forma que sea fácil de manejar, es decir con baja viscosidad a altas concentraciones; permitir una eliminación completa del disolvente en cualquier proceso que requiera una fase de desolvatación; dar la máxima protección del ingrediente activo frente a los factores externos; asegurar buenas propiedades de estabilización de la emulsión y un comportamiento efectivo de redispersión para tener una liberación controlada (Shahidi y Han, 1993; Trubiano y Lacourse, 1988).

De los biopolímeros más utilizados como soporte o material pared en la encapsulación mediante secado por aspersión se encuentran los carbohidratos (Kenyon, 1995 & McNamee et al., 1998). La capacidad de los carbohidratos, tales como almidones, maltodextrinas, sólidos de jarabe de maíz y gomas de acacia, para unir compuestos se complementa por su diversidad, bajo costo y uso generalizado en los alimentos y los hace la elección preferida para la encapsulación (Dziezak, 1988; Mutka y Nelson, 1988) Además, estos materiales tienen propiedades, tales como viscosidades bajas a altos contenidos en sólidos y buena solubilidad que son deseables en un agente encapsulante. Se conoce que el almidón y los productos derivados de él, tales como las maltodextrinas y la β -ciclodextrina, encapsulan y las interacciones entre el encapsulado y estos polisacáridos han sido objeto de considerables estudios (Goubet, Le Quere y Voilley, 1998).

2.4.1. Almidón

El almidón es el principal carbohidrato de reserva en plantas y es uno de los biopolímeros más utilizados en diversas aplicaciones industriales (Wang y White, 1994a). Este polisacárido se encuentra de manera natural en forma de gránulos, localizados en el tejido de las plantas, ya sea en los cloroplastos de las hojas verdes o en los amiloplastos de semillas (cereales), leguminosas y tubérculos (Browman y Russell, 2001; Sajilata, Singhal y Kulkarni, 2006). Los gránulos de almidón son diferentes entre las diversas especies botánicas que lo sintetizan. Estas diferencias se ven reflejadas en la morfología del gránulo (forma y tamaño), grado de cristalinidad, organización cristalina interna, contenido de amilosa y amilopectina, así como en la estructura de la amilopectina (Palma-Rodriguez, 2012).

Por ejemplo, se ha observado que los gránulos del almidón de papa presentan forma ovalada o elipsoidal, en el caso del maíz son poliédricos y esféricos (Tester, Karkalas y Qi, 2004), mientras que otros cereales como el arroz, cuyo tamaño de gránulo es pequeño, se caracteriza por presentar formas irregulares (Jane, Kasemsuwan, Leas, la, Zobel y Robyt, 1994). En el amiloplasto

se pueden sintetizar varios gránulos de almidón de tamaño pequeño, como en el arroz, o sólo se sintetiza un gránulo por amiloplasto, como es el caso del maíz y papa (Vandeputte y Delcour, 2004).

En cuanto a tamaño, se han encontrado gránulos desde 1 μm hasta algunos que llegan a medir 100 μm , y de acuerdo con esto se han clasificado en gránulos grandes ($>25 \mu\text{m}$), medianos (10-24 μm), pequeños (5-9 μm) y muy pequeños ($< 5 \mu\text{m}$). En maíz, se ha reportado un tamaño de gránulo entre 3-20 μm (Tester et al., 2004), en arroz entre 2 y 7 μm (Vandeputte y Delcour, 2004) y en papa de 5 a 110 μm (Tester et al., 2004).

Esta diversidad de formas y tamaños de los gránulos, así como sus constituyentes moleculares (amilosa y amilopectina), influyen sobre la funcionalidad del almidón.

Amilosa. Es un polímero lineal de unidades de glucosa unidas por enlaces α (1-4), en el cual algunos enlaces α (1-6) pueden estar presentes. Esta molécula no es soluble en agua, pero puede formar micelas hidratadas por su capacidad para enlazar moléculas vecinas por puentes de hidrógeno y generar una estructura helicoidal que es capaz de desarrollar un color azul por la formación de un complejo con el yodo (Knutzon y Grove, 1994). La configuración más estable de la amilosa en solución a temperatura ambiente es en forma helicoidal, lo cual explica muchas de sus propiedades fisicoquímicas y funcionales. En general, esta molécula se encuentra en una proporción de 20-35% para almidones normales, en ciertos casos alcanza niveles menores al 15% en los denominados tipo ceroso o “waxy”, o mayor al 40% en los llamados “altos en amilosa” (Tester y Karkalas, 2002). Los almidones de maíz se consideran como normales, ya que su contenido de amilosa se encuentra entre 20 y 30%.

Amilopectina. Es un polímero ramificado de unidades de glucosa unidas en un 94-96% por enlaces α (1-4) y en un 4-6% con uniones α (1-6). Dichas ramificaciones se localizan aproximadamente a cada 15-25 unidades de glucosa. La amilopectina es parcialmente soluble en agua caliente y en presencia de yodo

produce un color rojizo violeta (Guan y Hanna, 2004). En 1972, French propuso el modelo de “racimo” (cluster) para describir la forma en que se encuentra esta molécula en los gránulos de almidón nativo. Las cadenas se organizan en dobles hélices, las cuales tienen una longitud de 6 nm de largo. Las áreas intercristalinas (amorfas) se presentan a intervalos de 0.6-0.7 nm y contienen mayor cantidad de enlaces α -(1-6), siendo relativamente susceptibles a agentes hidrolíticos (ácidos y enzimas). La amilopectina es quizás el componente que tiene mayor importancia en función de las propiedades del almidón, dado que su estructura y propiedades contribuyen notablemente en la composición y funcionalidad del gránulo, por lo que esta molécula ha sido estudiada ampliamente en función de su tamaño molecular, ramificación y longitud de las cadenas internas y externas (Bello, Paredes, Roger y Colonna, 1996; Thurn y Burchard, 1985; Zobel, 1988).

2.4.1.1. Propiedades fisicoquímicas del almidón

Las propiedades más importantes por considerar para determinar la utilización del almidón en el área de los alimentos incluyen las fisicoquímicas: gelatinización y retrogradación; y las funcionales: solubilidad, hinchamiento, absorción de agua, sinéresis y comportamiento reológico de sus pastas y geles. Los gránulos de almidón se encuentran en un sistema polimérico semicristalino, donde la cristalinidad varía de 15 a 45%, y es atribuida a las cadenas cortas lineales de la amilopectina, que forman dobles hélices organizadas en una estructura cristalina tridimensional (Zobel, 1988; Wang y White, 1994b). Durante el proceso de gelatinización, el orden molecular dentro de los gránulos es destruido gradual e irreversiblemente, por esto la temperatura de gelatinización es característica para cada tipo de almidón y depende fundamentalmente de la transición vítrea de la fracción amorfa del almidón (Wang y White, 1994b). Algunos eventos ocurren durante el proceso: el orden molecular, y por lo tanto la birrefringencia, se pierde; los gránulos pierden su cristalinidad, absorben gran cantidad de agua, provocando el hinchamiento y un aumento en su volumen. Se disuelven algunas moléculas, particularmente la amilosa, que se difunde hacia el agua y, si el calentamiento continúa, se rompen y se observa una disolución

parcial. La pasta de almidón obtenida después de la gelatinización no es estable, ya que durante el almacenamiento se presentan transformaciones estructurales que, en conjunto, reciben el nombre de retrogradación. Las fuentes convencionales más importantes para la extracción de este polisacárido son los granos de cereales como el maíz, trigo, arroz y sorgo; tubérculos como la papa, y yuca; encontrándose también en leguminosas y frutas (Eerlingen y Delcour, 1995) presentan diversas características fisicoquímicas, estructurales y funcionales, que amplíen la gama de usos en la industria.

2.4.2. Almidón como material pared

El almidón ha sido empleado como material pared en la encapsulación, debido a sus propiedades filmogénicas, es versátil y útil no solo por tratarse de un material natural, biodegradable y barato, sino también por la facilidad con la que sus propiedades fisicoquímicas pueden ser modificadas (Betancur et al., 2004).

Beirao, Duarte, Moldao y Beirao (2011) reportaron la obtención de agregados esféricos a partir de almidón de arroz, respectivamente. Estos agregados esféricos se formaron cuando una solución de almidón se sometió a secado por aspersion, a una temperatura menor a la de gelatinización en presencia de pequeñas cantidades de agentes aglutinantes, como proteínas o polisacáridos solubles. Los agregados esféricos, parecidos a “palomitas de maíz”, tienen una estructura porosa, es decir, presentan espacios abiertos los cuales pueden ser utilizados para la encapsulación de ingredientes activos.

Trindade y Grosso (2000) evaluaron la estabilidad del ácido ascórbico encapsulado usando como material pared almidón de arroz y como agente aglutinante gelatina (1 y 2 %). Además, los agregados esféricos fueron recubiertos con pectato de calcio. Ellos reportan que al incrementar la concentración del agente aglutinante aumenta la estabilidad del ácido ascórbico durante el almacenamiento (90 días, 21 y 45 °C y 60-65% HR). También observaron que al recubrir los agregados la estabilidad es mayor en comparación con los agregados no recubiertos.

Una de las modificaciones aplicadas a los almidones para su uso como material pared, es la esterificación. La esterificación se lleva a cabo mediante la adición del grupo octenil, obtenido del n-octenilsuccinato (n-OSA). Estos almidones adquieren una parte lipofílica por la incorporación de grupos hidrofóbicos alquénil, pero también conservan la parte hidrofílica que le proporciona la amilosa y amilopectina, haciéndolo un buen emulsionante. Es por esto, que este tipo de almidones se utilizan para la encapsulación de sabores, fragancias y vitaminas liposolubles (Drusch y Schwarz, 2006). Sin embargo, estos almidones tienen algunas limitaciones, ya que no proporcionan gran protección contra la oxidación. La selección del tipo de modificación está influenciada por el método de encapsulación, el ingrediente a encapsular y la aplicación final de las microcápsulas.

Palma, Agama, González, Vernon, Álvarez y Bello (2013) evaluaron la estabilidad del ácido ascórbico encapsulado usando como material pared almidones modificados de arroz, maíz y papa mediante un tratamiento ácido. Se formaron agregados esféricos parecidos a “palomitas de maíz”. Estos autores reportan que al modificar el almidón nativo de arroz aumenta la retención del ácido ascórbico (de 57.7 % hasta 93.3%).

2.4.3. Almidón modificado enzimáticamente

La estructura del almidón nativo puede ser poco eficiente como material pared, debido a que algunas de sus propiedades (solubilidad, viscosidad, peso molecular, relación amilosa-amilopectina, etc.) limitan su aplicación en la microencapsulación. Sin embargo, una de las ventajas que tiene este polisacárido es que dichas propiedades, fisicoquímicas y funcionales, pueden cambiarse mediante la modificación de su estructura nativa, mejorando la eficiencia y estabilidad en la microencapsulación mediante secado por aspersion.

La modificación puede ser química, física o enzimática. La ventaja de la modificación enzimática en comparación con las otras es que existe una gamma amplia de enzimas amilolíticas que van a actuar en diferentes enlaces y partes del

almidón, lo que da como resultado un control de subproductos después de la hidrólisis. Algunos estudios han sido realizados en cuanto a hidrólisis enzimática de almidón de diferentes fuentes para obtención de azúcares fermentables (Gao, Li, Bi, Mao y Adhikari, 2014), mientras que en otros estudios se ha evaluado la modificación de almidón, incluso en combinación con otros métodos físicos y químicos, para mejorar su funcionalidad en aplicaciones comunes en la industria, como son, el uso como espesante, estabilizador, agente gelificante, aumentador de volumen y retenedor de agua, así como para incrementar su digestibilidad en el tracto intestinal humano cuando es consumido en diferentes derivados (Ayodeji, Opeyemi, Vincent y Adeola, 2013; Uthumporn, Karim y Fazilah, 2013). Se ha reconocido que mediante la hidrólisis de almidón es posible disminuir el peso molecular promedio de éste, disminuyendo el tamaño de las moléculas de almidón y la viscosidad de las dispersiones preparadas, lo que favorece para su posterior aplicación, el almidón modificado presenta alta estabilidad a cambios de pH y temperatura, aumentando el poder aglutinante, dando transparencia a la pasta, disminuyendo la retrogradación y aumentando la estabilidad ante el congelamiento y descongelamiento (Aritzizábal, Moreno y Basto, 2007; Shamekh, Päivi, Kaisa y Forsse, 2002).

2.4.3.1. Amilólisis

Una variedad de diferentes enzimas está involucrada en la síntesis de almidón. La sacarosa es el punto de partida de la síntesis de almidón. Se convierte en el azúcar nucleótido ADP-glucosa que forma la molécula iniciadora real para la formación de almidón. Posteriormente, las enzimas como la almidón-sintasa soluble y la enzima ramificadora sintetizan las moléculas de amilopectina y amilosa. Una gran variedad de bacterias emplea enzimas extracelulares o intracelulares capaces de convertir el almidón o el glucógeno que pueden servir como fuentes de energía y carbono (figura 3).

En la industria se emplean enzimas para modificar el almidón, tales como: α -amilasa, glucoamilasa, β -amilasa, isoamilasa, pululanasa y ciclodextrín glucanotransferasa (Fennema, 1993). La α -amilasa, es una endoglicosidasa, la

cual hidroliza las moléculas de amilosa y amilopectina, dando origen a la formación de oligosacáridos. Además, esta enzima actúa solamente sobre los enlaces 1,4 del almidón, pero no ataca los segmentos del polímero de almidón que forman las dobles hélices, ni a los que se encuentran en forma de complejo con un lípido polar. Por otra parte, la glucoamilasa produce unidades de D-glucosilo, a partir de los extremos no reductores de las moléculas de amilosa, amilopectina y aquellos que están unidos por enlaces 1,6. De este modo, esta enzima puede hidrolizar el almidón completo, para dar solamente moléculas de D-glucosa.

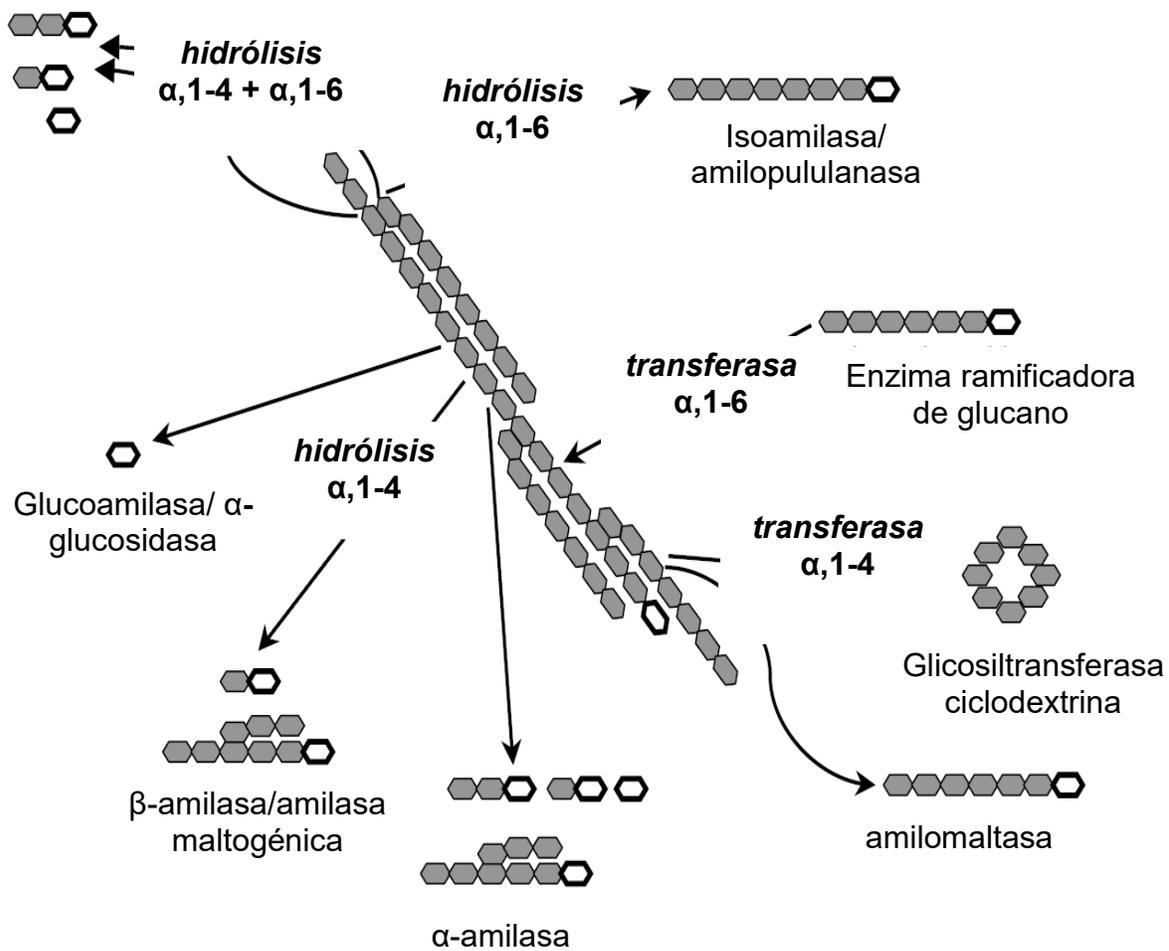


Figura 3. Diferentes enzimas implicadas en la degradación del almidón. La estructura de anillo abierto simboliza el extremo reductor de una molécula de poliglucosa (Modificada de van der Maarel, van der Veen, Leemhuis y Dijkhuizen, 2002).

2.4.3.2. Almidones nativos porosos

Varios métodos de microscopía como microscopía electrónica de barrido (MEB) y microscopía electrónica de transmisión (MET) se han utilizado para estudiar la morfología de los gránulos de los almidones. Cuando se observó bajo MEB, la superficie de los gránulos de almidón de maíz, trigo, cebada, centeno, sorgo y mijo pareció distribuirse con poros (Jane, 2009; Liu, 2005; Sujka y Jamroz, 2007). Según el diámetro, los poros del almidón se pueden clasificar en: 1) macroporos [> 50 nm], 2) mesoporos [$2 - 50$ nm] y 3) microporos [<2 nm] (Sujka & Jamroz, 2007). El diámetro y la distribución de los poros en los gránulos de almidón varían con las fuentes de almidón, el tamaño de los gránulos de almidón, la etapa de cosecha y la ubicación del gránulo de almidón en un órgano de almacenamiento. La mayoría de los gránulos grandes en los almidones de cereales tienen relativamente más poros en comparación con los gránulos pequeños. Los gránulos de almidón localizados más cerca del germen tienen numerosos poros que los gránulos en otras partes del grano de cereal. Además, los gránulos de almidón en grano de cereal (por ejemplo, maíz) cosechados en la última etapa de madurez tienen más poros que gránulos cosechados en la etapa temprana de madurez. Los poros de los gránulos de almidón son las aberturas externas de los canales que se ejecutan internamente para conectar la cavidad en la región del hilio del gránulo (Dhital, et al., 2010; Jane, 2009; Sujka y Jamroz, 2007). El tamaño y la forma de la cavidad difieren con las fuentes de almidón. Por ejemplo, los almidones de maíz, las cavidades son de forma irregular o en forma de estrella (Jane, 2009).

Los poros, canales y cavidades son características de gránulos naturalmente existentes en los almidones y son posiblemente importantes para las difusiones enzimáticas o químicas (Dhital, et al., 2010; Liu, 2005; Sujka y Jamroz, 2010). Sin embargo, los poros y canales de la superficie del gránulo pueden o no estar asociados con componentes menores del almidón, como proteínas y fosfolípidos (Han, Benmoussa, Gray, BeMiller y Hamaker, 2005; Han y BeMiller, 2008; Han y Hamaker, 2002a; Lee & BeMiller, 2008).

2.4.3.3. Estudios de almidones modificados enzimáticamente

Los almidones modificados enzimáticamente atraen mucho la atención debido a su gran capacidad de adsorción por los poros formados (Zhang et al., 2012). Estos almidones contienen abundantes poros desde la superficie hasta el centro de los gránulos, que aumentan la superficie específica, actuando como excelentes absorbentes naturales. De hecho, existe un creciente interés en explotar sus propiedades en diferentes áreas de alimentos y no alimentos.

Para obtener más propiedades funcionales y mejorar el rendimiento como materiales de pared, los gránulos de almidón pueden modificarse en cápsulas porosas que tienen aplicaciones industriales. La presencia de características estructurales como poros, canales y cavidades en el almidón de maíz (Dhital, Shrestha y Gidley, 2010) proporciona un espacio expandible que puede llenarse. Las estructuras aumentan el área superficial y facilitan una susceptibilidad de hidrólisis enzimática relativamente más alta en comparación con el almidón de papa (Dhital et al., 2010). Por lo tanto, el almidón de maíz es aplicable para ser modificado en cápsulas porosas por digestión enzimática. El material del núcleo podría adsorberse físicamente en los poros y las cavidades sin ningún enlace covalente, y las moléculas adsorbidas podrían liberarse completamente en un patrón sostenido (Wang, Yuan y Yue, 2015). También se ha demostrado que el almidón de maíz parcialmente hidrolizado permanece lentamente digerible, como el almidón nativo no tratado (Zhang, Ao y Hamaker, 2006), lo que sugiere que puede utilizarse para la administración dirigida al intestino grueso. El proceso de digestión enzimática del almidón de maíz resultó en un aumento de 3 a 4 veces en la magnitud del área superficial específica (Gao, Li, Bi, Mao y Adhikari, 2013). Sin embargo, se requieren más estudios para comprender el efecto de la microestructura del almidón poroso en las propiedades de las microcápsulas.

En la industria alimentaria, los almidones porosos se utilizan como materiales portadores de colorantes, especias, aromatizantes, edulcorantes y también para la protección de elementos sensibles tales como aceites, minerales, vitaminas, lípidos bioactivos, pigmentos alimenticios sensibles a la luz tales como

β -caroteno y licopeno sensibles a la luz, oxidación o temperatura elevada (Belingheri et al., 2015; Luo et al., 2013; Majzoobi et al., 2015).

Zhao y Whistler (1994) mostraron que los gránulos pequeños de almidón tienen la capacidad de combinarse en esferas porosas interesantes y potencialmente útiles, cuando se secan por aspersion con pequeñas cantidades de agentes de unión tales como proteínas o una amplia gama de polisacáridos solubles en agua. Por lo tanto, el tratamiento de gránulos de almidón con enzimas amilolíticas puede crear una estructura más altamente porosa (Fannon, Shull y BeMiller, 1993; Karathanos y Saravacos, 1992; Yamada, Hisamatsu, Teranishi, Katsuro, Hasegawa y Hayashi, 1995; Zeller y Salleb, 1996).

Whistler, Madson, Zhao y Daniel (1996) observaron que los gránulos de almidón de maíz perforados tienen una esterificación cinco veces mayor que los gránulos nativos.

Zhang et al., (2012) caracterizaron y estudiaron las propiedades de adsorción de almidón de maíz modificado enzimáticamente con violeta de metilo. La relación máxima de adsorción entre estos compuestos fue de 38.1% en comparación con los almidones nativos.

Luo et al. (2013) reportaron que con un grado de hidrólisis enzimática del 60% de almidón de yuca, se logra complejar hasta 100 mg de zinc/g de almidón de yuca. Hasta 8 veces más que el almidón nativo.

La unión de los compuestos al almidón se ha clasificado en dos tipos.:

1. El compuesto rodeado por la hélice de amilasa a través del enlace hidrófobo se conoce como complejo de inclusión (Arvisenet, Le Bail, Voilley y Cayot, 2002; Boutboul, Giampaoli, Feigenbaum y Duvruet, 2002).
2. Las interacciones polares que implican enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de los compuestos de almidón y otros compuestos (Arvisenet et al., 2002; Boutboul et al., 2002).

Se demostró que la amilosa es capaz de formar complejos de inclusión con un amplio espectro de moléculas (Escher, Nuessli y Conde-Petit, 2000; Kuge y Takeo, 1968; Solms, 1986).

2.4.4. Goma arábiga

La goma arábiga (o goma acacia) está constituida por un arreglo altamente ramificado de galactosa, arabinosa, ramnosa y el ácido glicurónico, que contienen todavía alrededor del 2% de un componente proteico ligado covalentemente a ese arreglo molecular, desempeñando un papel crucial en la determinación de las propiedades emulsificantes de la goma (Flindt, Al-Assaf, Phillips y Williams, 2005).

Se considera históricamente como el material encapsulante por excelencia, gracias a su solubilidad, baja viscosidad, buenas propiedades emulsificantes, sabor suave y alta estabilidad oxidativa conferida a los aceites (Verbeken, Dierckx y Dewettinck, 2003). Es indigesta tanto para humanos como para animales, no degradado en el intestino, pero fermentado en el colon para producir ácidos grasos de cadena corta, lo que conduce a una gran variedad de posibles beneficios para la salud (Phillips y Phillips, 2011). Uno de estos beneficios es su efecto prebiótico. Se ha afirmado que la suplementación de cuatro semanas con goma arábiga (10 g / día) condujo a aumentos significativos en *Bifidobacteria*, *Lactobacteria* y *Bacteriodes*, lo que indica un efecto prebiótico (Calame, Weseler, Viebke, Flynn y Siemensma, 2008). Otros efectos incluyen la reducción del nivel plasmático en animales y humanos (Sharma, 1985), el efecto anticancerígeno (Nasir, Wang, Föller, Bhandaru, Sandulache, Artunc, Ackermann, Ebrahim, Palmada, Klingel, Saeed y Lang, 2010) y el efecto antioxidante (Ali, Al-Qarawi, Haroun y Mousa, 2003) con un papel protector contra las toxicidades hepáticas y cardíacas. Además de eso, se ha afirmado que la goma arábiga alivia los efectos de la insuficiencia renal crónica en los seres humanos; sin embargo, se necesitan estudios adicionales para la confirmación (Ali, Al-Salam, Al-Husseni, Kayed, Al-Masroori, Al-Harhi, Al Zaabi y Nemmar, 2010; Glover, Ushida, Phillips y Riley, 2009).

Por otro lado, tiene alto costo y problemas de disponibilidad, ya que es producida en regiones sujetas a variaciones climáticas imprevisibles y conflictos políticos, lo que puede comprometer su oferta. Así, la búsqueda por sustitutos totales o parciales para la goma arábica ha sido incentivada (Williams y Phillips, 2000).

2.5. Materiales microencapsulados

En la industria de alimentos, la microencapsulación ha sido utilizada para proteger diferentes ingredientes activos, como consecuencia de esto las propiedades de dichos ingredientes pueden modificarse, por ejemplo, materiales higroscópicos pueden ser protegidos de la humedad, así como ingredientes volátiles o sensibles al calor, luz u oxidación, presentando una mayor estabilidad. Los trabajos publicados informan de la incorporación de varias moléculas bioactivas en pequeñas partículas.

2.5.1. Vitaminas

Las vitaminas son moléculas sensibles, deben ser preservadas a partir de elementos pro-oxidantes que puedan afectar su integridad química y disminuir sus beneficios fisiológicos.

La encapsulación constituye un enfoque prometedor para preservar sus propiedades nativas en el tiempo. Los sistemas clásicos desarrollados en nano o microencapsulación se basan en depósito o partículas matriciales. Estos sistemas pueden constituir una barrera fisicoquímica contra elementos pro-oxidantes tales como radicales libres, oxígeno o UV. La encapsulación también representa un medio para mejorar las eficiencias biológicas tales como la vida media, el control de la liberación de compuestos activos y podría prevenir la aparición de efectos secundarios. Todos los procesos de encapsulación deben conducir a partículas con un alto índice de encapsulación, un buen índice de polidispersidad (PDI) y alta vida útil. En cuanto a las aplicaciones de alimentos, la inclusión de partículas cargadas de vitaminas en la matriz alimentaria creará el llamado alimento funcional

o nutraceuticos. Este tipo de funcionalidad implicará el uso de GRAS o de grado alimentario (Generalmente Recognized As Safe) para la formulación de partículas. Las vitaminas y los carotenoides, incluso encapsulados, podrían ser alterados por algunos procesos industriales (alta presión, temperatura, esfuerzo cortante, etc.).

La microencapsulación de α -tocoferol por secado por aspersión se ha estudiado con diferentes materiales de paredes naturales tales como maltodextrina y goma arábica (Faria, Mignone, Montenegro, Mercadante y Borsarelli, 2010), proteína de guisante y carboximetilcelulosa (Pierucci, Mignone, Montenegro, Mercadante y Borsarelli, 2006), y mostraron una eficiencia de retención que oscila entre el 73% y el 87%.

Nesterenko et al. (2013) mostraron que la acilación de aislado de proteína de soja, condujo a un tamaño y una viscosidad de las gotitas de la emulsión más bajas debido a las propiedades tensoactivas mejoradas. Debido a la mayor afinidad entre el material de núcleo hidrófobo y la proteína acilada, la eficiencia de retención aumentó de 79,7% a 94,8%.

En el trabajo de Gonçalves, Estevinho y Rocha (2016), se estudió la microencapsulación de vitamina A (retinol) mediante la técnica de secado por aspersión. Las micropartículas con 20% (p/v) de goma arábica fueron capaces de asegurar la protección completa y consecuente estabilización de la vitamina A, registrándose la liberación de la cantidad total inicial.

2.5.1.1. Ácido ascórbico

La vitamina C es un compuesto bioactivo conocido históricamente por sus beneficios nutricionales para la salud. Amplia aplicación como antioxidante, y proporcionando protección en la calidad sensorial y nutricional de los alimentos (Desai y Park, 2005). Desafortunadamente, este aditivo es altamente inestable y reactivo; de hecho, experimenta una rápida degradación por diferentes mecanismos (Bastos, Araujo y Leao, 2009). La microencapsulación es una alternativa para estabilizar el ácido ascórbico y para controlar su liberación.

Kirby (1991) evaluó la retención de vitamina C de encapsulado en liposomas. Se observó una retención máxima de ácido ascórbico de 75% en 10 días a 25 °C.

En otro estudio, Trindade y Grosso (2000) evaluaron la estabilidad del ácido ascórbico microencapsulado con almidón de arroz y goma arábica, como materiales pared. Reportando que la goma arábica le brinda una mejor estabilidad al ácido ascórbico que el almidón de arroz. Por otra parte, se ha reportado que el uso de una mezcla de maltodextrinas y goma arábica en una relación 3:1, le proporcionó una protección más efectiva a la vitamina C del jugo de cereza y al ácido ascórbico sintético (Righetto y Netto, 2006). El ácido ascórbico de jugo de cereza es más estable a altas temperaturas de almacenamiento (35-45°C) en comparación con el ácido ascórbico sin encapsular, lo que puede estar asociado a la presencia de compuestos fenólicos en el jugo, que evitan su degradación.

Xie, Wang, Liu, Guo, Zhu y Niu, (2010) observaron una eficiencia de retención de ácido ascórbico de 60% utilizando gelatina como material pared, mediante la técnica de revestimiento de lecho fluidizado. También se presentó una eficiencia de encapsulación de 77%.

Palma, Agama, Mendez, González, Vernon y Bello, (2012) determinaron la retención total de vitamina C en microcápsulas de almidón nativo de arroz y almidón modificado (arroz, maíz y papa) con un 57.7%, 93.3% 64.4% y 100% respectivamente. Aunado a esto realizó un estudio del contenido de vitamina C en las microcápsulas a diferentes tiempos de almacenamiento y en condiciones extremas (52.86 % HR y 55 °C). Se observó una mayor estabilidad en el almidón de papa modificado, reteniendo hasta en un 65% hasta la semana 8 de almacenamiento.

En el estudio de Ordoñez y Herrera (2012), se concluyó que la goma arábica con el tiempo disminuye la capacidad de retener compuestos bioactivos, y el uso de almidón de yuca mejora la estabilidad de los materiales pared.

Martínez, Vargas, Román y Palma, (2017) evaluaron la estabilidad del ácido ascórbico microencapsulado por secado de aspersion con almidón de chayotextle modificado por hidrólisis ácida más tres ciclos de autoclave como material pared. Reportaron una retención total del 82.3 %.

Actualmente, debido a que la industria de alimentos es un mercado dinámico y que el sector de los productos fortificados sigue en aumento, existe el interés por seguir buscando y/o produciendo, materiales de revestimiento y técnicas que permitan mantener la estabilidad de la vitamina C por un tiempo de almacenamiento prolongado (Cuadro 2).

Cuadro 2. Características de partículas de ácido ascórbico obtenidas mediante diferentes técnicas de encapsulación.

| Método de encapsulación | Referencias | D (V, 0.5) (µM) | Eficiencia % (p/p) | Características |
|-----------------------------------|--|-----------------|--------------------|---|
| Secado por Aspersión | Trindate y Grosso, 2000 | 8-20.5 | 100 | Partículas tamaño micro, alta calidad, solubles en agua, bajo costo de operación. Estabilidad interna mayor que la superficial. Fácil de escalar. |
| | Pierucci et al., 2006 | 1.83-8.21 | >84 | |
| | Esposito, Cervellati, Menegatti, Nastruzzi y Cortesi, 2002 | 7.3-19.43 | 98-100 | |
| | Finotelli y Rocha-Leao, 2005 | 4.75-7.6 | 100 | |
| | Desai y Park, 2006 | 4.1-7.3 | 58.3-68.7 | |
| Recubrimiento de lecho fluidizado | Knezevic et al. 1998 | >315 | - | Variedad de material de recubrimiento disponible. Proceso complejo y de alto costo. |
| Liposomas | Kirby, 1991 | - | 53-55 | Método desarrollado y complejo. |
| | Sharma y Lal, 2005 | 0.2-1.0 | 59 | |
| Extrusión | Bouquerand, 2007 | 500-1000 | - | Adecuado para producción a gran escala, pero los costos iniciales son más altos. |
| | Chang, Abbas, Hayat, Xia, Zhang, Xie y Kim 2010 | 500-1000 | 96 | |
| Coacervación | Uddin, Hawlader y Zhu, 2001 | 51.4 | ~100 | Más caro que el secado por aspersión. Material pared limitado. |
| Recubrimiento por aspersión | Lee, Ahn y Kwak, 2003 | - | 88.9-95 | Mejor protección contra la humedad y la oxidación. Complejo y alto costo. |

2.6. Mecanismos de liberación

El material pared debe ofrecer un mecanismo de liberación mediante el cual el centro activo este disponible en el momento adecuado y a una velocidad específica de liberación. La liberación controlada está en función de algunas características del material pared (tipo, solubilidad, peso molecular, estado cristalino), del centro activo (concentración, solubilidad y peso molecular), así como de la propia microcápsula (tipo de estructura interna y relación centro activo/material pared) (Kim y Morr, 1996). Los mecanismos de liberación de las microcápsulas se llevan a cabo por una disolución normal en agua, por cambios en la temperatura, por reacciones químicas o enzimáticas, o por cambios en la presión osmótica del sistema (Gibbs et al., 1999). La eficiencia de liberación, depende principalmente de la composición y estructura del material pared, pero también de las condiciones de operación durante la producción y aplicación de las microcápsulas (temperatura, pH, presión, humedad) (Vos, Faas, Spasojevic y Sikkeme, 2009).

III. JUSTIFICACIÓN

La encapsulación constituye un enfoque prometedor para preservar los compuestos sensibles a las condiciones del medio ambiente en el tiempo, mejorar las eficiencias biológicas tales como la vida media y el control de la liberación de compuestos activos.

Debido a esto, existe una búsqueda constante de nuevos materiales de revestimiento que conduzcan a partículas con un alto índice de encapsulación, un buen índice de polidispersidad y alta vida útil.

Con el fin de sustituir los polímeros sintéticos y los productos derivados de los animales, existe un creciente interés en el desarrollo de materiales naturales para nuevas aplicaciones. Los polímeros naturales tales como el almidón, han atraído considerables actividades de investigación debido a su disponibilidad, biodegradabilidad, carácter renovable y diversas propiedades funcionales interesantes, en el cual se ha reportado que su estructura y morfología influyen sus propiedades. Estas últimas limitan su aplicación como material pared y canales internos de relleno, por lo que se recurre a la modificación con el fin de adecuar estas propiedades para un uso específico.

Debido a lo anterior se plantea que se caracterice fisicoquímica y morfológicamente el almidón de maíz sometido a hidrólisis enzimática para obtener un compuesto perforado con canales internos, evaluar sus propiedades, su efecto protector y de bioaccesibilidad en la encapsulación de vitamina C, un compuesto muy utilizado en la industria de los alimentos.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

- Caracterizar morfológica y fisicoquímicamente el almidón de maíz modificado enzimáticamente y evaluar el efecto que éste tiene en mezcla con goma arábica, en la encapsulación de ácido ascórbico, así como la estabilidad de las microcápsulas formadas y la bioaccesibilidad de éstas, comparándolas con controles.

4.2. Objetivos específicos

- Caracterizar morfológica, fisicoquímica y estructuralmente el almidón de maíz modificado enzimáticamente, con el apoyo de microscopía electrónica de barrido y difracción de rayos láser, calorimetría diferencial de barrido y análisis rápido de viscosidad; y difracción de rayos x respectivamente y poder comparar con el almidón nativo de maíz.
- Caracterizar morfológicamente las microcápsulas obtenidas de almidón modificado, almidón de gránulo pequeño y goma arábica mediante microscopía electrónica de barrido, y evaluar su eficiencia de encapsulación.
- Evaluar la estabilidad de la vitamina C en las microcápsulas durante el tiempo de almacenamiento mediante un estudio de envejecimiento acelerado.
- Evaluar la bioaccesibilidad en las microcápsulas de vitamina C mediante un estudio de digestión *in vitro*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

El almidón de maíz nativo se adquirió de ALMEX-México (Guadalajara, Jalisco, México). Goma arábiga-51198, L ácido ascórbico - A7506 (AA), mezcla de enzimas α -amilasa - A3306, y glucoamilasa - 9032-08-0, se adquirieron de Sigma-Aldrich de México (Toluca, Estado de México, México). El kit "Total Starch Assay" (K-TSTA-50A) fue adquirido por Megazyme International (Irlanda, Wicklow, Irlanda). La malanga fue donada por la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec (Oaxaca, México).

5.2. Métodos

En las Figuras 4 y 5 se observan los diagramas de los procedimientos que se realizaron al almidón de maíz, así como el proceso de microencapsulación de la vitamina C con el almidón modificado

5.2.1. Almidón de maíz (Parte experimental I)

5.2.1.1. Hidrólisis enzimática del almidón

La muestra de almidón de maíz comercial (25 % p/v) en buffer de acetato de sodio (50 mM, pH 4.02) se hidrolizó con una mezcla de enzimas (α -amilasa y glucoamilasa) (10 U/g de almidón) para los tratamientos de 12, 16 y 20 horas en un baño de agua a 30 °C con agitación a 380 rpm. La hidrólisis se terminó con la neutralización del pH con hidróxido de sodio 1M. Los hidrolizados se lavaron tres veces con agua destilada. La mezcla se dejó en reposo, se separó el sobrenadante y los sólidos se secaron en un horno de convección a 35 ° C durante 24 h. Una vez que la muestra estaba seca, se pasó a través de un molino y una malla 325 (45 μ m), y se almacenó en un contenedor sellado hasta que se requirió para el análisis.

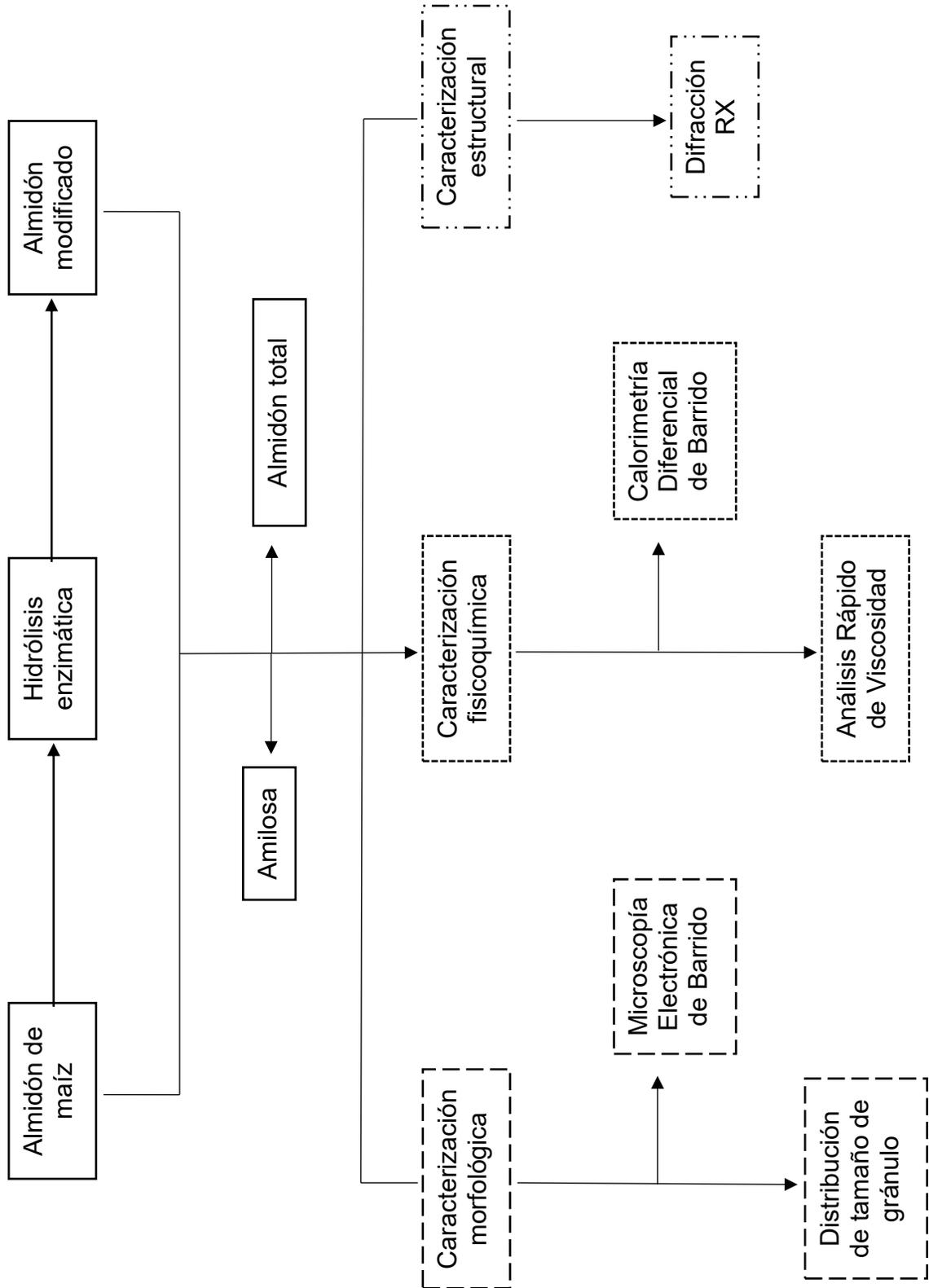


Figura 4. Diagrama experimental parte I.

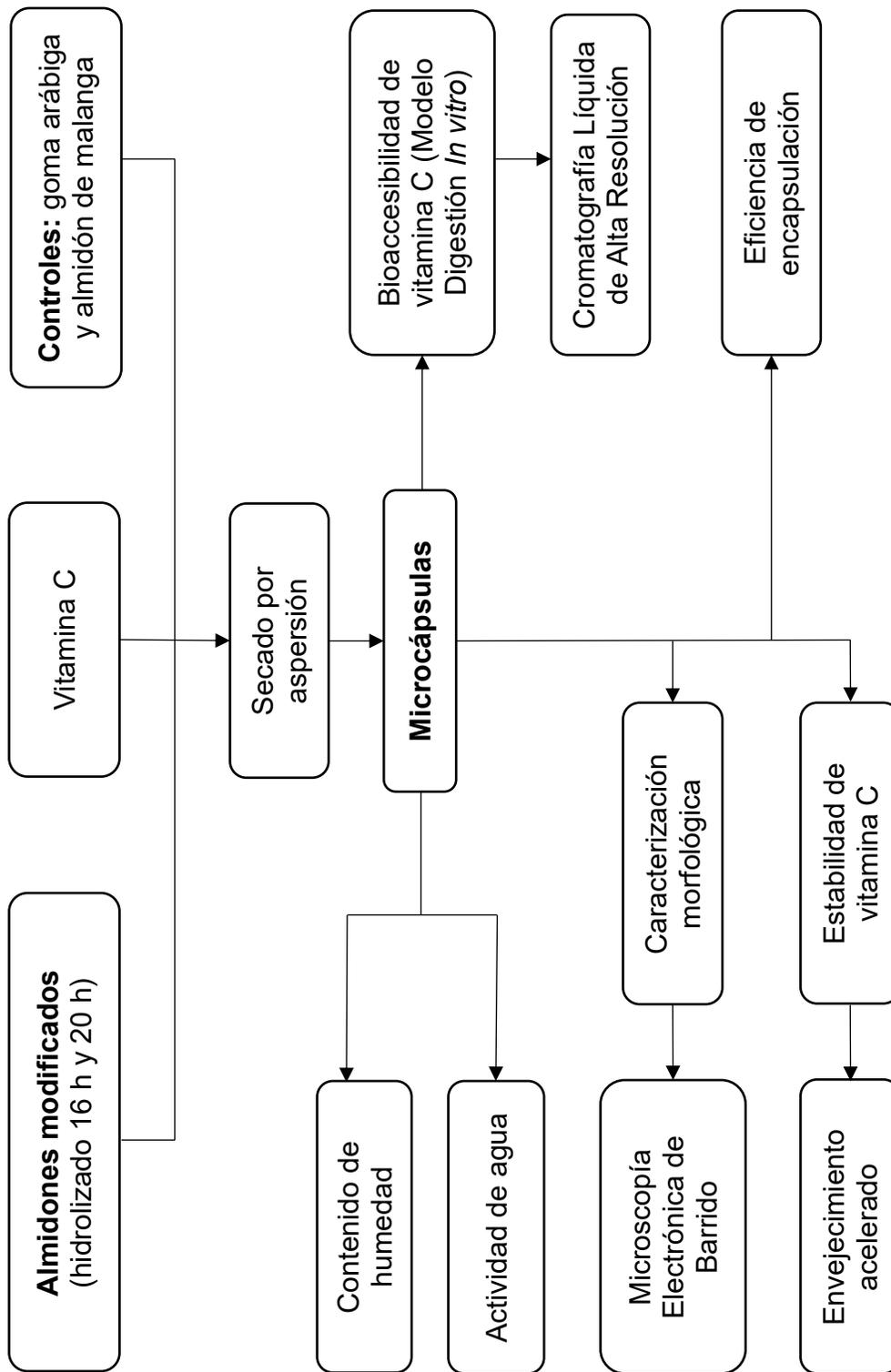


Figura 5. Diagrama experimental parte II.

5.2.1.2. Almidón total

Para evaluar la pureza de los almidones nativos e hidrolizados enzimáticamente por 16 y 20 horas, se calculó el contenido de almidón total mediante el procedimiento del kit Megazyme (Método amiloglucosidasa/ α -amilasa). Se pesaron aproximadamente 100 mg de almidón (peso seco) en tubos de vidrio con tapa, el cual se humedeció con 0.2 mL de etanol (80 % v/v) y se mezcló con el apoyo de un vortex. Se agregaron 2 mL de KOH 2M y se agitó por 20 minutos. Posteriormente se añadieron 8 mL de buffer de acetato de sodio (pH 3.8) a cada tubo e inmediatamente se agregaron 0.1 mL de α -amilasa termoestable y 0.1 mL de amiloglucosidasa, se mezcló bien y se incubó en un baño maría a 50 °C durante 30 min. Después se transfirió el líquido a un matraz de 100 mL y se aforó con agua destilada, se mezcló y se centrifugó una alícuota a 1,800 g x 10 minutos. Se transfirieron 0.1 mL del sobrenadante a un tubo (por duplicado). Se añadieron 3 mL del reactivo GOPOD a cada tubo (incluyendo controles de glucosa y blanco) y se incubaron a 50 °C por 20 minutos. Para el control de glucosa se agregaron en un tubo: 0.1 mL de D-Glucosa y 3 mL de GOPOD y se incubó a 50 °C por 20 minutos. Para el blanco se añadieron 0.1 mL de agua destilada y 3 mL de GOPOD y se incubó a 50 °C por 20 minutos. Por último, las absorbancias se leyeron a una longitud de onda de 510 nm.

5.2.1.3. Contenido de amilosa

El contenido de amilosa de los almidones se determinó por una modificación de Hoover y Ratnayake (2001), al método propuesto por McGrance, Cornell y Rix, (1998). Se disolvieron 20 mg de almidón en 8 mL de hidróxido de potasio (KOH) 1M, agitando vigorosamente por 12 h a 4°C, y posteriormente se ajustó el pH a 7 con HCl concentrado y diluído y se aforó a 25 mL. Se tomó una alícuota de 0.5 mL de esta solución y se transfirió a un matraz aforado de 25 mL, se adicionaron 10 mL de agua destilada y 0.5 mL de una solución de I_2/KI , se aforó con agua destilada y se dejó reposar por 15 min a temperatura ambiente antes de leer la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro. Se realizó una curva de adición patrón con concentraciones de 0, 4, 8, 12, 16 y 20 $\mu\text{g/mL}$ de amilosa.

5.2.1.4. Caracterización morfológica de los almidones

5.2.1.4.1. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Para determinar la morfología de los gránulos se utilizó el método reportado por Paredes, Schevenin, Hernández y Cárabez, (1989). Las muestras de almidones nativo y modificados y los encapsuados previamente secas, se espolvorearon sobre una cinta conductora de cobre de doble adhesión, la cual se fijó previamente en un soporte de aluminio del microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5800LV. Las muestras se cubrieron con una capa de carbón de 30 nm y enseguida se colocaron en el ionizador de metales y se recubrieron con una capa de oro. Las muestras fueron observadas al microscopio electrónico de barrido a X1000 y X4000 en almidones nativos e hidrolizados y a X1000 y X3500 en las microcápsulas con ácido acórbico.

5.2.1.4.2. Distribución del tamaño del gránulo

La determinación del tamaño de partícula del almidón nativo y los almidones modificados (16 y 20 horas de hidrólisis) se realizó por análisis de difracción de rayos láser (Malvern Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK). Las mediciones se llevaron a cabo por triplicado a temperatura ambiente. El tamaño de partícula se expresó como diámetro mediano $D [V, 0.5]$, el cual es el diámetro volumen equivalente a un valor de la frecuencia acumulada de 50%.

5.2.1.5. Caracterización estructural de los almidones

5.2.1.5.1. Difracción de rayos X

Los patrones de difracción de rayos X de almidones nativo y modificados fueron obtenidos de la siguiente manera: la muestra hidratada (20-25%), fue colocada entre dos hojas de aluminio las cuales fueron selladas herméticamente. Se utilizó un difractómetro de rayos X (Bruker AXS D8 Advance diffractometer, Bruker AXS, Inc, Madison, WI, USA) con un monocromador Guiner con las

siguientes condiciones de operación: radiación CuK; un voltaje de 40 kV; la velocidad de graficación de 10 mm/2 θ y velocidad de análisis de 2 θ /min. La región de barrido con ángulo dos teta (2 Θ) fue de 4° a 40° con un tamaño de paso de 0.05°, con un tiempo de conteo de 2 segundos. El porcentaje de cristalinidad se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Cristalinidad (\%)} = \frac{A_c}{A_c + A_a} \times 100 \quad (1)$$

Donde

A_c= área cristalina sobre el difractograma de rayos X.

A_a= área amorfa sobre el difractograma de rayos X.

5.2.1.6. Caracterización fisicoquímica de los almidones

5.2.1.6.1. Calorimetría diferencial de barrido

Las propiedades térmicas de los almidones fueron estudiadas usando un calorímetro diferencial de barrido Q2000 W/MDSC (TA Instruments, Newcastle, DE), calibrado previamente con Indio. Se evaluó de acuerdo con el método propuesto por Paredes, Bello y López, (1994). Se pesaron 2±0.05 mg de almidón (en base seca, mínimo tres réplicas) dentro de una charola de aluminio hermético, posteriormente se le adicionaron 7 μ L de agua destilada. La charola se selló herméticamente y se dejó hidratar por espacio de 30 min antes de realizar el análisis. Como referencia se utilizó una charola vacía. La muestra se sometió a una rampa de temperatura de 30 a 120 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. La temperatura de inicio (T_i), la temperatura de gelatinización o de pico (T_p), la temperatura final (T_f) y la diferencia de entalpía (Δ H) se obtuvieron directamente del análisis que se realizó con el software TA Instruments, versión 4.4^a.

5.2.1.6.2. Análisis rápido de viscosidad

Los almidones de maíz fueron analizados por la metodología propuesta por Hernández, Agama, González, Bello y Vargas, (2011) utilizando el Analizador Rápido de Viscosidad (RVA Perten 4500). Se prepararon suspensiones de almidones al 14 % (p/v) de sólidos totales, 29 g en total fueron transferidos al tazón del analizador rápido de viscosidad. Se inició con una fase de acondicionamiento de la muestra mediante agitación a 960 rpm, seguido de un calentamiento a 50 °C durante 1 min, seguido de tres pasos a 160 rpm, un calentamiento de 50 °C a 91 °C de 3 min, equilibrio a 91 °C por 3.5 min y una disminución de temperatura a 50 °C de 3.5 min para concluir la prueba a 50° C durante 2 min.

5.2.2. Microcápsulas (Parte experimental II)

5.2.2.1.1. Microencapsulación de vitamina C

Antes de la microencapsulación, la goma arábica (17.6 % p/p con respecto al peso del almidón) se suspendió en agua destilada y se agitó hasta alcanzar una homogeneización. Inmediatamente, se añadió el almidón hidrolizado enzimáticamente por 16 horas y por separado el modificado durante 20 horas y se agitaron hasta que se formó una solución homogénea. Finalmente, el ácido ascórbico (10.6% p/p con respecto al almidón) se añadió a la suspensión. La relación de sólidos totales (almidón, goma y vitamina C) en agua fue de 19.25 % (p/v). La mezcla se homogeneizó con un equipo vortex y se alimentó inmediatamente al secador por pulverización (Mini Spray Dryer B-290, BUCHI Corporation, New Castle, DE). El flujo del líquido y las temperaturas del aire de entrada y salida se mantuvieron a 7 mL/min, 160 y 130 °C, respectivamente. Los polvos obtenidos mediante secado por aspersión se recogieron, se colocaron en botes de vidrio de color ámbar y se almacenaron en desecadores a temperaturas de refrigeración. Se usaron condiciones similares de secado por aspersión para encapsular AA en almidón de malanga y goma arábica, que se usaron como control en este estudio. Las muestras se marcaron de acuerdo con el nombre del polímero y la relación de mezcla.

5.2.2.2. Contenido de humedad de las microcápsulas

Se utilizaron 2 g de muestra, se colocaron en charolas de aluminio y se dejaron en un horno de aire caliente (horno de secado, mod. DHG-9075A) a 130 °C durante 1 h. (método 44-16 AACC) inmediatamente después del secado por aspersión. Por gravimetría se calculó el porcentaje de humedad.

5.2.2.3. Actividad de agua de las microcápsulas

Se determinó utilizando el equipo AquaLab S₃TE a temperatura ambiente (25 °C). Se calibró el equipo con carbón activado ($a_w < 0.500$) y agua destilada ($a_w = 1.000 \pm 0.003$); posteriormente, se introdujeron aproximadamente 1.5 gramos de muestra a la cámara y se tomó la lectura.

5.2.2.4. Caracterización morfológica de las microcápsulas

5.2.2.4.1. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

La morfología de las microcápsulas se determinó mediante MEB con el método descrito en el apartado 5.1.4.1.

5.2.2.4.2. Distribución de tamaño de partícula

La distribución de tamaño de partícula de las microcápsulas se determinó de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente la sección 5.1.4.2.

5.2.2.5. Análisis de superficie y retención de ácido ascórbico en microcápsulas

La estimación del ácido ascórbico superficial se realizó utilizando una metodología propuesta previamente (Finotelli y Rocha, 2005). Las microcápsulas (100 mg) se colocaron en 100 mL de una solución tampón de fosfato de 0,2 M, pH 6,4 (17,64 g L⁻¹ KH₂PO₄ + 14,22 g L⁻¹ Na₂HPO₄). La mezcla se agitó suavemente durante 15 s a 3 rpm con un agitador de varilla (Código: 2063MRVS12), para asegurar la integridad de la microcápsula, y se filtró. Luego se diluyó el filtrado (400 mL / 10 mL) y se analizó con un espectrofotómetro UV (Spectronics Genesys 5 UV / Vis, Spectronic Unicam, Rochester, NY, EE. UU.) A una longitud de onda de 265 nm. La concentración de AA de las muestras se determinó utilizando curvas de calibración. El mismo procedimiento se realizó por el porcentaje de retención, la única diferencia fue que la mezcla se agitó fuertemente durante 5 minutos a 12 rpm.

5.2.2.6. Eficiencia de encapsulación-Cuantificación de ácido ascórbico

El contenido de ácido ascórbico en las microcápsulas fue determinado de acuerdo a lo propuesto por Dürüst, Sümengen y Dürüst, (1997). Se pesaron 100 mg de las microcápsulas y se suspendieron en 100 mL de ácido oxálico al 0.4% con agitación durante 30 min. Posteriormente se tomó una alícuota de 1 mL de la solución.

Para realizar la medición se ajustó el espectrofotómetro (520 nm) a cero usando una mezcla de agua destilada (8 mL), regulador de acetato (1 mL) y la muestra a analizar (1 mL), seguido de esto la lectura de la muestra se realizó con 2,6-diclorofenolindofenol (8 mL al 1.2 %), regulador de acetato (1 mL) y la muestra a analizar (1 mL) este valor fue registrado como L2.

La absorbancia de ácido oxálico se realizó con 2,6-diclorofenolindofenol (8 mL al 1.2 %), regulador de acetato (1 mL) y ácido oxálico al 0.4%(1 mL), este valor corresponde a L1. Los valores de L1-L2 representan la absorbancia de la muestra Para determinar la eficiencia de encapsulación se usó la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia (\%)} = \frac{\text{Contenido final de ácido ascórbico}}{\text{Contenido inicial de ácido ascórbico}} \times 100$$

5.2.2.7. Estabilidad de la vitamina C microencapsulada- Prueba de envejecimiento acelerado

Para determinar la estabilidad de la vitamina C se realizó una prueba de envejecimiento acelerado. Las muestras (3 - 5 g) se almacenaron durante 2 meses en desecadores con una humedad relativa de 52.86 % y a una temperatura de 55 °C. Posteriormente, se tomaron muestras cada semana para cuantificar la vitamina C con el método colorimétrico como se ha descrito en la sección 5.2.4.1

5.2.2.8. Bioaccesibilidad de vitamina C- Modelo de digestión *In vitro*

La digestión *in vitro* se realizó utilizando un modelo estático (Figura 6) siguiendo la simulación de la fase digestiva presentada en Hur, Decker y McClements (2009), utilizando los jugos digestivos presentados en el Cuadro 3. Este estudio se realizó durante 28 días en almacenamiento a una temperatura controlada de 25 °C.

Se simuló la digestión de saliva agregando 6 mL de saliva a cada muestra (900 mg) y mezclando durante 5 minutos en matraces Erlenmeyer tapados en un baño de agua de agitación orbital a 37 ° C a 120 rpm (Modelo Excella E24, New Brunswick Scientific). La digestión gástrica se inició agregando 12 mL de jugo gástrico simulado a los matraces después de la digestión salival y mezclando durante 2 h adicionales. La digestión intestinal se inició al agregar 12 mL de jugo duodenal simulado y 6 mL de jugo de bilis simulado a los matraces y se mezclaron durante 2 h adicionales. Las concentraciones finales de pancreatina y extracto biliar en la digestión fueron 18 mg/mL y 60 mg/mL, respectivamente. Después de completar la digestión intestinal, se tomaron y analizaron las muestras como se describe a continuación.

La determinación de ácido ascórbico se llevó a cabo mediante un sistema cromatográfico UHPLC Acquity Arc (Waters), equipado con bomba cuaternaria, degasificador, muestreador automático, horno de columna y detector de matriz de diodos. Alícuotas de 10 µL de la digestión filtrada de cada muestra (acondicionadas a 37 ° C). El filtrado se recogió y se introdujo en la columna Luna C18 (2) 5 µm (4,6 mm de diámetro interno x 250 mm de largo), Phenomenex. La muestra se acondicionó a 28 ° C antes de la entrada. La velocidad de flujo del filtrado fue de 1 mL/min, se mezcló con H₂SO₄ al 0.01% (p / v) como diluyente (Sánchez-Mata, Cámara-Hurtado, Díez-Marqués y Torija-Isasa, 2000). La cuantificación de ácido ascórbico en cada simulación de las fases digestivas se llevó a cabo a una longitud de onda de 245 nm. La curva se realizó de 0 a 50 ppm (0, 10, 20, 30, 40 y 50 ppm).

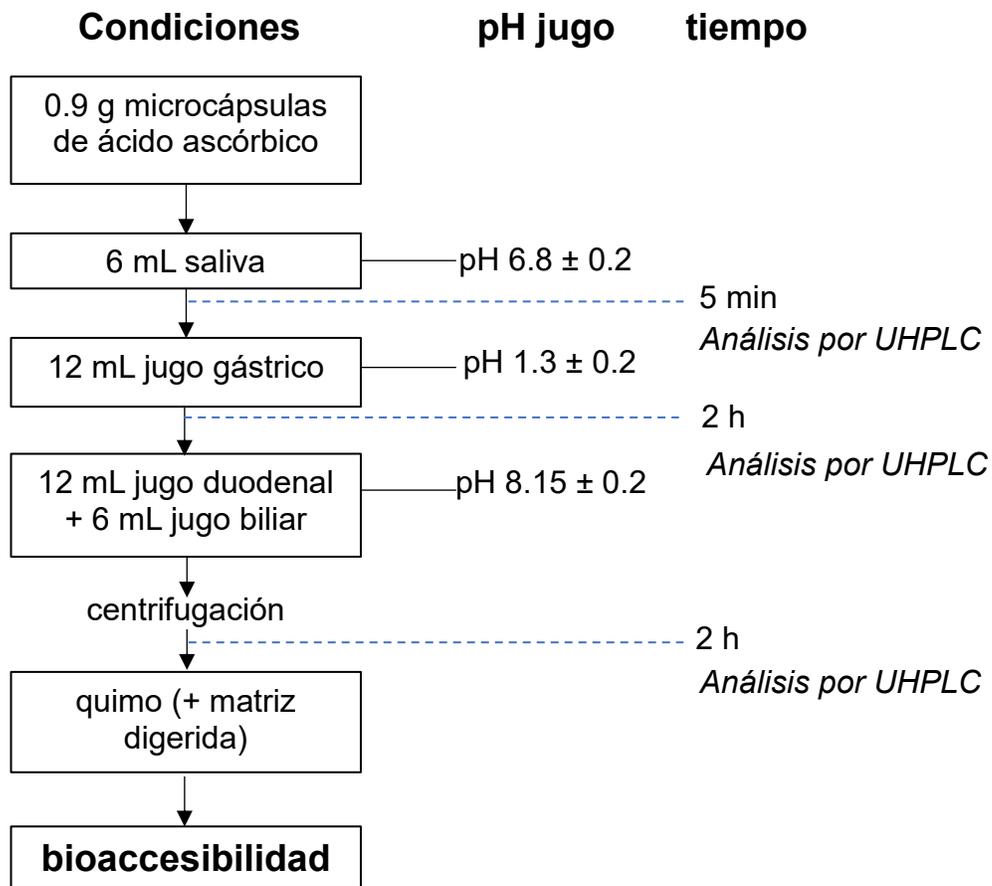


Figura 6. Representación esquemática del modelo de digestión *in vitro*. El modelo de digestión *in vitro* describe un procedimiento de tres pasos que simula los procesos digestivos en la boca, el estómago y el intestino delgado. En cada fase, la muestra se incuba a 37 °C durante un tiempo para fase. La digestión se inicia mediante la adición de saliva artificial a la muestra. Posteriormente, se agregan jugos gástricos y jugos intestinales para simular los procesos digestivos en el estómago y el intestino delgado, respectivamente. (Modificada de Versantvoort, Oomen, Van de Kamp, Rompelberg y Sips, 2005).

Cuadro 3. Composición y concentraciones de compuestos utilizados en los jugos digestivos en el modelo de digestión *in vitro* (Modificado de Hur, Decker y McClements, 2009).

| | Saliva | Jugo gástrico | Jugo duodenal | Jugo biliar | |
|----------------|--|--|--|--|----------------|
| Solución stock | 0.97 mg/mL KCl | 1.648 mg/mL KCl | 1.128 mg/mL KCl | 0.752 mg/mL KCl | |
| | 1.776 mg/mL NaH ₂ PO ₄ | 0.532 mg/mL NaH ₂ PO ₄ | 6.776 mg/mL NaHCO ₃ | 11.57 mg/mL NaHCO ₃ | |
| | 1.14 mg/mL Na ₂ SO ₄ | 0.612 mg/mL NH ₄ Cl | 0.16 mg/mL KH ₂ PO ₄ | 10.58 mg/mL NaCl | |
| | 0.356 mg/mL NaCl | 5.504 mg/mL NaCl | 14.024 mg/mL NaCl | 0.150 mL HCl (37%) | |
| | 2.744 mg/mL NaHCO ₃ | 0.8 mg/mL CaCl ₂ ·2H ₂ O | 0.1 mg/mL MgCl ₂ ·6H ₂ O | 0.5 mg/mL urea | |
| | 0.4 mg/mL urea | 6.5 mL HCl (37%) | 0.18 mL HCl (37%) | 5 mg/mL glucosa | |
| | 0.03 mg/mL ácido úrico | 0.17 mg/mL urea | 0.2 mg/mL urea | 0.444 mg/mL CaCl ₂ ·2H ₂ O | |
| | | 0.04 mg/mL ácido glucurónico | 0.4 mg/mL CaCl ₂ ·2H ₂ O | | |
| | | 1.3 mg/mL glucosa | | | |
| | | 0.66 mg/mL glucosamina hidroclicorada | | | |
| | Agregar a la solución stock | 0.525 mg/mL mucina | 5 mg/mL pepsina | 18 mg/mL pancreatina | 60 mg/mL bilis |
| | | 1.29 mg/mL α-amilasa | 60 mg/mL mucina | 3 mg/mL lipasa | |
| | | pH:6.8±0.2 | pH:1.3±0.02 | pH:8.1±0.2 | pH:8.2±0.2 |

5.2.3. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una y dos vías con un nivel de significancia del 95% ($\alpha = 0.05$). Cuando se encontraron diferencias estadísticas significativas, y para la comparación de medias se utilizó el método de comparaciones múltiples mediante la prueba de Tukey al mismo nivel de significancia. Para la obtención de los resultados se utilizó el programa estadístico IBM SPSS-STATISTICS 20.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1 Almidón total

El almidón de maíz nativo presentó un contenido de almidón total de $90.8 \pm 1.5\%$. Después del proceso de aislamiento y secado, se obtiene un polvo el cual no es 100% puro, debido a la eficiencia del proceso de purificación y a la fuente botánica, ya que los cereales presentan un porcentaje considerable de proteína, y resulta más complicada su purificación, obteniendo un almidón con menos pureza durante su aislamiento. El resto del contenido está dado por cenizas, proteínas o lípidos, presentes en los almidones, pero en mínimas cantidades.

Los almidones hidrolizados enzimáticamente durante 16 y 20 horas presentaron un porcentaje de almidón total de $85.5 \pm 0.9\%$ y $76.7 \pm 2.5\%$ respectivamente, valores estadísticamente más bajos que la parte nativa. La digestión del almidón es un proceso complejo que involucra la difusión de enzimas hacia el sustrato, la adsorción de la enzima en la superficie del almidón y luego el evento catalítico enzimático involucrado. (Yu, Tao y Gilbert, 2018). En este estudio, el almidón de maíz nativo mostró un 90,80% de almidón total. Sus valores disminuyen cuando aumenta el tiempo de hidrólisis. Un comportamiento similar fue presentado por Yu et al., (2018), relacionando la estructura molecular, con la cinética de la digestión del almidón. En el proceso de digestión del almidón están implicados varios factores como las difusiones de la enzima a través del almidón (Dhital, Warren, Butterworth, Ellis y Gidley, 2017), la estructura de la molécula de almidón, la relación amilosa/amilopectina, el tamaño y la distribución de los gránulos del almidón (Yu, Tan, Zou, Hu, Fox, Gidley y Gilbert, 2017). En este estudio el tiempo de hidrólisis juega un papel importante en el contenido de almidón total, porque en tiempos de exposición más altos, existe una hidrólisis mayor en el almidón (Ver sección 6.2, Figura 7), que afecta directamente este parámetro.

6.2 Hidrólisis enzimática de almidón de maíz

Los gránulos de almidón hidrolizados enzimáticamente se estudiaron utilizando microscopía electrónica de barrido (MEB). Esto se hizo para conocer la forma, estructura y características de superficie de los gránulos de almidón antes y después del tratamiento con α -amilasa y amiloglucosidasa. A partir de las micrografías, era evidente que la hidrólisis no ocurre de manera uniforme (Figura 7). Algunas áreas son mucho más susceptibles al ataque enzimático que otras.

Los gránulos de almidón nativo mostraron una forma irregular y en su mayoría poligonal con una superficie relativamente lisa. En los gránulos de almidón de maíz modificado enzimáticamente durante 16 horas se presentó menor cantidad de poros (Figuras 6a y 6d) y se observó una forma poliédrica, con dimensiones de 7 – 15 μm , una superficie rugosa y algunos gránulos nativos presentaron poros o canales, que han sido reportados por otros autores (Huber y BeMiller, 2000; Ferrini *et al.*, 2008).

Se puede observar como el grado de hidrólisis del almidón de maíz fue aumentando con el tiempo de exposición de las enzimas, teniendo mayor número de poros y superficie erosionada el tratamiento de 20 horas (Figuras 6c y 6f), con distintos lugares de ataque. El tiempo de hidrólisis enzimática es directamente proporcional al número y tamaño de poros formados en el almidón de maíz. La hidrólisis enzimática se lleva a cabo en diferentes partes del almidón, atacando tanto enlaces α -1,4 y α -1,6 de la amilosa y amilopectina, dando lugar a compuestos más pequeños como lo son glucosas, maltosas y otros oligosacáridos y dextrinas. Las enzimas casuaron alteraciones superficiales y degradaron la parte externa del gránulo. Aunque también actuaron en la parte interna del gránulo, a través de pequeños poros nativos por los cuáles las enzimas penetran el gránulo. Cuando los gránulos de almidón se incuban con enzimas amilolíticas, las enzimas migran a través de los canales y comienzan la hidrólisis que conduce a un patrón de digestión de adentro hacia afuera (Chen y Zhang, 2012).

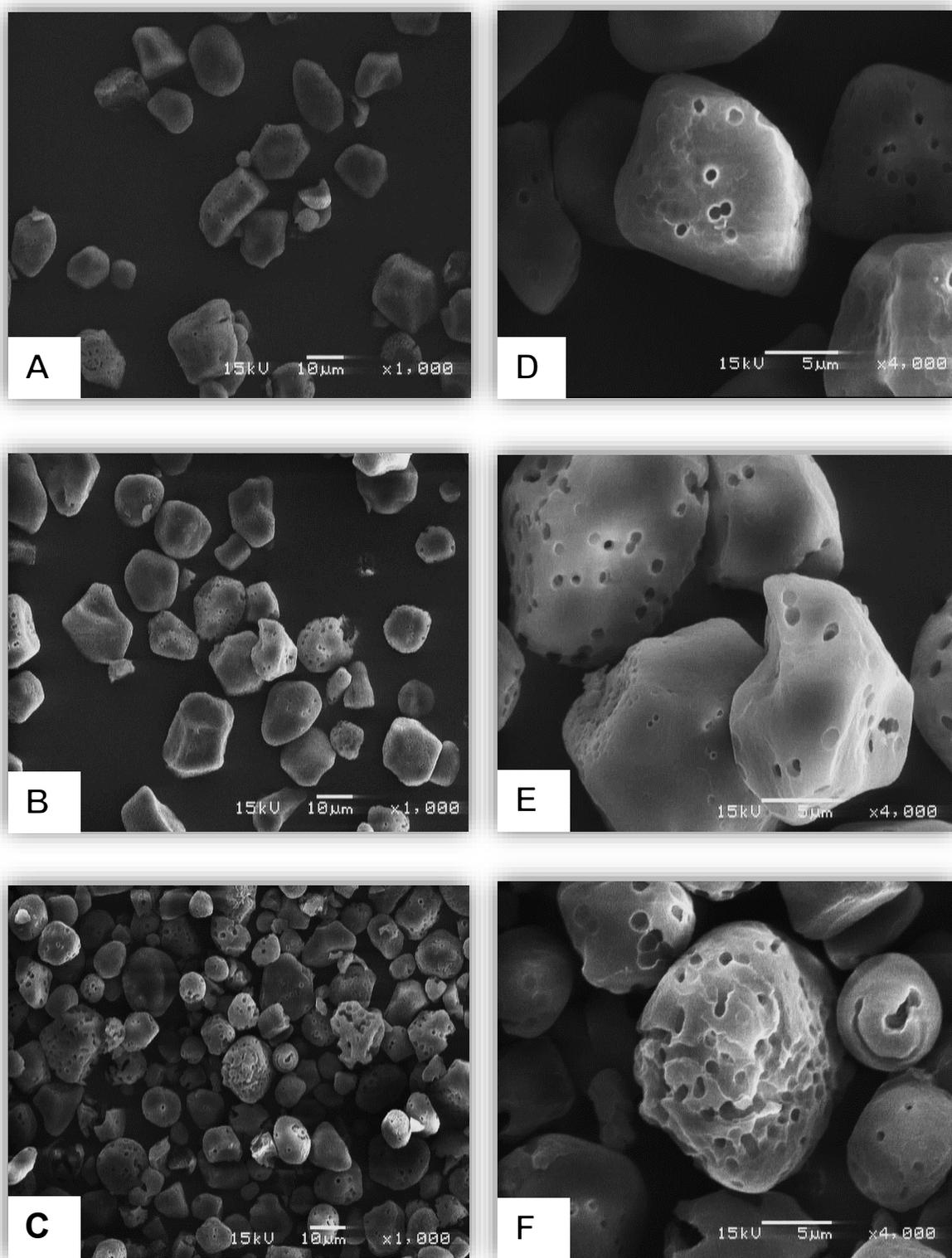


Figura 7. Micrográficas por microscopía electrónica de barrido (x1000) de almidón hidrolizado enzimáticamente 12 horas (A), 16 horas (B), 20 horas (C) y (x4000) de almidón hidrolizado enzimáticamente 12 horas (D), 16 horas (E) y 20 horas (F).

Se observaron numerosos agujeros de tamaño medio, una erosión esponjosa y superficial, distintos lugares de ataque tanto en la periferia como en la parte interna formando varios canales en toda el área del almidón, como lo reportado por Spinelli, Guérente, Armand y Lenouvel (2013). Aggarwal y Dollimore (2000), observaron un aumento en el tamaño de los poros, cuando aumentó la concentración de la amiloglucosidasa, hasta un rompimiento, dando lugar a grandes agujeros irregulares y una estructura disrupta.

La diferencia de tamaño es importante en el área superficial, ya que esta área es parámetro por considerar durante la modificación del almidón, debido a que gránulos de almidón con tamaño pequeño (como el de maíz) tienen mayor superficie de contacto que los grandes (almidón de papa), esta diferencia podría tener influencia sobre la susceptibilidad de los almidones a la hidrólisis enzimática (Espinosa-Solis, 2012). En este mismo sentido, Jayakody y Hoover (2002) postularon que la presencia de poros o canales en la superficie de los gránulos, como en el almidón de maíz, facilita el trabajo de las enzimas hacia el interior del gránulo, que lo hace más susceptible a la hidrólisis.

6.3 Contenido de amilosa en almidones de maíz nativo e hidrolizados

El contenido de amilosa aumentó conforme aumentó el tiempo de hidrólisis enzimática, dando como resultados $22.2 \pm 0.3\%$, $27.4 \pm 0.2\%$ y $28.7 \pm 0.4\%$ de amilosa para almidones nativo e hidrolizados 16 y 20 h, respectivamente. Este aumento con diferencias estadísticamente significativas fue en gran medida por las fracciones hidrolizadas, glucosa y maltosa, que se formaron cuando las enzimas actuaron tanto en las cadenas lineales de amilosa como en los puntos de ramificación de la amilopectina.

Chung, Othman y Lee (2015) observaron un gran contenido de amilosa en almidón de arroz después de la hidrólisis enzimática con enzimas amilolíticas, ellos atribuyen el incremento de este polímero a la acción de la amiloglucosidasa debido a que la amilopectina del almidón de arroz fue preferentemente hidrolizada por dicha enzima.

El contenido de amilosa de los gránulos de almidón varía con la fuente botánica y es afectado por las condiciones climáticas y tipo de suelo durante el crecimiento. La actividad de las enzimas involucradas en la biosíntesis del almidón puede ser responsable de la variación en el contenido de amilosa entre diferentes almidones, así como los distintos procedimientos de aislamiento y los métodos analíticos usados para determinar el contenido de amilosa (Singh, Singh, Kaur, Singh y Singh, 2003).

Algunas investigaciones relacionan el parámetro del contenido de amilosa de materiales pared en la encapsulación con la eficiencia de retención de los compuestos químicos encapsulados, mencionan que el bajo contenido de amilosa mejora el tiempo de retención de los compuestos encapsulados (Palma-Rodríguez, Álvarez-Ramírez y Vargas-Torres, 2018; Palma-Rodríguez et al., 2013; Tari y Singal, 2002). En este estudio, el almidón de maíz hidrolizado enzimáticamente durante 16 h (AM16H) mostró valores de amilosa aparente de 27.38%, y cuando se usó como material pared presentó un aumento en la retención de AA y una mayor estabilidad durante el tiempo de almacenamiento que lo observado en AM20H. Sin embargo, sería necesario realizar más estudios en almidones modificados enzimáticamente para establecer una relación entre el contenido de amilosa y la eficiencia de retención.

6.4 Difracción de rayos X en almidones de maíz nativo e hidrolizados

La cristalinidad del gránulo del gránulo de almidón se puede estudiar con la técnica de difracción de rayos X. Los patrones de difracción de rayos X de los almidones nativos y modificados se muestran en la Figura 8. Los almidones nativos de maíz y los modificados mostraron un patrón de difracción tipo A, el cual es típico de los cereales, y se caracteriza por la presencia de picos de mayor intensidad de difracción para los ángulos $2\theta = 15, 17, 18$ y 23° (Whittam, Noel y Ring, 1990); a pesar de que presentaron el mismo patrón de difracción (típico de cereales), el porcentaje de cristalinidad presentó diferencias marcadas.

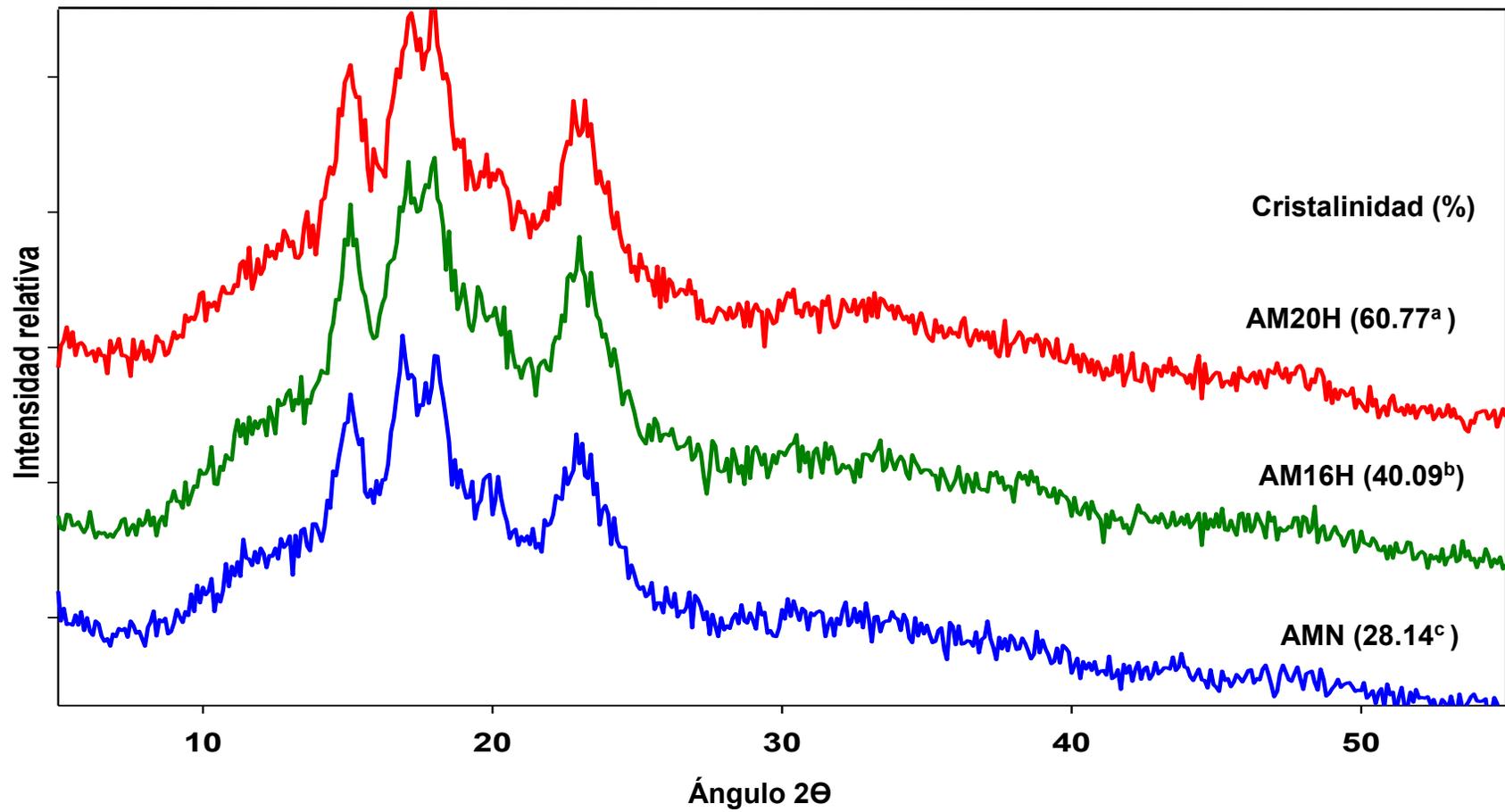


Figura 8 . Patrones de difracción de rayos X de los almidones nativos y modificados por hidrólisis enzimática. AMN=Almidón nativo de maíz, AM16H=Almidón de maíz hidrolizado enzimáticamente por 16 horas, AM20H=Almidón de maíz hidrolizado enzimáticamente por 20 horas. Superíndices diferentes por tratamiento representan diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$).

Se puede observar en el difractograma que el almidón que presentó mayor cristalinidad fue el hidrolizado enzimáticamente durante 20 h, seguido por el hidrolizado de 16 h y con menor porcentaje de cristalinidad el nativo con valores de 60.77%, 40.09% y 28.14% respectivamente; este valor aumenta principalmente por la acción de las enzimas que actúan principalmente en la parte amorfa del almidón (amilosa), dejando mayor porcentaje de amilopectina, polímero de la característica de cristalinidad debido a las dobles hélices que presenta en su estructura. Esta observación está en consonancia con la propuesta de Gallant, Derrien, Aumaitre y Guilbot (1973), proponen que la amilólisis se produce principalmente en las regiones amorfas de los gránulos de almidón.

Por otro lado, la organización interna del gránulo de almidón es un factor importante en la cristalinidad, donde el contenido de amilosa tiene una función primordial. Otros autores han postulado que el rompimiento de las cadenas del almidón en las zonas amorfas permite una hidrólisis extensiva, produciendo una estructura más cristalina (Kainuma y French, 1971).

6.5 Tamaño de partícula de almidones de maíz nativo e hidrolizados

La Figura 9a presenta la distribución de tamaño de gránulo de los almidones nativos y modificados por hidrólisis enzimática. El tamaño de partícula del almidón de maíz nativo e hidrolizados los tiempos 16 y 20 h fue de 15.83 μm , 14.97 μm y 14.72 μm respectivamente. El tamaño de partícula mostró una ligera reducción con el aumento del tiempo de hidrólisis, posiblemente debido a la erosión enzimática superficial; esto también causó un aumento en los agujeros y canales en el almidón de maíz. Patrón similar se informó por Kong, Kim, Kim y Kim (2003) en un estudio sobre la relación entre los gránulos superficie vs velocidad de hidrólisis. En las micrografías de la Figura 6A frente a 6 B y C, se observó una ligera reducción entre el almidón de maíz nativo y los hidrolizados.

Aunado a esto, se puede observar (Figura 9) un pico secundario en los almidones modificados enzimáticamente por 16 horas (9B) y 20 horas (9C), los cuales aparecen probablemente a la agregación de gránulos derivados por el efecto de la erosión y exo-corrosión, en la superficie del gránulo, así como a la presencia de proteínas y lípidos que interaccionan fácilmente entre ellos. Tecante y Doublier (1999) informaron que el almidón de maíz modificado exhibía distribución de tamaño bimodal, pero en este caso, el pico secundario correspondía a tamaños de gránulos pequeños ($\sim 2-3 \mu\text{m}$), mientras que los tamaños de pico principal correspondían a $\sim 20 \mu\text{m}$; se sugirió que el pico secundario se debió a algunos fragmentos de gránulos rotos formados durante la modificación.

La distribución del tamaño de los gránulos de los almidones de maíz modificados es importante durante su uso como material pared en la encapsulación debido a que pueden producirse agregados de diferentes tamaños, reteniendo diferentes niveles de compuestos encapsulados.

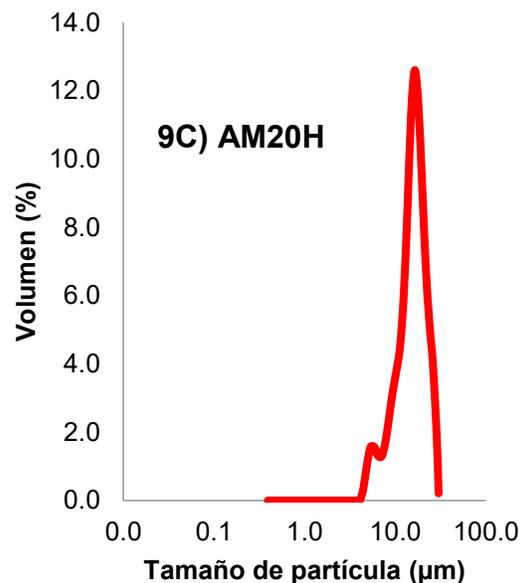
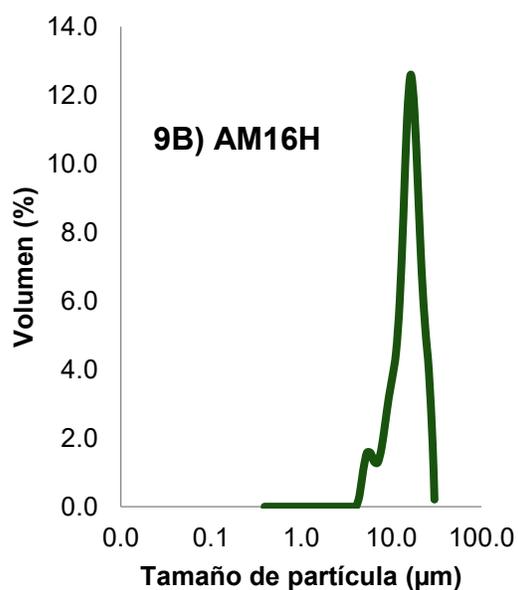
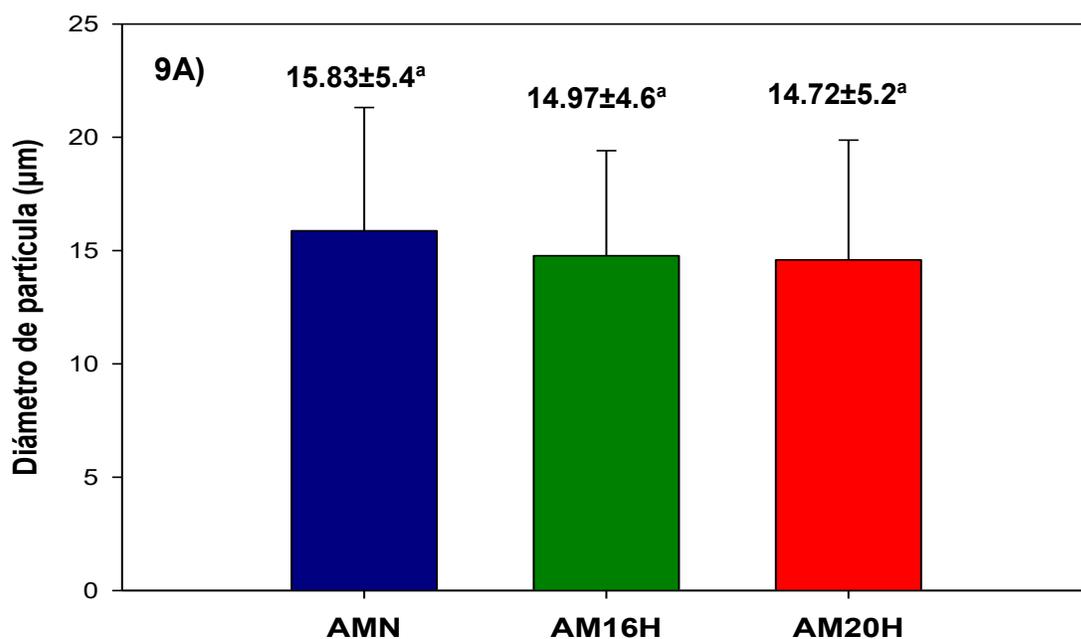


Figura 9. Distribución de tamaño de partícula en las diferentes muestras de almidón (Almidón nativo e hidrolizados) (9A). Gráfico de distribución de tamaño de partícula en AM16H=Almidón de maíz hidrolizado enzimáticamente por 16 horas (9B) y de distribución de tamaño de partícula en AM20H=Almidón de maíz hidrolizado enzimáticamente por 20 horas (9C).

6.6 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

En cuanto a Calorimetría Diferencial de Barrido, las propiedades térmicas de los almidones modificados presentaron menores valores de ΔH y un aumento en la temperatura de gelatinización presentando diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre los almidones hidrolizados y el nativo (Cuadro 4). Los valores ΔH fueron de 10.5, 7.0 y 9.0 J/g y las temperaturas de gelatinización de 72.1, 73.3 y 73.2 °C para almidones nativo e hidrolizados a 16 h y 20 h respectivamente.

Se pueden observar las temperaturas de inicio, pico y final más altas en las muestras de almidón hidrolizado enzimáticamente, en comparación con los nativos. La gelatinización de almidón es una transición endotérmica que corresponde a la disociación de dobles hélices de amilopectina desde una estructura semicristalina a una conformación amorfa. Las propiedades térmicas se ven afectadas en gran medida por la estructura final de la amilopectina y el contenido de amilosa de los almidones (Srichuwong y Jane, 2007). En general, los almidones que consisten en amilopectina con cadenas de ramificación más largas muestran temperaturas de gelatinización más altas, debido a una mayor conformación cristalina, presentando dobles hélices estables. Lo anterior se puede corroborar con los valores más altos de cristalinidad que presentaron los gránulos de almidón hidrolizados enzimáticamente en comparación con su parte nativa (Figura 9). Por otro lado, Park et al., (1971) informaron que el inchazón de los gránulos de almidón más grandes se produce a una temperatura más baja que la hinchazón de los gránulos de almidón más pequeños; por lo tanto, es posible que, para los almidones tratados enzimáticamente, haya un aumento en el número relativo de gránulos más pequeños después de la hidrólisis, lo que provoca un aumento en la temperatura de gelatinización inicial. Este resultado se puede correlacionar con el tamaño de partícula en los gránulos (Figura 9), donde se puede observar que los granulos modificados presentan un menor tamaño de partícula.

También en este estudio se puede observar que la entalpía de gelatinización disminuyó para los almidones hidrolizados. Los bajos valores de ΔH indican que los almidones porosos requieren menos energía para promover la gelatinización del

almidón, es decir, la energía necesaria para desenrollar las dobles hélices inestables durante la gelatinización (Sandhu & Singh, 2007). Los valores de cambio de entalpía reflejan principalmente la pérdida del orden de doble hélice en lugar de la pérdida de registro cristalino (Cooke y Gidley, 1992).

Cuadro 4. Parámetros de análisis de perfil térmico, mediciones realizadas a los tratamientos de almidón, mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)¹.

| Almidón | To (°C) | Tp (°C) | Tc (°C) | ΔH (J/g) | Tc-To |
|---------|------------|-------------------------|------------|------------------------|-----------|
| AMN | 68.52±0.51 | 72.43±0.36 ^a | 77.29±0.43 | 10.30±0.4 ^a | 8.77±0.47 |
| AM16H | 69.42±0.25 | 73.08±0.16 ^b | 78.36±0.33 | 7.83±0.44 ^b | 9.10±0.47 |
| AM20H | 69.31±0.23 | 73.15±0.25 ^b | 77.7±0.12 | 8.63±0.48 ^b | 8.43±0.34 |

¹Los datos son las medias de tres repeticiones ± desviación estándar, superíndices diferentes por fila representan diferencias estadísticas significativas (P<0.05). To=Temperatura inicial, Tp=Temperatura pico, Tc=Temperatura de conclusión, ΔH=Cambio de entalpía, Tc-To=Índice Tc-To. AMN=Almidón de maíz nativo, AM16H=Almidón de maíz hidrolizado enzimáticamente por 16 horas, AM20H=Almidón de maíz hidrolizado enzimáticamente por 20 horas.

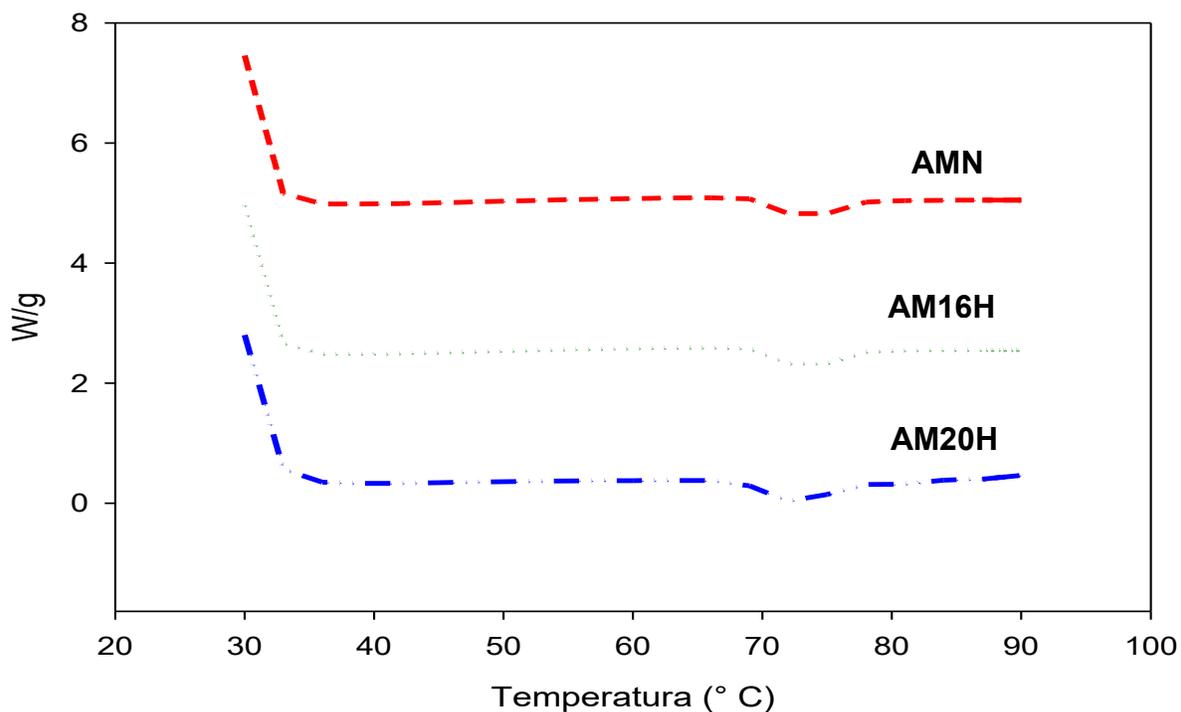


Figura 10. Termograma de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

6.7 Análisis Rápido de Viscosidad (RVA)

Mediante el Análisis Rápido de Viscosidad (RVA), se observó una disminución en los valores de viscosidad (es decir, viscosidad pico, viscosidad mínima y viscosidad final) en los almidones modificados en comparación con la contraparte nativa. Los valores de viscosidad pico para los almidones modificados fueron de 2744.2 ± 14.31 y 3106.2 ± 77.46 cP en los tratamientos de 16 y 20 h respectivamente, en comparación con el nativo que fue de 3742 ± 28.63 cP (Cuadro 5). En comparación, la viscosidad pico en las muestras de 16 y 20 horas de hidrólisis disminuyó macadamamente hasta 998 y 636 cP respectivamente. La viscosidad pico se asocia principalmente con los contenidos de amilosa, la distribución de la longitud de la cadena ramificada de la amilopectina y los componentes menores (Jane, 2006).

La α -amilasa afectó preferentemente los anillos de crecimiento amorfo (Benavent y col., 2017). Existe una desintegración de gránulos susceptibles debido a su estructura porosa, lo que da como resultado suspensiones menos viscosas (Uthumporn y col., 2010). La amilosa inhibe la hinchazón de los gránulos de almidón, mientras que la amilopectina contribuye al hinchamiento de los gránulos de almidón, especialmente las cadenas de ramas más largas (Tester y Morrison, 1990). La marcada disminución de la viscosidad máxima en los almidones modificados puede atribuirse a la pérdida de cierta cantidad de cadenas de ramificación durante el proceso de hidrólisis, dando como resultado una menor hinchazón de los gránulos de almidón durante la etapa de calentamiento. Debe observarse que la viscosidad máxima del almidón hidrolizado enzimáticamente por 16 horas (Cuadro 5) fue 600 cP y 1000 cP menor que el almidón hidrolizado enzimáticamente por 20 horas y el almidón nativo, respectivamente.

Cuadro 5. Parámetros de análisis de perfil de viscosidad, mediciones realizadas a los tratamientos de almidón, mediante uso del Analizador Rápido de Viscosidad (RVA)¹.

| Almidón | Viscosidad (cP) | | | T pasta (°c) |
|---------|----------------------|---------|---------|--------------|
| | Pico | Baja | Final | |
| AMN | 3742±29 ^a | 1750±40 | 4265±36 | 77.38 |
| AM16H | 2744±14 ^b | 1213±80 | 2321±69 | 77.87 |
| AM20H | 3106±77 ^c | 833±35 | 1670±12 | 78.10 |

¹Los datos son las medias de tres repeticiones ± desviación estándar, superíndices diferentes por fila representan diferencias estadísticas significativas (P<0.05).

AMN=Almidón de maíz nativo, AM16H=Almidón de maíz hidrolizado enzimáticamente por 16 horas, AM20H=Almidón de maíz hidrolizado enzimáticamente por 20 horas.

6.8 Formación de microcápsulas y tamaño de partícula

Para la formación de las microcápsulas con cada almidón hidrolizado enzimáticamente (16 y 20 horas, ver sección 6.2), se decidió utilizar goma arábica (17.6% p/p con respecto al peso del almidón) para ayudar a encapsular el ácido ascórbico.

En cuanto a las microcápsulas, se puede observar que con la goma arábica la mayoría de los poros son tapados en la superficie, con una aglomeración de gránulos (Figura 10). Los gránulos de almidón presentan una estructura no definida, aunque con la misma tendencia en cuanto a la distribución de las partículas. Las microcápsulas formadas con almidón de maíz modificado enzimáticamente durante 16 h y 20 h mostraron un tamaño de partícula de 1087.44 µm y 1245.43 µm, respectivamente. Este aumento en los valores de tamaño de partícula se debe a la aglomeración de los gránulos que se produce al mezclar GA con el almidón de maíz hidrolizado con enzimas. El aumento en el tamaño es muy marcado, sin embargo, todavía pueden ser consideradas como microcápsulas, clasificándolas en nano-cápsulas (diámetro medio < 0.2 µm), microcápsulas (0.2 > diámetro medio < 5000

μm) y microcápsulas (diámetro medio $> 5000 \mu\text{m}$), (Ré, 1998; Cheng et al., 2009). Las microcápsulas de malanga (MA) y goma arábica (GA) mostraron un tamaño de partícula de $7.51 \mu\text{m}$ y $12.72 \mu\text{m}$, respectivamente.

6.9 Caracterización microscópica de las microcápsulas

La Figura 11 muestra las microcápsulas EAM16H-GA y EAM20H-GA recubiertas con goma arábica (Figura 11, AB y EF) a 1000X y 3500X, respectivamente. También se muestran las microcápsulas MA y GA, (Figura 11, CD y GH) a 1000X y 3500X. La micrografía de las microcápsulas EAM20H-GA (Figura 11B) mostraron un ligero aumento en el tamaño de aglomeración, que el observado en las microcápsulas EAM16H-GA (Figura 11A), este aumento en el tamaño también se observó en la Cuadro 6. En la micrografía 11 E y F, son notorios los agujeros en las microcápsulas, pero no con la misma intensidad que se observa en las Figuras 6-E y 6-F (Ver sección 6.2), este fenómeno podría explicarse porque las microcápsulas estaban recubiertas con goma arábica. Además, las micrografías también explican por qué las microcápsulas EAM16H-GA fueron más estables ante la pérdida de ácido ascórbico durante el tiempo de almacenamiento en condiciones de envejecimiento acelerado y condiciones en el tracto gastrointestinal (ver sección 6.13), ya que podría estar interaccionando mejor el ácido ascórbico con el material pared. Hoyos- Leyva, Chavez-Salazar, Castellanos-Galeano, Bello-Perez y Álvarez-Ramírez (2018) estudiaron las microcápsulas hechas con almidón de taro (gránulos pequeños), y concluyeron que el AA puede extraerse fácilmente a través de los poros de los agregados esféricos observados mediante microscopía electrónica de barrido. Estructuras similares se observaron en este estudio (Figura 6G).

6.10 Actividad de agua y contenido de humedad de las microcápsulas

El rango de actividad de agua (a_w) y contenido de humedad fueron 0.16 - 0.31 y 1.34 - 2.35%, respectivamente. En el Cuadro 6 se puede observar que las microcápsulas de AM20H y MA presentaron valores más altos de a_w (0,31 y 0,28, respectivamente), y como se esperaba, también mostraron valores de humedad más altos. Los almidones con un tamaño de gránulo pequeño, como la malanga,

producen agregados esféricos los cuales pueden ligar agua, contribuyendo al incremento de humedad (Zhao y Whistler, 1994). En un estudio donde se formaron agregados esféricos con almidón de taro encapsulando ácido ascórbico (Hoyos-Leyva et al., 2018), reportaron valores de humedad de 5.9% y 0.35 de a_w , que fueron más altos que los reportados en este estudio.

Por otra parte, las microcápsulas AM16H-GA y las GA presentaron los menores valores de actividad de agua (a_w) por debajo de 0.24, de contenido de humedad abajo de 1.6% que de acuerdo con Tonon, Brabet, Pallet, Brat y Hubinger (2009), favorece la estabilidad del polvo, ya que representa menos agua libre disponible para el crecimiento de microorganismos patógenos o para que se lleven a cabo reacciones químicas, lo cual incrementa la vida de anaquel de las microcápsulas. Estos resultados concuerdan con los contenidos de humedad y, de la misma manera, las diferencias en los valores de a_w también puede estar relacionado con la estructura de los diferentes materiales pared utilizados para la formación de las microcápsulas. Arslan et al., (2015), mencionan que valores bajos de a_w en las microcápsulas pueden ayudar a aumentar la estabilidad microbiológica y oxidativa en condiciones de almacenamiento prolongado. Además, valores de a_w por debajo de 0.6 como se observa en este estudio podría retrasar los cambios químicos y físicos en el producto (Szulc y Lenart, 2012).

La variación en el contenido de humedad en las microcápsulas a base de almidón (AM16H y AM20H) puede ser atribuida a la estructura del material pared, el cual tiene un alto número de grupos hidroxilo y el número de poros en cada encapsulado, que le permiten formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua del ambiente durante el manejo de las microcápsulas después del secado por aspersión (Tonon et al., 2009). Resultados similares fueron obtenidos por Quek, Chok y Swedlund (2007), al encapsular mediante secado por aspersión jugo de sandía con diferentes concentraciones de maltodextrina (1.49 – 1.62 %). Lokswan (2007), en su estudio sobre microencapsulación de β -caroteno con almidón nativo y modificado de tapioca, reportó contenidos de humedad de 6 y 3.12 %, respectivamente, valores superiores a los obtenidos en este estudio.

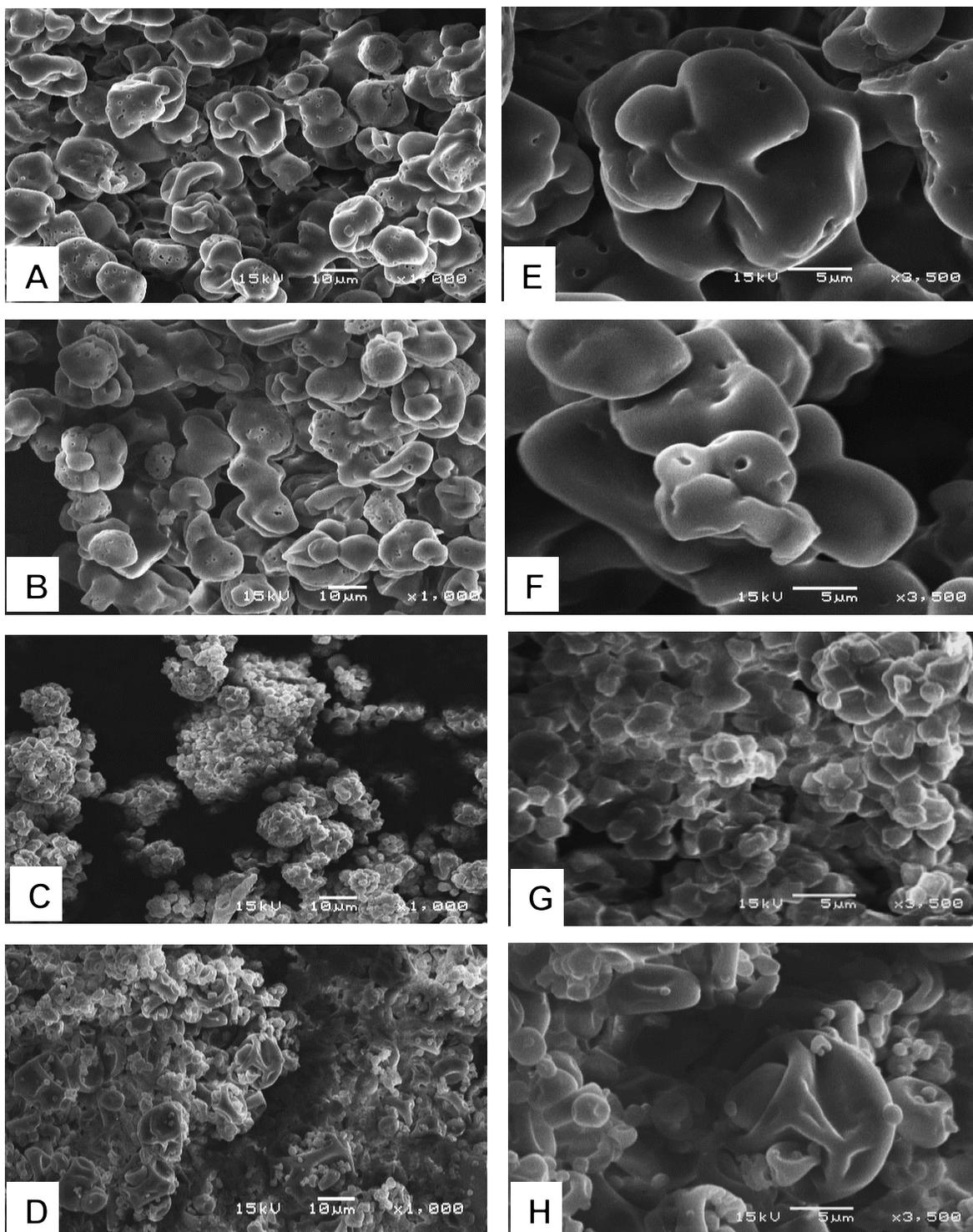


Figura 11. Micrografías por microscopía electrónica de barrido de microencapsulados de: almidón hidrolizado enzimáticamente 16 horas + goma arábica (6:1 p/p) x1000 (A) y x3500 (E), almidón hidrolizado enzimáticamente 20 horas + goma arábica (6:1 p/p) x1000 (B) y x3500 (F), malanga x1000 (C) y x3500 (G) y goma arábica x1000 (D) y x3500 (H).

6.11 Eficiencia de encapsulación

Los valores de retención de ácido ascórbico se muestran en la Cuadro 7. De acuerdo con Jafari, Asadpoor, He y Bhandari (2008), una encapsulación eficiente debe dar lugar a microcápsulas con un contenido superficial mínimo y una retención máxima del ingrediente activo. Las microcápsulas obtenidas presentaron diferente contenido de vitamina C, lo cual está asociado al tipo biopolímero utilizado como material pared.

En este estudio se puede observar que las microcápsulas elaboradas con almidón de maíz modificado enzimáticamente (EAM16H-GA y EAM20H-GA), mostraron valores más bajos en la retención de AA%, que las microcápsulas preparadas con MA (gránulo pequeño) y GA. Sin embargo, las microcápsulas EAM16H-GA y EAM20H-GA también presentaron menores valores de ácido ascórbico en la superficie (27.4% y 26.5% respectivamente) que, en malanga y goma arábica, este comportamiento podría explicar la estabilidad de la microcápsula (Figura 12). Por otro lado, las microcápsulas EAM16H-GA y MA mostraron valores de retención de 71.3 y 97.1%, respectivamente. Sus valores fueron ligeramente más altos EAM20H-GA (70.9%) y GA (94.2%). Este comportamiento podría deberse a que las microcápsulas mostraron un tamaño más pequeño. Un comportamiento similar fue informado por Palma-Rodriguez et al. (2013), usando almidón de arroz nativo como material pared en la formación de microcápsulas (7.2 μm) y almidones modificados de maíz (5.77 μm) y patata (5.66 μm), informando un aumento en los valores de retención de AA de 57.7%, 64.4% y 98%, cuando la microcápsula disminuye de tamaño. Este aumento en la retención con una reducción en el tamaño del material pared puede deberse a un aumento en el área superficial, mejorando la interacción química.

Cuadro 6. Parámetros de análisis fisicoquímicos en las microcápsulas obtenidas¹.

| Material Pared-Microcápsula | a_w | Humedad (%) | D (v, 0.5)^{a, x} |
|------------------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| AM16H-GA (85:15) | 0.231±0.012 ^c | 1.602±0.18 ^b | 1087.44 |
| AM20H-GA (85:15) | 0.31±0.002 ^a | 1.755±0.021 ^b | 1245.43 |
| Malanga | 0.28±0.009 ^b | 2.354±0.34 ^a | 7.51 |
| Goma Arábica | 0.16±0.017 ^d | 1.348±0.114 ^c | 12.72 |

AM16H=Almidón de maíz hidrolizado enzimáticamente por 16 horas, AM20H=Almidón de maíz hidrolizado enzimáticamente por 20 horas.

Superíndices diferentes por tratamiento representan diferencias estadísticas significativas (P<0.05).

^a μm .

^x No se realizaron réplicas en este estudio, por lo tanto, no se llevaron a cabo estudios estadísticos

Cuadro 7. Parámetros de eficiencia de encapsulación en las microcápsulas obtenidas¹.

| Material Pared-Microcápsula | Retención de ácido ascórbico (%) | Ácido ascórbico superficial (%) |
|------------------------------------|---|--|
| AM16H-GA (85:15) | 71.28±0.42 ^c | 27.43±0.18 ^c |
| AM20H-GA (85:15) | 70.92±0.52 ^c | 26.52±0.12 ^c |
| Malanga | 97.10±0.59 ^a | 36.27±0.14 ^a |
| Goma Arábica | 94.22±0.37 ^b | 31.96±0.14 ^b |

AM16H=Almidón de maíz hidrolizado enzimáticamente por 16 horas, AM20H=Almidón de maíz hidrolizado enzimáticamente por 20 horas. Superíndices diferentes por columna representan diferencias estadísticas significativas (P<0.05).

En el estudio de ácido ascórbico en superficie (Cuadro 7), los encapsulados EAM16H-GA y EAM20H-GA presentaron valores bajos. Mientras que las microcápsulas hechas con MA y GA, mostraron los valores más altos. Este comportamiento puede atribuirse al hecho de que las microcápsulas hechas con almidón modificado enzimáticamente presenta en su estructura poros (Figura 11 A, B, C, y D) en los que puede atraparse el AA, lo que también podría estar influyendo en la retención de AA en las microcápsulas preparadas con almidón de maíz modificado.

Así mismo, los resultados obtenidos fueron menores a los reportados por Trindade y Grosso (2000), quienes reportaron la recuperación del 99.7 % de ácido ascórbico después de la microencapsulación mediante secado por aspersión con almidón de arroz. Resultados similares fueron reportados por Finotelli y Rocha-Leao (2005), quienes obtuvieron el 100 % de retención de ácido ascórbico mediante secado por aspersión empleando Capsul (almidón modificado de maíz tipo waxy) y maltodextrina.

6.12 Estudio de envejecimiento acelerado

El efecto del tiempo de almacenamiento sobre la capacidad de las microcápsulas para proteger el AA se muestra en la Figura 12. El tiempo juega un papel importante en la estabilidad de AA; ya que se observa una reducción gradual en los valores de AA cuando aumenta el tiempo de almacenamiento. Se determinó el contenido de AA en la semana cero y las microcápsulas MA y GA mostraron mayor contenido de AA que las microcápsulas formadas con almidón de maíz modificado enzimáticamente (EAM16H-GA y EAM20H-GA). Es importante mencionar que las concentraciones teóricas de ácido ascórbico en las microcápsulas fueron de 165 mg/g, observando que no se encapsuló el 100% de AA.

Valores similares de retención de ácido L-ascórbico (99%) en microcápsulas hechas con almidón de taro fueron reportados por Hoyos-Leyva et al., (2018). Por otro lado, se observó que en la semana 1 las microcápsulas MA y GA perdieron aproximadamente 40% de ácido ascórbico inicial. Un comportamiento similar fue descrito por los autores anteriores, que han reportado una pérdida de aproximadamente 80% en microcápsulas de malanga, y atribuyen esta rápida pérdida de AA a la estructura porosa de los agregados esféricos de almidón de taro, que permiten un flujo fácil de disolvente a través de microcápsulas, lo que resulta en una rápida extracción de AA. Fenómeno similar podría ocurrir en este estudio. Sin embargo, se puede observar que las microcápsulas EAM16H-GA y EAM20H-GA solo pierden aproximadamente 30% de AA, lo que indica un mejor efecto protector. Este comportamiento puede deberse a los agujeros en el almidón de maíz modificado enzimáticamente y recubierto con GA ofrecen un mejor efecto protector al ácido ascórbico contra las condiciones ambientales. Luo, et al. (2013), informaron que el aumento en el grado de hidrólisis enzimática del almidón de yuca modificado mejora la retención de zinc, atribuyen que el ataque enzimático causa que la superficie de los gránulos de almidón sea áspera y aumenta el área de la superficie, lo que provoca mayores interacciones químicas entre los grupos funcionales. Posiblemente esto podría ocurrir entre los grupos funcionales (-OH) del ácido ascórbico y el almidón. Además, las microcápsulas EAM16H-GA y EAM20H-GA fueron recubiertas con GA, lo que podría mejorar el efecto de protección. Aunado a esto, el tamaño de las microcápsulas EAM16H-GA y EAM20H-GA es mayor (ver sección 6.8) y siguiendo la primera Ley de Fick (1855), establece que el soluto se moverá desde una región de alta concentración a una de baja concentración atravesando un gradiente. Por lo tanto, se requiere mayor desplazamiento del ácido ascórbico para que el ácido ascórbico salga de la microcápsula, en otras palabras, existe una mayor resistencia.

Durante las semanas 2 a 8 de almacenamiento, las microcápsulas EAM16H-GA mostraron mayor contenido de AA respecto de las otras microcápsulas (Figura 12). Una vez observado este comportamiento, se esperaría que fuera presentado por el EAM20H-GA, debido al mayor número de agujeros observados (Figura 6, F), por lo que se podrían enfocar más estudios al respecto.

La determinación de AA en la semana 9 solo se cuantificó en las microcápsulas EAM16H-GA, en las demás microcápsulas no fue posible cuantificar este compuesto bioactivo porque no estaba presente. Este comportamiento indica que las microcápsulas EAM16H-GA presenta un mejor efecto protector durante el tiempo de almacenamiento que las microcápsulas MA (gránulo pequeño), GA y EAM20H-GA. Li, Ho, Turner y Dhital (2016) informaron de la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* en almidón de maíz poroso, esta fue mayor en el almidón modificado enzimáticamente en comparación con la parte nativa. En este mismo estudio se informa un ligero aumento en la viabilidad de *L. plantarum* en las microcápsulas hechas con 30 minutos de hidrólisis enzimática que las microcápsulas preparadas con 120 minutos. Comportamiento similar se encontró en este estudio, observando una mejor protección de AA en las microcápsulas hechas con almidón de maíz tratado con enzimas con 16 horas (Figura 12). La estabilidad de la microcápsula GA como se observa en la Figura 11, se debe a que el AA está atrapado dentro de la microcápsula, que no muestra los poros como se observa en la Figura 6H, formas similares en microcápsulas y el comportamiento en la retención de AA es informado por Trindade y Grosso (2000).

Con los valores obtenidos durante todo el estudio de envejecimiento acelerado (9 semanas) se pudo calcular el valor de la constante de degradación del ácido ascórbico (k , semanas^{-1}) para cada microencapsulado, mediante un modelo matemático de primer orden. En donde se observa que el orden de los valores de degradación es: EAM16H-GA > Goma arábica > Malanga > EAM20H-GA, con valores de 0.308, 0.358, 0.521 y 0.551 para cada microcápsula, respectivamente.

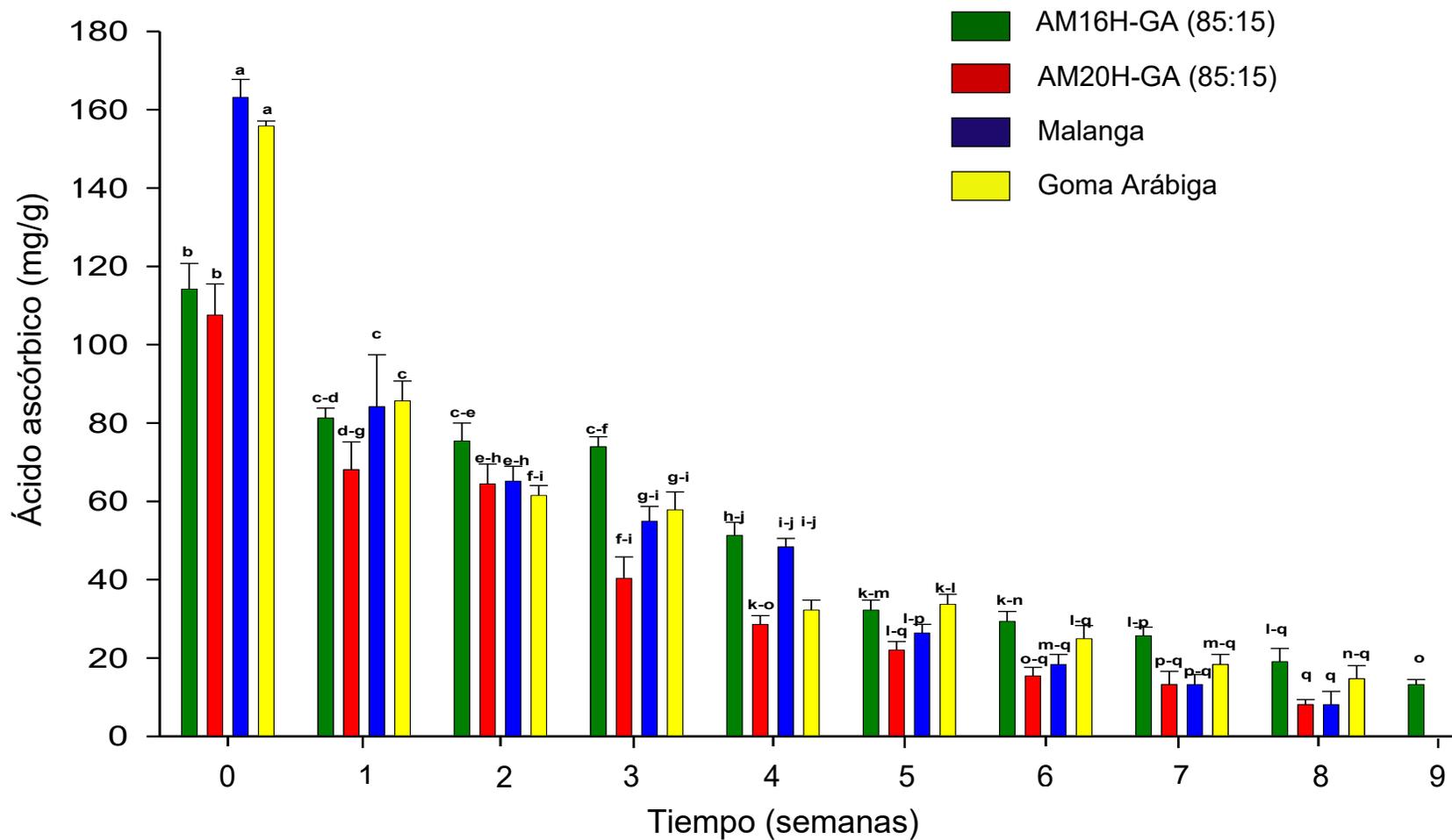


Figura 12. Envejecimiento acelerado de microencapsulados de ácido ascórbico (H.R. 52.5% y temperatura 55°C). Los datos son las medias de tres repeticiones \pm desviación estándar, superíndices diferentes por fila representan diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$).

6.13 Modelo de digestión *in vitro* de microencapsulados

Los resultados del porcentaje de liberación de ácido ascórbico en el modelo de digestión *in vitro* que simulaba la boca, el estómago y el intestino delgado se obtuvieron con el apoyo de HPLC (Figuras 13, 14 y 15) y se muestran en la Cuadro 8. En este estudio, el efecto de los días de almacenamiento contra el material pared en las microcápsulas sobre el porcentaje de liberación del AA en el modelo de digestión *in vitro* se analizó por medio de un análisis estadístico de dos vías. Este tipo de análisis estadístico muestra que el factor tiempo tiene más influencia en el % de liberación de AA, que el tipo de material pared utilizado para preparar las microcápsulas. En general, se observó una reducción en el porcentaje de liberación de AA en las microcápsulas cuando aumentó el tiempo de almacenamiento. Es importante saber cómo se libera el ácido ascórbico en cada material utilizado como material pared durante el proceso de digestión a lo largo del tracto gastrointestinal (TGI). Yung, et al., (1982) mencionan que el proceso de adsorción de ácido ascórbico tiene lugar en la región superior del intestino delgado.

El comportamiento de liberación de AA en cada sección de GIT fue interesante, en la primera fase de liberación (saliva) las microcápsulas MA y GA mostraron un ligero aumento en la liberación de AA, que el observado en las microcápsulas EAM16H-GA y EAM20H-GA durante el tiempo de almacenamiento. Por otro lado, en el jugo gástrico en el día 0, las microcápsulas EAM16H-GA y EAM20H-GA mostraron el mayor porcentaje de liberación de AA, pero en el almacenamiento de 7 días, la liberación de AA fue menor que las microcápsulas MA y GA. Siguiendo la misma tendencia en esta misma sección de GIT, en el tiempo de almacenamiento de 14, 21 y 28 días, el comportamiento de liberación de AA. En la fase duodenal biliar, las microcápsulas EAM20H-GA mostraron el mayor porcentaje de liberación de ácido ascórbico,

presentando diferencias significativas con las demás en el día 0. Estos resultados podrían indicar que la encapsulación con almidón de maíz modificado enzimáticamente por 20 horas y recubierto con GA presenta una liberación lenta de AA en el intestino, donde se libera el porcentaje más alto de AA (véase el Cuadro 8). También se observa que una cantidad significativa de AA se libera en la saliva, pero en esta sección del TGI, se podría estar cuantificando el AA en la superficie de las microcápsulas. Otro factor importante en la liberación de AA por las microcápsulas en el TGI se debe a los cambios en el pH y el uso de enzimas digestivas (Cuadro 3), que actúan sobre el material pared de las microcápsulas.

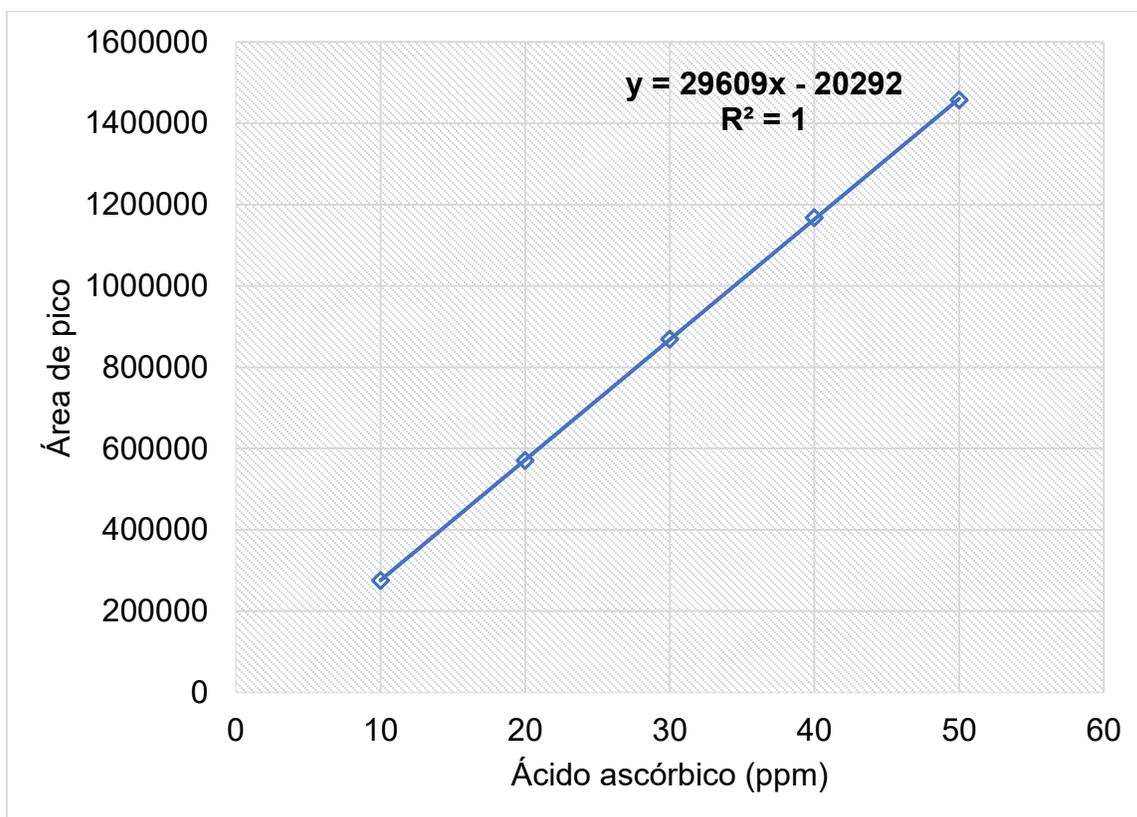


Figura 13. Curva de calibración de ácido ascórbico en determinación por HPLC-UV.

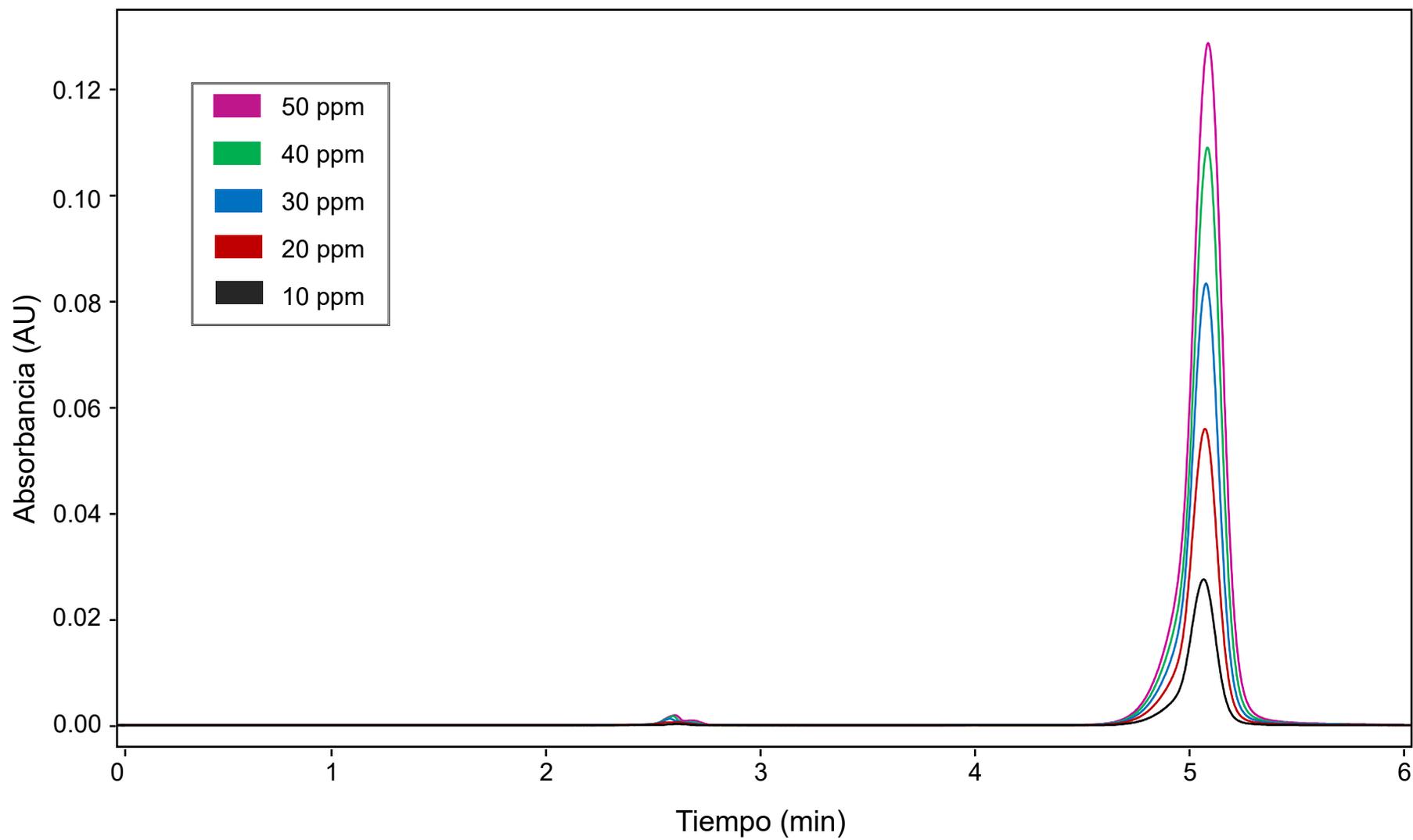


Figura 14. Cromatogramas HPLC-UV correspondientes a la curva de calibración de ácido ascórbico.

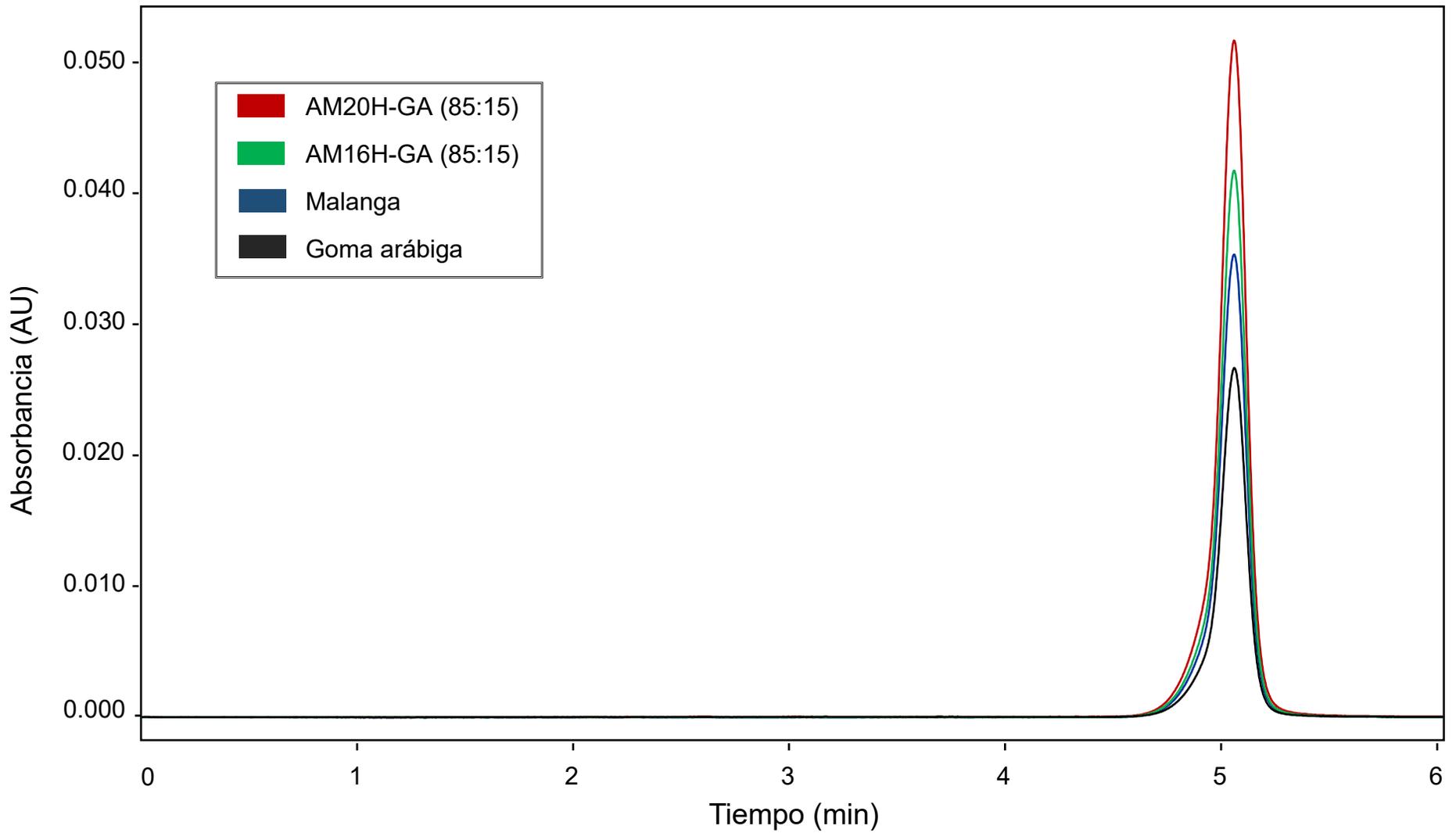


Figura 15. Cromatogramas HPLC-UV correspondientes a la digestión en la fase salival en el día uno de los microencapsulados con ácido ascórbico.

Cuadro 8. Efecto del material pared sobre el porcentaje de liberación de AA en cada fase de la digestión *in vitro*.

| Jugo digestivo | Material pared microcápsulas | Días de almacenamiento | | | | |
|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | 0 | 7 | 14 | 21 | 28 |
| <i>Saliva</i> | EAM16H-GA (85:15) | 35.53 ± 0.25 ^{a,3} | 30.45 ± 0.09 ^{b,3} | 30.05 ± 0.37 ^{b,1} | 24.71 ± 0.17 ^{c,2} | 23.6 ± 0.24 ^{d,3} |
| | EAM20H-GA (85:15) | 36.93 ± 0.24 ^{a,1} | 27.57 ± 0.3 ^{b,4} | 25.01 ± 0.17 ^{c,2} | 21.77 ± 0.33 ^{d,2} | 21.7 ± 0.11 ^{d,2} |
| | Malanga | 36.11 ± 0.21 ^{b,2} | 37.99 ± 0.09 ^{a,1} | 35.41 ± 0.23 ^{c,1} | 30 ± 0.11 ^{d,1} | 29.83 ± 0.27 ^{d,1} |
| | Goma Arábica | 34.79 ± 0.20 ^{b,4} | 36.13 ± 0.39 ^{a,2} | 35.8 ± 0.43 ^{a,2} | 31.8 ± 0.5 ^{c,2} | 23.6 ± 0.24 ^{d,4} |
| <i>Jugo gástrico</i> | EAM16H-GA (85:15) | 39.47 ± 0.28 ^{a,1} | 27.71 ± 0.18 ^{c,3} | 27.93 ± 0.07 ^{c,3} | 23.92 ± 0.27 ^{d,3} | 28.64 ± 0.12 ^{b,1} |
| | EAM20H-GA (85:15) | 36.94 ± 0.30 ^{a,2} | 25.65 ± 0.13 ^{b,4} | 26.0 ± 0.33 ^{b,4} | 21.36 ± 0.18 ^{c,4} | 19.85 ± 0.04 ^{d,3} |
| | Malanga | 36.26 ± 0.34 ^{a,3} | 32.63 ± 0.33 ^{c,2} | 33.47 ± 0.35 ^{b,2} | 29.34 ± 0.36 ^{d,2} | 27.08 ± 0.34 ^{e,2} |
| | Goma Arábica | 36.48 ± 0.49 ^{a,2-3} | 33.82 ± 0.30 ^{d,1} | 34.7 ± 0.22 ^{c,1} | 35.25 ± 0.18 ^{b,1} | 28.64 ± 0.12 ^{e,1} |
| <i>Jugo duodenal-biliar</i> | EAM16H-GA (85:15) | 24.99 ± 0.29 ^{a,4} | 24.57 ± 0.25 ^{a,3} | 20.74 ± 0.17 ^{d,2} | 23.64 ± 0.23 ^{b,3} | 22.34 ± 0.13 ^{c,3} |
| | EAM20H-GA (85:15) | 37.18 ± 0.26 ^{a,1} | 32.42 ± 0.20 ^{b,1} | 25.95 ± 0.29 ^{d,1} | 28.55 ± 0.16 ^{c,1} | 28.62 ± 0.24 ^{c,2} |
| | Malanga | 26.13 ± 0.18 ^{a,3} | 22.78 ± 0.14 ^{b,4} | 18.24 ± 0.21 ^{d,3} | 20.06 ± 0.12 ^{c,4} | 20.11 ± 0.17 ^{c,4} |
| | Goma Arábica | 28.73 ± 0.42 ^{c,2} | 31.15 ± 0.26 ^{a,2} | 26.49 ± 0.48 ^{d,1} | 26.79 ± 0.21 ^{d,2} | 29.75 ± 0.07 ^{b,1} |

Los datos son las medias de tres repeticiones ± desviación estándar del porcentaje, superíndices con letras diferentes por fila (tiempo de almacenamiento) representan diferencias estadísticas significativas (P<0.05).

Los datos son las medias de tres repeticiones ± desviación estándar, superíndices con números diferentes por columna (encapsulado) representan diferencias estadísticas significativas (P<0.05).

AM16H-GA=Almidón de maíz hidrolizado enzimáticamente por 16 horas en mezcla con goma arábica, AM20H-GA=Almidón de maíz hidrolizado enzimáticamente por 20 horas en mezcla con goma arábica.

VII. CONCLUSIONES

1. El tiempo de hidrólisis enzimática juega un papel importante en el porcentaje de hidrólisis del almidón, ya que está relacionado con la erosión y el número de poros.
2. El uso de diferentes materiales pared en la preparación de microcápsulas mediante el método de secado por aspersion tiene efectos significativos sobre el contenido de humedad, tamaño de partícula, actividad de agua, morfología, eficiencia y retención de los compuestos químicos de las microcápsulas obtenidas.
3. Este estudio mostró que las microcápsulas formadas por almidón de maíz modificado enzimáticamente mejoran la estabilidad durante el tiempo de almacenamiento y en la digestión *in vitro*.
4. Este comportamiento puede explicarse porque en las microcápsulas hechas con almidón modificado enzimáticamente-GA, el AA queda atrapado en los agujeros, lo que proporciona una mejor protección, donde la goma arábica juega un papel importante cuando se utiliza como cubierta.
5. El estudio sugiere al almidón modificado enzimáticamente y recubierto con goma arábica para preparar microcápsulas como material prometedor para ser utilizado como material pared para la encapsulación de ingredientes alimentarios funcionales.
6. Además, se deberían realizar más estudios para explorar estas microcápsulas con otros compuestos químicos, y el intervalo de tiempo de la hidrólisis enzimática en el almidón podría mejorar el conocimiento de la liberación del compuesto químico encapsulado en este tipo de microcápsulas

VIII. REFERENCIAS

- Aggarwal, P. & Dollimore, D. (2000). Degradation of starchy food material by thermal analysis. *Thermochimic. Acta*, 57, 357-358.
- Ahmed M., Akter, S., Lee, C. & Eun, B. (2010). Encapsulation by spray drying of bioactive components, physicochemical and morphological properties from purple. *Revista Iberoamericana Tecnología Postcosecha*, 16, 180-192.
- Al, Y., Hasjim, J. & Jane, J. (2010). Effects of lipids on enzymatic hydrolysis and physical properties of starch. *Carbohydrate Polymers*, 92, 120– 127.
- Alcázar, C. & Almeida, M.A. (2015). Physicochemical properties, modifications and applications of starches from different botanical sources. *Food Science Technology Campinas*, 35 (2), 215-236.
- Ali, B.H., Al-Qarawi, A.A., Haroun, E.M. & Mousa, H.M. (2003). The effect of treatment with Gum Arabic on gentamicin nephrotoxicity in rats: a preliminary study. *Renal Failure*, 25, (1), 15–20.
- Ali, B.H., Al-Salam, S., Al-Husseni, I., Kayed, R.R., Al-Masroori, N., Al-Harhi, T., Al Zaabi, M. & Nemmar, A. (2010). Effects of Gum Arabic in rats with adenine-induced chronic renal failure. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, 235, (3), 373–382.
- Amrita, K., Dabur, S. & Kapoor, M. (1999). Application of microencapsulation technology in dairy industry. *Indian Food Industry*, 18, 57–64.
- Ariztizábal, J., Moreno, F. & Basto, G. (2007). Estudio de una nueva técnica e implementación de una línea piloto de proceso para la obtención de dextrinas a partir de almidón de yuca. *Revista de Ingeniería e Investigación*, 27 (2), 26- 33.
- Arslan, S., Erbas, M., Tontul, I. & Topuz, A. (2015). Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* with different wall materials by spray drying. *LWT-Food Science & Technology*, 63(1), 685-690.
- Arvisenet, G., Le Bail, P., Voilley, A. & Cayot, N. (2002). Influence of physicochemical interactions between amylase and aroma compounds on the retention of aroma in food-like matrices. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 50, 7088–7093.

- Augustin M. A. & Hemar, Y. (2009). Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical. Society. Reviews*, 38, 902-912.
- Augustin, M. A. & Sanguansri, L. (2008). Encapsulation of Bioactives. *Food Materials Science: Principles and Practice*, 24, 577-601.
- Augustin, M. A., Sanguansri, L. Margetts, C. & Young, B. (2001). Microencapsulation of food ingredients. *Food Australia*, 53, 220–223.
- Ayodeji, A., Opeyemi, A., Vincent, C. & Adeola, D. (2013). Optimum hydrolysis conditions of cassava starch for glucose production. *International Journal of Advanced Research in IT and Engineering*, 2(1), 93-101.
- Bakowska, A. & Kolodziejczyk, P. (2011). Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. *Industrial crops and products*, 34, 1301-1309.
- Bansode, S., Banarjee, S., Gaikwad, D., Jadhav, L., Thorat, M. (2010). Microencapsulation: a review. *International Journal Pharmacology Science*, 1, 38–43.
- Bastos, D., Araujo, D. & Leao M. D. (2009). Ascorbic acid retaining using a new calcium alginate-Capsul based edible film. *Journal of Microencapsulation*; 26, 97-103.
- Beirao, S., Duarte, C., Moldao, M. & Beirao, M. L. (2011). Physical characterization of rice starch spherical aggregates produced by spray-drying. *Journal Food Engineering*, 104, 36-42.
- Belingeri, C., Giussani, B., Rodriguez, M. T., Ferrillo, A. & Vittadini, E. (2015). Oxidative stability of high-oleic sunflower oil in a porous starch carrier. *Food Chemistry*, 166, 346-351.
- Bello, L. A., O. Paredes, O., Roger, P. & Colonna, P. (1996). Amylopectin properties and fine structure. *Food Chemistry*, 56, 171-176.
- Benavent, Y. & Rosell, G.C.M. (2016). Comparison of porous starches obtained from different enzyme types and levels. *Carbohydrate Polymers*, x, xx-xx.
- Benavent, Y. & Rosell, G.C.M. (2017). Morphological and physicochemical characterization of porous starches obtained from different botanical sources and amyolytic enzymes. *International Journal of Macromolecules*,

103, 587-595.

- Beristain C. I., Garcia H. S. & Vernon, E. J. (2001). Spray dried encapsulation of cardamom (*Elettaria cardamomum*) essential oil with mesquite (*Prosopis juliflora*) gum. *Food Science Technology – LWT*, *34*, 398–401.
- Betancur, D. & Gallegos, S. (2004). Wet-fractionation of *Phaseolus lunatus* seeds: partial characterization of starch and protein. *Journal Science Food Agricultural*, *84*, 1193-1201.
- Bouquerand, P.-E. (2007). Extruded glassy vitamin C particles. *European Patent* 1836902, September 26.
- Boutboul, A., Giampaoli, G., Feigenbaum, A & Duvruet, V. (2002). Use of inverse gas chromatography with humidity control of the carrier gas to characterize aroma-starch interactions. *Food Chemistry*, *71*, 387–392.
- Browman B. A. & Russell R. M. (2001). Conocimientos Actuales sobre Nutrición. 8th edn, Washington DC: *Organización Panamericana de la Salud*.
- Cai, J., Man, J., Huang, J., Liu, Q., Wei., W. & Wei, W. (2015). Relationship between structure and functional properties of normal rice starches with different amylose contents. *Carbohydrate Polymers* *125*, 35-44
- Calame, W., Weseler, A.R., Viebke, C., Flynn, C. & Siemensma, A.D. (2008). Gum Arabic establishes prebiotic functionality in healthy human volunteers in a dose-dependent manner. *British Journal of Nutrition*, *100*, (6), 1269–1275.
- Chang, D.; Abbas, S.; Hayat, K.; Xia, S.; Zhang, X.; Xie, M.; Kim, J.M. (2010). Encapsulation of ascorbic acid in amorphous maltodextrin employing extrusion as affected by matrix/core ratio and water content. *Int. J. Food Sci. Technol.*, *45*, 1895–1901.
- Chen, G., & Zhang, B. (2012). Hydrolysis of granular corn starch with controlled pore size. *Journal of Cereal Science*, *56*(2), 316-320.
- Chen, Y., Yang, Q., Xu, X., Qi, L., Dong, Z., Luo, Z., Lu, X. & Peng, X. (2017). Structure Changes of Waxy and Normal Maize Starches Modified by Heat Moisture Treatment and Their Relationship with Starch Digestibility. *Carbohydrate Polymers*, *177*, 232-240.
- Cheng, S. Y., Yuen, M. C., Kan, C. W. & Cheuk, K. K. (2009). Cosmetic textiles with

- biological benefits: gelatin microcapsules containing vitamin C. *International Journal Molecular Medicine*, 24, 411-419.
- Chung, H., Othman, Z. & Lee, J. (2015). Gamma irradiation of corn starches with different amylose-to-amylopectin ratio. *Journal Food Science and Technology*, 52(10), 6218-6229.
- Cooke, D. and Gidley, M. J. (1992). Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinization: origin of enthalpic transition. *Carbohydrate Research*, 227, 103-112.
- De Azeredo, H. M. C. (2005). Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. *Alimentos E Nutrição*, 16, 89–97.
- Desai, K. G. H. & Park, H. J. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23, 1361–1394.
- Desai, K. G. H. & Park, H. J. (2005b). Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying. *Journal of Microencapsulation*, 22, 179.
- Desai, K. G., Liu, C. & Park, H. J. (2006). Characteristics of vitamin C encapsulated tripolyphosphate-chitosan microspheres as affected by chitosan molecular weight. *Journal of Microencapsulation*, 23, 79-90.
- Desai, K.G.; Park, H.J. Effect of manufacturing parameters on the characteristics of vitamin C encapsulated tripolyphosphate-chitosan microspheres prepared by spray-drying. *J. Microencapsul.* 2006, 23, 91–103.
- Dhital S., Shrestha A. K., & Gidley M. J. (2010). Relationship between granule size and in vitro digestibility of maize and potato starches. *Carbohydrate Polymers*, 82, 480-488.
- Dhital, S., Warren, F.J., Butterworth, P.J., Ellis, P. R., & Gidley, M.J. (2017). Mechanisms of starch digestion by α -amylase—structural basis for kinetic properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(5), 875–892.
- Drusch S. & Schwarz K. (2006). Microencapsulation properties of two different types of n-octenylsuccinate-derivatised starch. *European Food Research Technology*, 222, 155–164
- Dürüst, N., Sümengen, D., & Dürüst Y. (1997). Ascorbic acid and element contents

- of foods of Trabzon (Turkey). *Journal Agricultural Food Chemistry*, 45, 2085-2087.
- Dziezak, J.D. (1988). Microencapsulation and encapsulation ingredients. *Food Technology*, 42, 136–151.
- Eerlingen, R. C. & Delcour, J. A. (1995). Formation, analysis, structure and properties of type III enzyme resistant starch. *Journal Cereal Science*, 22, 129-138
- Escher, F.E., Nuessli, J. & Conde-Petit, B. (2000). Interactions of flavor release. In: *Flavour Release* (edited by D. Roberts & A. Taylor). 230–245. ACS Symposium. Washington, DC: American Chemical Society.
- Espinosa, V. (2012). Propiedades de digestion de almidones nativos y modificados de plátano y mango. Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Doctorado en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos.
- Esposito, E.; Cervellati, F.; Menegatti, E.; Nastruzzi, C.; Cortesi, R. Spray dried Eudragit microparticles as encapsulation devices for vitamin C. *Int. J. Pharm.* 2002, 242, 329–334.
- Estevinho, A. N., Rocha, A. N., Santos, L. M. & Alves, M. A. C. (2013). Using water-soluble chitosan for flavour microencapsulation in food industry. *Journal of Microencapsulation*, 30, 571–9.
- Estevinho, B. N., Carlan, I., Blaga, A. & Rocha, F. (2016). Soluble vitamins (vitamin B12 and vitamin C) microencapsulated with different biopolymers by a spray drying process. *Powded Technology*, 289, 71–78.
- Estevinho, B. N., Ramos, I. & Rocha, F. (2016). Effect of the pH in the formation of β -galactosidase microparticles produced by a spray-drying process. *International Journal Biology Macromolecules*, 78, 238–242.
- Fang X., Shima M. & Adachi S. (2005). Effects of drying conditions on the oxidation of linoleic acid encapsulated with gum arabic by spray-drying. *Food Science Technology Research*, 11, 380–384
- Fang, A. & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science Technology*, 21, 510-523.

- Fannon, J. E., Shull, J. M. & BeMiller, J. N. (1993). Interior channels of starch granules. *Cereal Chemistry*, *70*, 611– 613.
- Faria, A. F., Mignone, R. A., Montenegro, M. A., Mercadante, A. Z., & Borsarelli, C. D. (2010). Characterization and singlet oxygen quenching capacity of spray-dried microcapsules of edible biopolymers containing antioxidant molecules. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(13), 8004–8011.
- Fennema, O. (1993). *Química de los alimentos*. Ed. Acribia s.a. Zaragoza, España, segunda edición, 189-265.
- Ferrari, C., Marconi, S. & Aguirre, J. (2012). Effects of spray-drying conditions on the physicochemical properties of blackberry powder. *Drying Technology*, *30*, 154-163.
- Ferrini, L. M. K., Rocha, T. S., Demiate, I. M. and Franco, C. M. L. (2008). Effect of acid-methanol treatment on the physicochemical and structural characteristics of cassava and maize starches. *Starch/Stärke*, *60*, 417–425.
- Fick, A. (1855). Ueber Diffusion. *Annalen Der Physik Und Chemie*, *170*(1), 59–86.
- Finotelli, P.V.; Rocha-Leao, M.H.M. Microencapsulation of ascorbic acid in maltodextrin and capsule using spray-drying. In 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering, 4th Mercosur Congress on Process System Engineering, Rio de Janeiro, August 14–18, 2005; 1–11.
- Flindt, C., Al-Assaf, S., Phillips, G.O. and Williams, P.O. (2005). Studies of acacia exudates gums. Part V. Structural features of *Acacia seyal*. *Food Hydrocolloids*, *9*(4); 687–701.
- Gallant, D.J., Derrien, A. Aumaitre, A. & Guilbot, A. (1973). Dégradation in vitro de l'amidon par le sue pancréatique. Etude par microscopie électronique à transmission et à balayage. *Starch/Stärke*, *25*(2), 56-64.
- Gao, F., Li, D., Bi, C., Mao, Z. & Adhikari, B. (2014). Preparation and characterization of starch crosslinked with sodium trimetaphosphate and hydrolyzed by enzymes. *Carbohydrate Polymers*, *103*, 310–318.
- gelatinization, retrogradation, pasting and gel textural properties. *Food Chemistry*, *101*, 1499-1507.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A. & Saurel, R. (2007).

- Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40, 1107-1121.
- Gibbs, B., Kermasha, S., Alli, I. & Mulligan, C. (1999). Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal Food Science Nutritional*, 50, 213-224.
- Glenn, G.M. & Stern, D.J. (1999). Starch-Based Micro-cellular Forms. US Patent Serial 5958589, Washington, DC.
- Glover, D.A., Ushida, K., Phillips, A.O. & Riley, S.G. (2009). Acacia(sen) SUPERGUM™ (Gum Arabic): An evaluation of potential health benefits in human subjects. *Food Hydrocolloids*, 23, (8), 2410–2415.
- Golovnya, R.V., Misharina, T.A. & Terenina, M.B. (1998). GC evaluation of flavour compound sorption from water solutions by corn starch cryotextures obtained by freezing. *Nahrung*, 42, 380–384.
- Gonçalves, A., Estevinho, B.N. & Rocha, F. (2016). Microencapsulation of vitamin A: a review, *Trends Food Science. Technology*, 51, 76–87.
- Gofii, I., García, A. & Saura, F. (1997). A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. *Nutrition Research*, 17, 427-437.
- Goubet, I., Le Quere, J.L. & Voilley, A. (1998). Retention of aroma compounds by carbohydrates: influence of their physicochemical characteristics and of their physical state. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 48, 1981–1990.
- Guan, J. & Hanna, A. M. (2004). Extruding foams from corn starch acetate and native corn starch. *Biomacromolecules*, 5, 2329-2339.
- Han J. & BeMiller J. N. (2008). Effects of protein on crosslinking of normal maize, waxy maize, and potato starches. *Carbohydrate Polymers*, 73, 532-540.
- Han X., Benmoussa M., Gray J., BeMiller J., & Hamaker B. (2005). Detection of proteins in starch granule channels. *Cereal Chemistry*, 82, 351-355.
- Han X. & Hamaker B. (2002a). Location of starch granule-associated proteins revealed by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Cereal Science*, 35, 109-116.
- Hernández-Uribe, J., Agama-Acevedo, E., González-Soto, R., Bello-Pérez, L. & Vargas-Torres, A. (2011). Isolation and characterization of Mexican chayote

- tuber (*Sechium edule* Sw.) starch. *Starch/Stärke*, 63, 32-41.
- Hoover, R. & Ratnayake, W.S. (2001). Starch characteristics of black bean, chick pea, lentil, navy bean and pinto bean cultivars grown in Canada. *Cereal Chemistry*, 78, 489-498.
- Hoyos-Leyva, J.D., Chavez-Salazar, F., Castellanos-Galeano, F., Bello-Perez, L.A. & Álvarez-Ramírez, J. (2018). Physical and chemical stability of L-ascorbic acid microencapsulated into taro starch spherical aggregates by spray drying. *Food Hydrocolloids*, 83, 143-152.
- Huber, K. C. and BeMiller, J. N. (2000). Channels of maize and sorghum starch granules. *Carbohydr. Polym.* 41, 269–276.
- Hur, S.J., Decker, E.A., & McClements, D.J. (2009). Influence of initial emulsifier type on microstructural changes occurring in emulsified lipids during in vitro digestion. *Food Chemistry*, 114, 253–262.
- Jafari, S.M., Assadpoor, E., He, Y. & Bhandari, B. (2008). Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. *Drying Technology*, 26, (7), 816-835.
- Jane, J. (2006). Current understanding on starch granule structures. *Journal of Applied Glycoscience* 53, 205-213.
- Jane, J. (2009). Structural features of starch granules II. In J. BeMiller & R. Whistler (Eds.). *Starch: Chemistry and Technology*. New York, USA.: Academic Press of Elsevier Inc. Pp. 193-236.
- Jane, J., Kasemsuwan, T., Leas, S., Ia, A., Zobel, H. & Robyt J. F. (1994). Anthology of starch granule morphology by scanning electron microscopy. *Starch/Stärke*, 46, 121-129.
- Jayakody, L., & Hoover, R. (2002). The effect of lintnerization on cereal starch granules. *Food Research International*, 35, 665–680.
- Junyaprasert, V. B., Mitrevej, A. Sinchaipanid, N., Broome P. & Wurster D. E. (2001). Effect of process variables on the microencapsulation of vitamin A palmitate by gelatin-acacia coacervation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 27, 561-566.
- Kainuma, K. and French, D. (1971). Nægeli amylopectin and its relationship to

- starch granule structure. I. Preparation and properties of amyloextrins from various starch types. *Biopolymers*, 10, 1673–1680.
- Karathanos, V.T. & Saravacos, G.D. (1992). Porosity and pore size distribution of starch materials. *Journal Food Engineering*, 18, 259–280.
- Kim Y. D. & Morr C. V. (1996). Microencapsulation properties of gum arabic and several food proteins: spray-dried orange oil emulsion particles. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 44, 1314-1320.
- Kirby, C.; Whittle, C.; Rigby, N.; Coxon, D.; Law, B. (1991). Stabilization of ascorbic acid by microencapsulation in liposomes. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 26, 437–449.
- Kirby C. S. (1991). Microencapsulation and controlled delivery of food ingredients. *Food Science Technology*, 5, 74-77
- Knezevic, Z., Gosak, D., Hraste, M. & Jalsenjako, I. (1998). Fluid bed microencapsulation of ascorbic acid. *Journal of Microencapsulation*, 15, 237-52
- Knutzon, C. A. & Grove, M. J. (1994). Rapid method for estimation of amylose in maize starches. *Cereal Chemistry*, 71, 469,
- Kong, B.W., Kim, J.I., Kim, M.J. & Kim, J.C. (2003). Porcine pancreatic α -amylase hydrolysis of native starch granules as a function of granule surface area. *Biotechnology Progress*, 19, 1162-1166.
- Kosaraju S. L., Tran C. & Lawrence A. (2006). Liposomal delivery systems for encapsulation of ferrous sulfate: Preparation and characterization. *Journal Liposome Research*, 16, 347–358.
- Kuang, S. S., Oliveira J. C. & Crean A. M. (2010). Microencapsulation as a Tool for Incorporating Bioactive Ingredients into Food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50, 951-968.
- Kuge, T. & Takeo, K. (1968). Complexes of starchy materials with organic compounds: Part I. Affinity observed by gas chromatography. *Agricultural and Biological Chemistry*, 32, 753–758.
- Lee, J.B.; Ahn, J.; Kwak, H.S. (2003). Microencapsulated ascorbic acid for milk fortification. *Arch. Pharm. Res.*, 26, 575–580.

- Lee J. B., Ahn J., Lee J. and Kwak H. S. (2004). L-ascorbic acid microencapsulated with polyacylglycerol monostearate for milk fortification. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 68: 495-500.
- Lee S. & BeMiller J. N. (2008). Lysophosphatidylcholine identified as channel-associated phospholipid of maize starch granules. *Cereal Chemistry*, 85, 776-779.
- Li, H., Ho, V.T., Turner, M.S. & Dhital, S. (2016). Encapsulation of *Lactobacillus plantarum* in porous maize starch. *LWT-Food Science and Technology*, 74, 542-549.
- Li, P., He, X., Dhital, S., Zhang, B. & Huang, Q. (2017). Structural and physicochemical properties of granular starches after treatment with debranching enzyme. *Carbohydrate Polymers*, 169, 351-356.
- Liu, Q. (2005). Understanding starches and their role in foods. In S. W. Cui (Ed.). *Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties, and Applications*. Boca Raton, FL., USA.: CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC. Pp. 309-355.
- Loksuwan, J. (2007). Characteristics of microencapsulated β -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. *Food Hydrocolloids*, 21, 928–935.
- Luo, Z., Cheng, W., Chen, H. & Fu, X. (2013). Preparation and properties of enzyme-modified cassava starch–zinc complexes. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 61, 4631-4638.
- Madene A., Jacquot M., Scher J. & Desobry S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal Food Science Technology*, 41, 1-21.
- Madziva H., Kailasapathy K. & Phillips M. (2006). Evaluation of alginate-pectin capsules in Cheddar cheese as a food carrier for the delivery of folic acid. *Food Science Technology – LWT*, 39, 146–151.
- Majzoobi, M., Hedayati, S. & Farahnaky, A. (2015). Functional properties of microporous wheat starch produced by α -amylase and sonication. *Food Bioscience*, 11, 79-84.

- Martínez, M.A., Vargas, A., Román, A. D. & Palma, H. M. (2017). Partial characterization of chayotextle starch-based films added with ascorbic acid encapsulated in resistant starch. *International Journal Biological Macromolecules*, *98*, 341–347.
- McGrance, S.J., Cornell, H.J. & Rix, C.J. (1998). A simple and rapid colorimetric method for the determination of amylose in starch products. *Starch/Stärke*, *50*, 158-163
- McMaster, L., Kokott S. & Mazutti, P. (2005). Microencapsulation of Bifidobacterium lactis for incorporation into soft foods. *World Journal Microbiology. Biotechnology*, *21*, 723–728.
- McNamee, B.F., O'Riodan, E.D. & O'Sullivan, M. (1998). Emulsification and microencapsulation properties of gum arabic. *Journal Agricultural Food Chemistry*, *46*, 4551–4555.
- Medina, L., García, E., Calderas, F. & González, R. (2013). Microencapsulation by spray drying of gallic acid with nopal mucilage (*Opuntia ficus indica*). *LWT Food Science Technology*, *50*, 642-650.
- Mutka, J.R. & Nelson, D.B. (1988). Preparation of encapsulated flavors with high flavor level. *Food Technology*, *42*, 154–157.
- Nasir, O., Wang, K., Föller, M., Bhandaru, M., Sandulache, D., Artunc, F., Ackermann, T.F., Ebrahim, A., Palmada, M., Klingel, K., Saeed, A.M. & Lang, F. (2010). Downregulation of angiogenin transcript levels and inhibition of colonic carcinoma by Gum Arabic (*Acacia senegal*). *Nutrition and Cancer*, *62*, (6), 802–810.
- Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni, F. & Coppola, R. (2012). Microencapsulation in food science and biotechnology. Current opinion in biotechnology available in *Science Direct*, *23*, 182-186.
- Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F. & Durrieu, V. (2013). Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. *Industrial Crops and Products*, *42*, 469-479.
- Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F. & Durrieu, V. (2014). The effect of vegetable protein modifications on the microencapsulation process. *Food*

- Ordoñez, E., M., & Herrera, A., A. (2012). Evaluación de las propiedades fisicoquímicas y morfológicas de almidón de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) y de las proteínas del suero de la leche como encapsulantes de limoneno. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- Palma, R.H.M. (2012). Caracterización de almidones de diferentes fuentes tratados con ácido para la encapsulación de vitamina C. Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Doctorado en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos.
- Palma, H. M., Agama, E., Mendez, G., Gonzalez, R. A., Vernon, E. J., & Bello, L. A. (2012). Effect of acid treatment on the physicochemical and structural characteristics of starches from different botanical sources. *Starch/Stärke*, 64, 115–125.
- Palma, R.H.M., Agama, A.E., González, S.R.A., Vernon, C.E.J., Álvarez, R.J. & Bello, P.L.A. (2013). Ascorbic acid microencapsulation by spray-drying in native and acid-modified starches from different botanical sources. *Starch/Stärke*, 65, 584–592.
- Palma, R.H.M., Álvarez, R.J. & Vargas, T.A. (2018). Using modified starch/maltodextrin microparticles for enhancing the shelf life of ascorbic acid by the spray-drying method. *Starch/Stärke*, 201700323, 1–7.
- Park, Y.K., Bar, W.H., & Papini, R.S. (1971). Relacao entre intumescimento, gelatinizacao suscetibilidade dos amilos de mandioca e de milho. alfa-amilase bacteriana. *Revista Brasileira de Tecnologia*, 2, 95-100.
- Paredes, O., Bello, L. A. & López, M. G. (1994). Amylopectin: Structural gelatinization and retrogradation studies. *Food chemistry*, 50, 411-418
- Paredes, O., Schevenin, M. L., Hernández, D. & Cárabez, A. (1989). Amaranth starch isolation and partial characterization. *Starch/Stärke*, 41, 205-207
- Phillips, A.O. & Phillips, G.O. (2011). Biofunctional behaviour and health benefits of a specific Gum Arabic. *Food Hydrocolloids*, 25, (2), 165–169
- Pierucci A. P. T. R., Andrade L. R., Baptista E. B., Volpato N. M. & Rocha, M. H.

- (2006). New microencapsulation system for ascorbic acid using pea protein concentrate as coat protector. *Journal of Microencapsulation*, 23, 654-62
- Piorkowski, D. T., & McClements, D. J. (2013). Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. *Food Hydrocolloids*, x, 1–37.
- Przetaczek, R. I. (2017). Physicochemical properties of starches isolated from pumpkin compared with potato and corn starches. *International Journal of Biological Macromolecules*.
- Quek, S.Y., Chok, N.K. & Swedlund, P. (2007). The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. *Chemical Engineering and Processing*, 46, 386–392.
- Ré, M.I. (1998). Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology*, 16, 1195-1136.
- Reineccius T. A., Reineccius G. A. & Peppard T. L. (2005). The effect of solvent interactions on alpha-, beta-, and gamma-cyclodextrin flavor molecular inclusion complexes. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 53, 388–392.
- Righetto A. M. & Netto F. M. (2006). Vitamin C stability in encapsulated green West Indian cherry juice and in encapsulated synthetic ascorbic acid. *Journal Science Food Agricultural*, 86, 1202–1208.
- Rosenberg, M., Kopelman, I. J. & Talmon, Y. (1990). Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 38, 1288–1294.
- Sajilata, M.G., Singhal, R.S. & Kulkarni, P.K. (2006). Resistant starch a review. *Compr. Rev. in Food Science Food Safety.*, 5, 1-17.
- Sánchez-Mata, M.C., Cámara-Hurtado, M., Díez-Marqués, C. & Torija-Isasa, M.E. (2000). Comparison of high-performance liquid chromatography and spectrofluorimetry for vitamin C analysis of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *European Food Research Technology*, 210, 220–225.
- Sandhu, K. S., Singh, N. and Lim, S. T. (2007). A comparison of native and acid thinned normal and waxy corn starches. Physicochemical, thermal, morphological and pasting properties. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 40, 1527–

1536.

- Sandoval, A.A., Rodríguez, S.E. & Fernández Q.A. (2005). Aplicación del análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC) para la caracterización de las modificaciones del almidón. *Dyna*, 72 (146), 45-53.
- Schrooyen P. M. M., van der Meer R. & Kruif C. G. (2001). Microencapsulation: its application in nutrition. *Proceedings of the Nutrition Society*, 60, 475-479
- Shahidi F. & Han X. Q. (1993) Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33, 501–547.
- Shamekh, S., Päivi, M., KAisa, P. and Forsse, P. (2002). Film Formation Properties of Potato Starch Hydrolysates. *Starch/Stärke*, 54(1), 20-24.
- Sharma, R. & Lal, D. (2005). Fortification of milk with microencapsulated vitamin C and its thermal stability. *Journal of Food Science Technology (Mysore)*, 42, 191–194.
- Sharma, R.D. (1985). Hypocholesterolemic effect of gum acacia in men. *Nutrition Research*, 5, (12), 1321–1326.
- Singh, K. & Singh, N. (2007). Some properties of corn starches II: Physicochemical,
- Singh, M. N., Hemant, K. S., Ram, M. & Shivakumar, H. G. (2010). Microencapsulation: a promising technique for controlled drug delivery. *Research Pharmacology Science*, 5, 65–77.
- Singh, N., Singh, J., Kaur, L., Singh, S. N. & Singh, G.B. (2003). Morphological thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chemistry*, 81, 219-231.
- Solms, J. (1986). Interaction of non-volatile and volatile substances in food. In: *Interactions of Food Components* (edited by G.G. Birch & M.F. Lindley). 189–210. London: Elsevier.
- Spinelli, A., Guérente, L., Armand, S. & Lenouvel, F. (2013). Functional characterization of starch-degrading enzymes using quartz crystal microbalance with dissipation monitoring (QCM-D). *Sensors and Actuators B*, 176,1038-1043.
- Srichuwong, S.; Isono, N.; Mishima, T.; Hisamatsu, M. (2005). Structure of lintnerized starch is related to X-ray diffraction pattern and susceptibility to

- acid and enzyme hydrolysis of starch granules. *Int. J. Biol. Macromol.* 37, 115-121.
- Sujka M. & Jamroz J. (2007). Starch granule porosity and its changes by means of amylolysis. *International Agrophysics*, 21, 107-113.
- Sujka M. & Jamroz J. (2010). Characteristics of pores in native and hydrolyzed starch granules. *Starch-Starke*, 62, 229-235.
- Szulc, K. & Lenart, A., (2012). Water vapour adsorption properties of agglomerated baby food powders. *Journal of Food Engineering*, 109, 135–141.
- Tari T. A. & Singhal R. S. (2002). Starch-based spherical aggregates: stability of a model flavouring compound, vanillin entrapped therein. *Carbohydrate Polymers*, 50, 417–421
- Tari T. A.; Annapure U. S.; Singhal R. S. & Kulkarni P. R. (2003). Starch- based spherical aggregates: screening of small granule sized starches for entrapment of a model flavouring compound, vanillin. *Carbohydrate Polymers*, 53, 45-51.
- Tecante, A., & Doublier, J.L. (1999). Steady flow and viscoelastic behavior of crosslinked waxy corn starch-kappa-carrageenan pastes and gels. *Carbohydr. Polym.* 40, 221–231.
- Tester, R F., Karkalas, J. & Qi, X. (2004). Starch-composition, fine structure and architecture. *Journal Cereal Science*, 39, 151-165.
- Tester, R. F. and W. R. Morrison. (1990). Swelling and gelatinization of cereal starches, I. Effect of amylopectin, amylose and lipids. *Cereal Chemistry*, 67, 551- 557.
- Tester, R.F. and Karkalas, J. (2002). Starch. In: Steinbuchel, A. (Series Ed.) Vandamme, E.J., De Baets, S., Steinbuchel, A. (vol. Eds.), *Biopolymers*, 6. Polysaccharides. II. Polysaccharides from Eukaryotes, Wiley–VCH, Weinheim, 381–438.
- Thomas, D.J. & Atwell, W.A. (1999). Starches. St Paul, MN: Eagan Press.
- Thurn, A. & Burchard, W. (1985). Heterogeneity in branching of amylopectin. *Carbohydrate Polymers*, 5, 441-460.
- Trindade M. A. & Grosso C. R. F. (2000). The stability of ascorbic acid

- microencapsulated in granules of rice starch and in gum Arabic. *Journal of Microencapsulation*, 17: 169-176
- Trubiano, P.C. & Lacourse, N.L. (1988). Emulsion stabilizing starches: use in flavour encapsulation. In: *Flavour Encapsulation* (edited by S.J. Risch & G.A. Reineccius). 45–54. ACS Symposium Series 370. Washington, DC: American Chemical Society.
- Tonon R.V., Brabet C., Pallet D., Brat P., Hubinger M.D. (2009). Physicochemical and morphological characterisation of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced with different carrier agents. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1950-1958.
- Uddin, M.S.; Hawlader, M.N.; Zhu, H.J. (2001). Microencapsulation of ascorbic acid: Effect of process variables on product characteristics. *J. Microencapsul.*, 18, 199–209.
- Uthumporn, U., Karim, A. & Fazilah, A. (2013). Defatting improves the hydrolysis of granular starch using a mixture of fungal amylolytic enzymes. *Industrial Crops and Products*, 43, 441– 449.
- van der Maarel, M.J., van der Veen, J.C., Leemhuis, H. & Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94, 137-155.
- Vandeputte G.E. & Delcour J.A. (2004). From sucrose to starch granule to starch physical behaviour: a focus on rice starch. *Carbohydrate Polymers*, 58, 245-266.
- Versantvoort, C., Oomen, A., Van de Kamp, E., Rompelberg, C. & Sips. (2005). Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 31–40.
- Verbeken, D.; Dierckx, S. & Dewettinck. (2003). Exudate gums: Occurrence, production, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63, (1), 10-21.
- Vos, P., Faas, M., Spasojevic, M. & Sikkeme, J. (2009). Review multiscale requirements for bioencapsulation in medicine and biotechnology. *Biomaterials*, 30, 2559–2570.

- Wang, L. Z. & White, P. J. (1994a). Structure and physicochemical properties of starches from oats with different lipid content. *Cereal Chemistry*, *71*, 443-450
- Wang, L. Z. & White, P. J. (1994b). Structure and properties of amylose, amylopectin and Intermediate materials of oat starches. *Cereal Chemistry*, *71*, 263-268.
- Whistler, R., L., Madson, M., A., Zhao, J., Daniel & R., J. (1996). Surface Derivatization of Corn Starch Granules. *Cereal Chemistry*, *75*, 72–77.
- Whittam, M.A., Noel, T.R. & Ring, S.G. (1990). Melting behavior of A-and B-type crystalline starch. *Int. J. Biol.* *12*, 359-62.
- Williams, P. A. Phillips, G. O. (2000). In Handbook of Hydrocolloids; Williams, P. A., Phillips, G. O., Eds.; CRC Press: Cambridge, 155-168.
- Xie, Z., Wang, F., Liu, H., Guo, S., Zhu, A., & Niu, H. (2010). Gelatin-walled microencapsulated diet for larval shrimp (*Penaeus japonicus* Bate) manufactured using the fluidized bed coating process. *Aquaculture research*, *42*, 65-73.
- Yamada, T. Hisamatsu, M, Teranishi, K., Katsuro, K. Hasegawa, N. & Hayashi, T. (1995). Components of the porous maize starch granule prepared by amylase treatment. *Starch/Stärke*, *46*, 358–361.
- Yu, W., Tan, X., Zou, W., Hu, Z., Fox, G.P., Gidley, M.J. & Gilbert, R.G. (2017). Relationships between protein content, starch molecular structure and grain size in barley. *Carbohydrate Polymers*, *155*, 271–279.
- Yu, W., Tao, K. & Gilbert, R.G. (2018). Improved methodology for analyzing relations between starch digestion kinetics and molecular structure. *Food Chemistry*, *264*, 284–292.
- Yung, S., Mayersohn, M. & Robinson, J.B. (1982). Ascorbic acid absorption in humans: A comparison among several dosage forms. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *71*(3), 282- 285.
- Zeller, B.L. & Salleb, F.Z. (1996). Production of micro-porous sugars for adsorption of volatile flavors. *Journal Food Science*, *61*, 749–759.
- Zhang, B., Cui, D., Liu, M. & Gong, H. (2012). Corn porous starch: Preparation, characterization and adsorption property. *International Journal Biological*

Macromolecules, 50, 250-256.

Zhao, J. & Whistler, R.L. (1994). Spherical aggregates of starch granules as flavor carrier. *Food Technology*, 48, 104–105. 2.5.2

Zobel, H. F. (1988). Molecules to granules: A comprehensive starch review. *Starch/Stärke*, 40, 41-50.

Zuidam N. J. & Shimoni, E. (2010). Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them. In: *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, Zuidam N. J. y Nedović V. (eds.) Springer, New York, Chapter 2, 1-27.