

“MADRE DE DIOS CAPITAL DE LA BIODIVERSIDAD DEL PERÚ”



**FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**“Microencapsulación del aceite de pescado de anchoveta
(*Engraulis ringens*) mediante doble emulsificación empleando
aislado proteico de soya reticulado con transglutaminasa”.**

TESISTA: Bach. ELIUD DENNIS ARPI ANCO

Para Optar el Título Profesional de:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

PUERTO MALDONADO - PERÚ

2015

“MADRE DE DIOS CAPITAL DE LA BIODIVERSIDAD DEL PERU”

FACULTAD DE INGENIERIA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

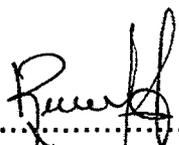
TESIS:

**“MICROENCAPSULACIÓN DEL ACEITE DE PESCADO DE ANCHOVETA
(ENGRAULIS RINGENS) MEDIANTE DOBLE EMULSIFICACIÓN EMPLEANDO
AISLADO PROTEICO DE SOYA RETICULADO CON TRANSGLUTAMINASA”.**

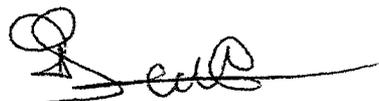
Bach: ELIUD DENNIS ARPI ANCO

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL

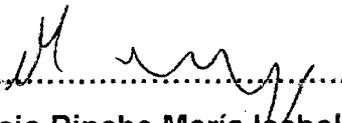
SUSTENTADA Y APROBADA ANTE EL SIGUIENTE JURADO



.....
Ing. Huamán Cruz Raúl
PRESIDENTE



.....
Dra. Madueño Portilla Roxana
SECRETARIA



.....
Dra. Cajo Pinche María Isabel
VOCAL

PUERTO MALDONADO – PERU

2015

DEDICATORIA

A Dios por iluminar mi camino:

"Cada mañana al despertar agradezco tus bondades a mi vida, por todo lo que me permites disfrutar" J.A.R.

A mi amada esposa: María por su amor y comprensión, a mi querida hija Gaia, cuya ternura y sonrisa me hacen pensar en lo lindo que ha de ser el paraíso.

Con eterna gratitud a mis queridos padres: Jesús y Haydee, con su apoyo y sacrificio hacen posible la culminación de una de mis metas profesionales más importantes y con cariño todos mis hermanos.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Tecnológico de la Producción por haberme abierto sus puertas y a los profesionales que laboran en el laboratorio de fisicoquímica y sensorial por su invaluable apoyo y colaboración: Ing. Alberto Salas, Ing. Maritza Barriga, Bigo. Miguel Albrecht, Bigo. Armando Solari, Qco. Carlos Castro, Qco. Gary Álvarez, Ing. Diana Aranda, Ing. Silvia Pandia, Ing. Carlos Pariona, Ing. Enzo Aldoradin. Tco. Luis Quispe, quienes no sólo me brindaron su ayuda desinteresada sino también su valiosa amistad.

Al Ing. Miguel Chávez Pinchi asesor del presente trabajo por sus acertadas sugerencias e invaluable aportes al plasmar la tesis.

A los miembros del jurado calificador: Ing. Raúl Huamán Cruz, Dra. Roxana Madueño Portilla y en especial a la Dra. María Isabel Cajo Pinche por todo el apoyo brindado durante la revisión del presente trabajo de investigación.

PRESENTACIÓN

El mar peruano es considerado el más productivo del mundo y presenta las condiciones ideales para que se desarrolle abundantemente la anchoveta (*Engraulis ringens*) el cual se ha constituido como el principal recurso pesquero del país representando el mayor porcentaje de las exportaciones pesqueras peruanas. El aceite obtenido de la grasa de anchoveta durante la producción de harina de pescado es un producto industrial de alto valor nutricional por ser una de las mejores fuentes alimenticias de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de la serie omega-3 (AGPI-CL, ω -3) incluyendo el ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA). Aspecto que ha suscitado mucho interés para su utilización como fuente de ácidos grasos poliinsaturados en la formulación y suplementación de diversos tipos de alimentos, sin embargo su olor y sabor característicos, debido al deterioro oxidativo que sufre lo limitan para ser incorporado directamente a la dieta diaria, siendo este uno de los más grandes desafíos que deben afrontarse. En este contexto, la microencapsulación se presenta como una poderosa técnica que permite la protección del aceite de pescado, aumentando la estabilidad oxidativa del aceite y además enmascarando sabores y aromas no deseados. Asimismo también le confiere algunas propiedades como, la facilidad de manipulación y mezclado, dispersión uniforme y mejora de la consistencia del producto. La microencapsulación en resumidas cuentas se basa en atrapar un compuesto en una matriz polimérica formando una especie de huevo pero a nivel microscópico, la cual crea un microambiente dentro de la cápsula capaz de controlar las interacciones entre la parte interna y la externa. Siendo esta la razón por lo que esta tecnología versátil es ampliamente estudiada y utilizada en diversos campos de la industria (medicina, farmacia, alimentos, agricultura, etc). Estas características hacen de la microencapsulación adecuada para aplicaciones en la industria alimentaria, en particular para la producción de alimentos de alto valor en la que se requiere la adición de ingredientes funcionales para modificar el sabor, color, textura o la preservación de propiedades, siendo el aceite de pescado (FO) un ingrediente ideal.

Se han desarrollado y descrito varios métodos de microencapsulación, cada metodología tiene características y particularidades que permiten la obtención de microcápsulas con propiedades mecánicas y físico-químicas peculiares, siendo un método modificado de coacervación mediante doble emulsificación la propuesta en este trabajo de investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
I. MARCO TEORICO.....	5
1.1. Antecedentes.....	6
1.2. Aceite de pescado fuente de ácidos grasos.....	8
1.2.1. Ácidos grasos esenciales en nuestra dieta.....	13
1.2.2. Beneficios a la salud de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.....	17
1.2.3. Desafíos de la utilización del aceite de pescado.....	20
1.3. Proceso de microencapsulación.....	22
1.3.1. Microencapsulación.....	23
1.3.2. Elementos para la producción de microcápsulas.....	26
1.3.2.1. Selección del núcleo.....	26
1.3.2.2. Selección del material de pared o matriz encapsuladora.....	27
1.3.2.2.1. Aislado proteico de soya.....	29
1.3.3. Métodos de microencapsulación.....	30
1.3.3.1. Atomización.....	30
1.3.3.2. Enfriamiento y refrigeración de aspersiones.....	33
1.3.3.3. Liofilización.....	33
1.3.3.4. Extrusión.....	35
1.3.3.5. Cocrystalización.....	36
1.3.3.6. Coacervación.....	37
1.3.3.6.1. Emulsiones y desestabilización.....	38
1.3.3.6.2. Reticulación proteica con la enzima transglutaminasa.....	44
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
2.1. Lugar de ejecución.....	48
2.2. Materiales.....	48
2.2.1. Materia prima e insumos.....	48

2.2.2.	Reactivos químicos	48
2.2.3.	Materiales de laboratorio.....	49
2.2.4.	Equipos.....	49
2.3.	Métodos de análisis.....	50
2.3.1.	Análisis físico químicos del aceite de pescado	50
2.3.2.	Determinación de la estabilidad física de la emulsión I	51
2.3.3.	Determinación del aceite libre de la emulsión I.....	51
2.3.4.	Determinación del contenido total de aceite en las microcápsulas	51
2.3.5.	Determinación de la eficiencia microencapsulación	51
2.3.6.	Determinación del perfil de ácidos grasos por cromatografía gaseosa	52
2.3.7.	Determinación de color	52
2.3.8.	Determinación de la solubilidad de las microcápsulas.....	52
2.4.	Metodología experimental	52
2.4.1.	Diseño experimental.....	55
2.5.	Análisis estadístico	56
III.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	58
3.1.	Caracterización fisicoquímica del aceite desodorizado de anchoveta	59
3.2.	Perfil lipídico del aceite	60
3.3.	Influencia del aislado proteico de soya en la estabilidad de la emulsión I (O/W).....	62
3.4.	Influencia de la enzima transglutaminasa activa (TG-K) en la estabilidad de la emulsión I (O/W)	64
3.5.	Efecto de las condiciones de emulsificación de la emulsión II (O/W/O) en el contenido aceite de pescado encapsulado.....	66
3.6.	Influencia de la relación núcleo: material de pared en el contenido de aceite de pescado y en las características de secado de las microcápsulas.....	69
3.7.	Caracterización de las microcápsulas	72
	CONCLUSIONES	76
	RECOMENDACIONES	77
	BIBLIOGRAFIA	78
	ANEXOS.....	88

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 01. Producción mundial de aceite de pescado en los principales países, promedio de los últimos 10 años.....	8
Tabla 02. Ácidos grasos comunes en los alimentos.....	11
Tabla 03. Contenidos de EPA y DHA en aceite de pescado de diferentes especie.....	12
Tabla 04. Eicosanoides formados a partir de los ácidos grasos ω -3 y ω -6.....	15
Tabla 05. Materiales de pared usados para la microencapsulación de alimentos.....	27
Tabla 06. Características físicoquímicas del aceite desodorizado anchoveta.....	59
Tabla 07. Composición en ácidos grasos del aceite desodorizado de anchoveta	61
Tabla 08. Contenido de aceite de pescado (EPA+DHA) en las microcápsulas.....	69
Tabla 09. Principales características de las microcápsulas.....	73
Tabla 10. Análisis de varianza de influencia del aislado proteico de soya en la estabilidad de la emulsión I (O/W).....	89
Tabla 11. Información agrupada utilizando el método de Tukey.....	89
Tabla 12. Análisis de varianza del efecto de las condiciones de emulsificación de la emulsión II (O/W/O) en el contenido aceite de pescado encapsulado.....	91
Tabla 13. Análisis de varianza de la influencia de la relación núcleo: material de pared en el porcentaje de aceite de pescado (% EPA +DHA).....	93
Tabla 14. Información agrupada utilizando el método de Tukey.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 01. Vías metabólicas para la síntesis de ácidos grasos ω -3 y ω -6.....	14
Figura 02. Energía para disociar un átomo de hidrogeno.....	20
Figura 03. Cinética de autooxidación de los AGPI.....	21
Figura 04. Morfología de las microcápsulas.....	25
Figura 05. Diagrama típico para la encapsulación por atomización de ingredientes alimentarios y nutracéuticos.....	32
Figura 06. Representación de la obtención de microcápsulas por coacervación usando gelatina y goma arábiga.....	38
Figura 07. Dispositivos mecánicos de alta energía: homogeneizador de alta presión, molino coloidal, microfluidizador y homogeneizador ultrasónico.....	40
Figura 08. Representación esquemática para ver las diferencias entre emulsiones, nanoemulsiones y microemulsiones.....	41
Figura 09. Diagrama esquemático de los mecanismos de desestabilización más comunes en emulsiones alimenticias.....	42
Figura 10. Esquema ilustrativo del proceso de dos etapas en la formación de una emulsión múltiple tipo O/W/O.....	43
Figura 11. Esquema los tipos de emulsiones: a) emulsión múltiple O/W/O y b) emulsión múltiple W/O/W.....	44
Figura 12. Reticulación de proteínas inducida por la enzima transglutaminasa.....	46
Figura 13. Diagrama de flujo de la microencapsulación del aceite de pescado.....	53
Figura 14. Efecto del aislado proteico en la estabilidad de la emulsión.....	63
Figura 15. Influencia de la enzima transglutaminasa en la estabilidad de la emulsión I.....	65
Figura 16. Grafica de Interacción para % de EPA+DHA en las microcápsulas.....	67
Figura 17. Fotos de las microcápsulas obtenidas.....	70
Figura 18. Diagrama de cajas de las proporciones de Núcleo: Material de pared usas en la elaboración de microcápsulas.....	71

Figura 19. Grafica de probabilidad de residuos.....	90
Figura 20. Prueba de igualdad de varianza.....	90
Figura 21. Grafica de interacción para % de EPA+DHA.....	91
Figura 22. Grafica de probabilidad de residuos.....	92
Figura 23. Prueba de igualdad de varianza.....	92
Figura 24. Grafica de probabilidad de residuos.....	94
Figura 25. Prueba de igualdad de varianza.....	94
Figura 26. Ficha técnica de la enzima transglutaminasa ACTIVA TG-K.....	95
Figura 27. Elaboración de la emulsión O/W con el equipo Silent Crusher.....	96
Figura 28. Incubación de las dobles emulsiones O/W/O a 37 °C /4 h.....	96
Figura 29. Microcápsulas al finalizar el tiempo de incubación.....	97
Figura 30. Microcápsulas después del secado por liofilización.....	97
Figura 31. Microcápsulas al final del estudio.....	98
Figura 32. Cromatografo de Gases Perkin Elmer.....	98
Figura 33. Liofilizador.....	99

RESUMEN

La presente investigación busco dar respuesta a la siguiente interrogante ¿Cómo influye el proceso de microencapsulación mediante doble emulsificación empleando aislado proteico de soya(APS) reticulado con transglutaminasa en el contenido de aceite de pescado de las microcápsulas y en las características de la misma? y en la búsqueda de la respuesta pretende dar a conocer una alternativa innovadora de cómo darle valor agregado al aceite de pescado nacional preservando su principio activo (omega-3).

Inicialmente, se elaboraron emulsiones (O/W) con adición de APS (2.5-10 %) a 12000 rpm durante 6 min y se evaluó su influencia en la estabilidad física de las emulsiones (EE), finalizada las pruebas se determinó que la EE se incrementó de 27.04 % a un 84.44 % al aumentar la cantidad del APS de 2.5 % a un 10 % respectivamente. Sobre esa base se incorporó la enzima transglutaminasa (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 %) para evaluar su efecto sobre la EE al cabo del cual se determinó que solo se puede incorporar 0.8 % de enzima a las emulsiones debido a que disminuyen la EE. En la siguiente etapa para formar una doble emulsión O/W/O se tomó 1 parte de la emulsión I (O/W) y se dispersó en 4 partes de aceite vegetal conteniendo 0.3 % de emulsificante Grinsted. En esta etapa se evaluó el efecto del tiempo (2, 5, 8 min) y velocidad (500 y 1000 rpm) de emulsificación en el contenido de FO microencapsulado. Llevado a cabo los experimentos se determinó que el FO encapsulado disminuyo al incrementar el tiempo y la velocidad de emulsificación obteniéndose un 20.26 % de EPA+DHA al emulsificar durante 2 min a una velocidad de 500 rpm. Finalmente, con el objetivo de incrementar el FO microencapsulado se ensayó relaciones Núcleo (N): MP (4:1; 1:1; 1:2). Al aplicar el análisis de varianza se determinó que al incrementar el núcleo se incrementa el FO microencapsulado (25.76 % EPA +DHA) sin embargo, las microcápsulas resultaron frágiles. Por lo que se optó por trabajar con la relación de 1:2 que presentó un contenido de aceite similar a la relación 1:1 de acuerdo a la prueba de Tukey pero con mejores características de color. Las microcápsulas se caracterizaron por presentar: 2.1 % de humedad, 0.137 de a_w , 24.6 % de grasa cruda, 21.3 % de EPA + DHA, 24.8 mg/100g de solubilidad y 43 % de eficiencia de encapsulación.

ABSTRACT

This study tried to find the answer the following question, ¿How does it affect the process of microencapsulation by double emulsification using soy protein isolate (aps) cross-linked with transglutaminase in content of microcapsules fish oil and the characteristics of the same?, and the search for the answer tries to present an innovative alternative of how to add value added to national fish oil preserving its active ingredient (omega-3).

Initially, emulsions (O / W) with addition of APS (2.5-10%) were prepared at 12,000 rpm for 6 minutes and were evaluated their influence on the physical stability of the emulsions (EE), after to finish the test was determined that EE increased from 27.04% to 84.44% by increasing the amount of 2.5% APS 10% respectively. On that basis the transglutaminase enzyme (0.2, 0.4, 0.6, 0.8%) was added to assess their effect on the EE after which it was determined that only can be incorporated 0.8% enzyme to emulsions because they decrease the EE.

In the next step to form a double emulsion O / W / O, 1 part from emulsion, I (O / W) was taken and dispersed in 4 parts of vegetable oil containing 0.3% of emulsifier Grinsted. At this step the effect of time (2, 5, 8 min) and speed (500 rpm and 1000) emulsification microencapsulated FO content was evaluated. Carried out the experiments, were determined that the encapsulated FO decreased by increasing the time and speed of a 20.26% yield emulsification EPA + DHA to emulsify for 2 minutes at a speed of 500 rpm.

Finally, with the objective of increase the microencapsulated FO was tested relationships Core: MP(4:1; 1:1; 1:2). In applying the analysis of variance it was determined that increasing the microencapsulated core FO (25.76% EPA + DHA), however, the microcapsules were fragile increases. So we chose to work with the ratio of 1: 2 which presented a content similar to oil ratio 1: 1 according to the Tukey test but with better color characteristics. The microcapsules were characterized by: 2.1% moisture, 0.137 aw, crude fat 24.6%, 21.3% EPA + DHA, 24.8 mg / 100g solubility and 43% encapsulation efficiency.

INTRODUCCIÓN

El aceite de pescado es una de las principales fuentes alimenticias de AGPI-CL de la serie ω -3, los mismos que según Valenzuela et al. (2014) producen cambios benéficos en la salud ejerciendo un efecto protector contra las enfermedades cardiovasculares así como en el desarrollo de la función cognitiva en infantes entre otros tantos beneficios. Aspecto que ha suscitado mucho interés para la utilización del aceite de pescado como fuente de AGPI-CL en la formulación y suplementación de alimentos, sin embargo su olor y sabor característico debido al deterioro oxidativo que sufre, limitan su incorporación directamente a la dieta, siendo este uno de los más grandes desafíos que deben afrontarse (Nelson, 1991; Flores, 2006). En ese sentido la microencapsulación se presenta como una alternativa innovadora para superar las características adversas de las aplicaciones tecnológicas del aceite de pescado, mejorando su estabilidad en almacenamiento y facilitando su empleo en procesos alimentarios.

Este campo es de mucho interés porque promueve el mejor aprovechamiento del aceite de pescado nacional destinado a consumo humano y sienta un precedente para generar nuevas investigaciones en el área que finalmente conlleven a generar un proceso tecnológico de microencapsulación del aceite de pescado nacional mediante doble emulsificación u otros métodos. Aspecto que constituye una oportunidad para el país que es uno de los principales productores del mismo.

Dentro de las limitaciones más saltante se destaca la poca información disponible sobre la microencapsulación del aceite de pescado mediante doble emulsificación empleando aislado proteico de soya reticulado con transglutaminasa, siendo este método poco conocido en comparación a la microencapsulación por atomización, que es la más estudiada.

La hipótesis planteada para este fin fue: El proceso de microencapsulación mediante doble emulsificación influye en el contenido de aceite de pescado de las microcápsulas y en las características de las mismas.

Teniendo en consideración lo expuesto esta investigación tuvo como objetivo general (O.G) y como objetivos específicos (O.E):

O.G: Obtener microcápsulas aceite de pescado de anchoveta mediante doble emulsificación empleando aislado proteico de soya reticulado con transglutaminasa como material de pared y caracterizar las microcápsulas obtenidas.

O.E.1: Determinar las características fisicoquímicas del aceite desodorizado de anchoveta;

O.E.2: Evaluar el efecto del aislado proteico de soya y de la enzima en la estabilidad física de la emulsión I (O/W) mediante pruebas aceleradas; **O.E.3:** Evaluar el efecto de las condiciones de emulsificación de la emulsión II (O/W/O) en el contenido de aceite de pescado de las

microcápsulas; **O.E.4:** Determinar la influencia de la proporción del aceite de pescado: Material de pared en el contenido de aceite de pescado y en las características de las

microcápsulas; **O.E.5:** Caracterizar las microcápsulas obtenidas.

Las variables independientes con sus respectivos indicadores dentro del paréntesis fueron: Porcentaje de aislado proteico de soya (2.5, 5.0, 7.5, 10 %), Velocidad de emulsificación (500, 1000 rpm) Tiempo de emulsificación (2, 5, 8 min), Relación aceite de pescado: Aislado proteico de soya (4:1, 1:1, 1:2).

Las variables dependientes con sus respectivos indicadores dentro del paréntesis fueron: Estabilidad de la Emulsión I (ml agua separada), Aceite de pescado microencapsulado después de la doble emulsificación (% EPA + DHA), Incremento del aceite de pescado microencapsulado (% EPA + DHA).

La muestra estuvo compuesta por un litro de aceite de anchoveta el cual provino de un lote (población) de 100 L aproximadamente.

CAPITULO I
MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

Heinzelmann & Franke (1999) utilizaron la liofilización de emulsiones para microencapsular el aceite de pescado con el objetivo de mejorar su estabilidad oxidativa. Las emulsiones compuestas por 10% de aceite de pescado, 10% de caseinato de sodio, 10% de carbohidratos y 70% de agua, se secaron en un liofilizador durante 36 h a 48 h. El procedimiento utilizado permitió obtener microcápsulas con una buena estabilidad a la oxidación. Se encontró que la estabilidad estuvo influenciada principalmente por el proceso de congelación y el carbohidrato de encapsulación utilizado.

Cho et al. (2003) encapsularon aceite de pescado por un proceso de gelación enzimática usando proteína reticulada con transglutaminasa. Este estudio se realizó con el objetivo de evaluar diferentes fuentes proteicas como materiales de pared y 3 métodos de gelación incluyendo la gelificación enzimática, gelación con calor y una combinación de calor y enzima sobre las propiedades fisicoquímicas y microestructurales de las microcápsulas. Las microcápsulas elaboradas mediante doble emulsificación empleando una relación núcleo: material de pared de 1:2 respectivamente, mostraron una alta estabilidad contra el oxígeno y una baja solubilidad en agua, que posteriormente dio lugar a una sostenida liberación del aceite de pescado.

Kolanowski et al. (2004) investigaron la estabilización de aceite de pescado mediante microencapsulación con celulosa modificada con el objetivo de determinar la capacidad de la celulosa modificada para actuar como material de pared en la microencapsulación del aceite de pescado. Las microcápsulas de aceite de pescado se produjeron por atomización de las emulsiones homogenizadas conteniendo celulosa modificada y maltodextrinas en una relación material de pared: núcleo de 1.5:1 respectivamente. El nivel de retención de aceite fue de 98.5 % (400 g/Kg), a mayor nivel de retención las microcápsulas presentaron daño estructural. Este estudio concluyó indicando que el uso de celulosa modificada como material de recubrimiento para la preparación de microcápsulas de aceite de pescado secadas por atomización mejora la estabilidad y la concentración de aceite de pescado.

Gan et al. (2007) Evaluaron la transglutaminasa microbiana y ribosa como agentes de entrecruzamiento de microcápsulas a base de aislado proteico de soya conteniendo aceite de pescado. Las microcápsulas se obtuvieron mediante un método modificado de coacervación seguido de un tratamiento de entrecruzamiento con transglutaminasa y azúcares reductores. El procedimiento rindió 95–98% de microcápsulas conteniendo 0.5–0.6 g de aceite de pescado/g de capsulas. Cabe precisar que las microcápsulas presentaron baja solubilidad proteica por efecto del entrecruzamiento doble con transglutaminasa y azúcares reductores

Gharsallaoui et al. (2007) realizaron una revisión de las aplicaciones de la atomización en la microencapsulación de ingredientes alimenticios. La revisión presenta información de la ingeniería de procesos que se consideran útiles para la operación de microencapsulación. Además, un resumen de los materiales de pared más utilizados y de los principales compuestos a alimenticios encapsulados. La revisión menciona que la atomización se ha usado por décadas para encapsular saborizantes, lípidos y carotenoides. En este estudio resalta la importancia de la selección adecuada de los materiales de pared y de la optimización de las condiciones de operación para conseguir buenos resultados en rendimiento y estabilidad de los microencapsulados.

Calvo et al.(2012) estudiaron la influencia de la microencapsulación en los parámetros de calidad y la vida útil del aceite de oliva extra virgen encapsulado en presencia de BHT y diferentes componentes de la pared de la cápsula, con el objetivo de evaluar la influencia de la microencapsulación sobre la estabilidad oxidativa para establecer las condiciones más adecuadas y evitar la alteración del aceite de oliva extra-virgen. En este estudio se obtuvo un rendimiento de encapsulación de $99,79 \pm 0,51\%$ usando maltodextrina, carboximetilcelulosa y lecitina como agentes de encapsulación en una relación de material pared: aceite (1: 1,5). De acuerdo al estudio de estabilidad oxidativa se concluyó que la presencia de proteína como constituyente del material de pared de la microcápsula incremento la vida útil de la microcápsula de aceite de oliva.

1.2. Aceite de pescado fuente de ácidos grasos

El aceite de pescado es considerado un subproducto de la industria pesquera, el cual es obtenido durante la producción de harina de pescado especialmente de aquellos peces capturados en mar abierto identificados como azules o grasos. En Perú y Chile generalmente se emplean para el fin anchoveta, caballa y sardina (Shahidi & Finley, 2001).

En los últimos 10 años considerados hasta el año 2012 el Perú fue el principal productor de aceite de pescado del mundo (Tabla 01), siendo la sardina y la anchoveta las especies pesqueras que han sostenido y sostienen la actividad. A nivel mundial el 32.10 % de la producción de aceite de pescado proviene de la especie anchoveta (Bimbo, 2013).

Tabla 01. Producción mundial de aceite de pescado en los principales países, promedio de los últimos 10 años (hasta el 2012).

	Volumen (1000 t)	Proporción de la producción Global (%)
Perú	274.25	27.00
Escandinavia	207.58	20.44
Chile	161.74	15.93
Japón	112.49	11.08
USA	76.68	7.55
EU 25*	48.32	4.76
Marruecos	30.31	2.98
México	18.65	1.84
Panamá	8.81	0.87
Ecuador	5.78	0.57
South África	5.55	0.55
Canadá	5.15	0.51
Otros	86.86	5.93
Total	1042.17	

*Dinamarca y Suecia fueron retirados de la UE 27 y se incluyen en los países escandinavos

Fuente: Adaptado de Bimbo (2013)

El proceso de obtención de aceite de pescado puede resumirse en dos etapas básicas: En la primera el pescado entero o subproductos del pescado son sometidos a cocción y en la segunda el pescado cocinado es sometido a fuerzas de compresión para extraer aceite crudo; El aceite crudo obtenido es de baja calidad por lo cual es sometido procesos de refinación adicional que tienen como objetivo extraer del aceite las impurezas y todos aquellos compuestos indeseables, permitiendo de esta forma obtener un aceite comestible (aspecto limpio, sabor suave, color claro).

Aproximadamente de 100 kg de pescado fresco se pueden producir en promedio 10 kg de aceite y 20 kg de harina de pescado claro está que va a depender del contenido graso del pescado el cual no debe ser inferior al 3% en peso del pescado crudo con el fin de ser económicamente viable. Alrededor del 75% del pescado capturado se clasifican como pescado graso, que contiene entre 5 a 25 % de lípidos (Seifried, 2010).

Antiguamente el aceite de pescado se consideró un desecho resultante de la obtención de la harina de pescado que fue el producto de interés comercial debido a su elevado contenido de proteína de buena calidad. En efecto, inicialmente las plantas productoras de harina de pescado botaban al mar el aceite producido durante el prensado del pescado. Posteriormente, debido a los incipientes reclamos ambientales y ecológicos, el aceite se enterraba en enormes pozos en el desierto. Esporádicamente se le utilizaba como combustible en las calderas de generación de vapor de las mismas plantas de harina.

Según Valenzuela et al. (2012) en los años sesenta comenzó a utilizarse el aceite de pescado hidrogenado para la fabricación de mantecas, margarinas y también en forma no hidrogenada en la fabricación de pinturas y barnices. En esa época el aceite de pescado comenzó a ser valorado por sus amplias aplicaciones industriales, su bajo precio y sus bondades tecnológicas (poder secante, alta reactividad química, entre otros). Así como también en la preparación de alimentos balanceados para animales (aves y cerdos) se comenzó a utilizar cada vez más aceite de pescado, ya que se complementa muy bien el aporte proteico de la harina con la alta densidad energética del aceite.

Actualmente el aceite de pescado es utilizado por la industria acuícola, en la que ha alcanzado altos niveles de producción en países como Noruega, Chile, Canadá, Escocia, entre los países con mayor actividad. Sin embargo, tras el descubrimiento y concientización de la importancia de las propiedades benéficas para la salud de los ácidos grasos ω -3 que hay en el aceite ha transformado al aceite de pescado en un producto de alto valor comercial y de creciente demanda por la industria nutracéuticos (Valenzuela et al., 2012).

Los aceites en general son triglicéridos que se componen de ácidos grasos. Los ácidos grasos son compuestos orgánicos formados por una cadena hidrocarbonada lineal de diferente longitud en cuyo extremo se encuentra un grupo carboxilo (COOH), que normalmente se encuentra enlazada con una molécula de glicerol formando un acilglicérido (mono, di o triglicérido).

Según Rubio (2011) los ácidos grasos se dividen en dos grandes grupos (Tabla 02): ácidos grasos saturados (AGS) y ácidos grasos insaturados (AGI). Los insaturados a su vez pueden ser monoinsaturados (AGMI) o poliinsaturados (AGPI); Estos AGI dependiendo de la posición del doble enlace, pueden clasificarse principalmente en tres familias: Ácidos grasos ω -3 (primer doble enlace en el carbono 3), ácidos grasos ω -6 (primer doble enlace en el carbono 6) y ácidos grasos ω -9 (primer doble enlace en el carbono 9).

La composición del aceite de pescado en cuanto a ácidos grasos es variable y compleja, presenta ácidos grasos de longitud de cadena que varían de 14 a 24 átomos de carbono con alta predominancia de los AGPI de hasta seis dobles enlaces. Según Lee & Ying (2008); Sahena et al. (2009) el aceite de pescado es la fuente más importante de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3 (AGPI-CL), como el ácido eicosapentaenoico (EPA, C20: 5 ω -3) y el ácido docosahexaenoico (DHA, C22: 6 ω -3). Estos ácidos grasos son altamente valorados por los demostrados efectos benéficos en la salud y en la nutrición que produce su consumo.

Tabla 02. Ácidos grasos comunes en los alimentos

Formula	Nombre Común	Tipo		
C4:0	Butírico	AGS		
C6:0	Caproico			
C8:0	Caprílico			
C10:0	Cáprico			
C11:0	Undecanoico			
C12:0	Láurico			
C13:0	Tridecanoico			
C14:0	Mirístico			
C15:0	Pentadecanoico			
C16:0	Palmítico			
C17:0	Heptadecaenoico			
C18:0	Estearico			
C20:0	Araquídico			
C21:0	Eneicosaenoico			
C22:0	Behenico			
C23:0	Tricosanoico			
C24:0	Lignocérico			
C18:1	Vaccenico	ω -7	AGMI	AGI
C18:1	Oleico	ω -9		
C20:1	Eicosaenoico			
C22:1	Erucico			
C24:1	Nervónico	ω -11		
C22:1	Cetoleico			
C18:2	Linoleico	ω -6	AGPI	
C18:3	g-linolénico			
C20:3	Eicosatrienoico			
C20:4	Araquidónico(AA)	ω -3		
C18:3	a-linolénico			
C18:4	Estearidónico			
C20:3	Eicosatrienoico			
C20:5	Eicosapentaenoico(EPA)	Clupadónico		
C22:5				
C22:6	Docosahexaenoico(DHA)			

Fuente: Adaptado de Rubio(2011)

El contenido de EPA y DHA en el aceite de pescado depende de numerosos factores tales como la especie, origen, temporada de captura y alimentación de los peces. Es preciso destacar que el fitoplancton y las algas unicelulares son la principal fuente de AGPI-CL en los peces, los cuales se acumulan por la ingesta (Guevara, 2009). Por lo tanto, la cantidad y composición del aceite de pescado presente en una especie determinada pueden fluctuar dependiendo de la disponibilidad de fitoplancton.

Por lo cual la composición en ácidos grasos del aceite de pescado depende en gran medida de las especies utilizadas para producir el aceite. Un breve resumen de la composición del aceite de pescado de diversas especies ricas en EPA y DHA se presenta en la Tabla 03

Tabla 03. Contenidos de EPA y DHA en aceite de pescado de diferentes especie

ESPECIES	EPA(%)	DHA(%)	EPA+DHA(%)
Anchoveta	18.7	9.2	27.9
	22*	9*	31*
Caballa	14.1	16.3	30.4
Jurel	15.1	12.9	28.0
Machete	22.8	8.1	30.7
Merluza	13.8	25.7	39.7
Sardina	19.7	5.3	25.0
Atún*	6.0	22.0	28.0
Arenque*	14.0	8.0	22.0
Salmon*	7.0	11.0	18.0

Fuente: Adaptado de Flores (2006) y * Seifried (2010).

Por otra parte una fuente alternativa prometedora como fuente de aceite lo constituyen los microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) incluyendo algas marinas (Lee & Ying, 2008). El aceite de origen microbiano representan una fuente emergente de EPA y DHA que ofrece ventajas frente al aceite de pescado ya que las células microbianas pueden ser cultivadas en birreactores bajo condiciones controladas, evitando así problemas de contaminación ambiental como los bifenilos policlorados(PCB), metales pesados y dioxinas(Seifried,2010). Por ejemplo el mercado de biociencias a producido aceites ω -3 a partir de microalgas ricos en DHA (40%) al que se le ha concedido el reconocimiento como GRAS.

Así mismo la posibilidad de producir ácidos grasos ω -3 en plantas transgénicas utilizando la ingeniería genética también se ha explorado como una alternativa sostenible y limpia para el aceite de pescado (Lee & Ying, 2008).

1.2.1. Ácidos grasos esenciales en nuestra dieta.

Los lípidos han sido considerados tradicionalmente como fuente de energía metabólica, sin embargo hoy se sabe que ellos aportan algunos ácidos grasos específicos que son indispensables para la vida.

Los ácidos grasos ω -3 (α -linolénico C18:3) al igual que los ácidos grasos ω -6 (linoleico C18:2) se consideran esenciales para la salud humana en vista de que no pueden ser biosintetizados, el cuerpo humano no puede producir ácidos grasos con doble enlace C=C en la posición n-3 o n-6 de la cadena hidrocarbonada de manera que deben ser incorporados de la dieta (Ruxton, 2004). La biosíntesis de AGPI se lleva a cabo en órganos o tejidos especializados como el hígado, aunque también en el intestino, cerebro, en la retina, y puede estar limitada en algunas etapas del desarrollo o en algunas patologías (McCowen & Bistrrian, 2005). La familia de ácidos grasos ω -3 y ω -6 tienen como precursores a los ácidos alfa linolénico (AAL C18:3, ω -3) y ácido linoleico (AL C18:2, ω -6) respectivamente. La Figura 01 muestra el metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados. Los AGPI ω -3 y ω -6 utilizan el mismo conjunto de enzimas en su vía metabólica y pueden competir entre sí, el alto nivel del AL en el organismo debido al consumo de aceites vegetales podría conllevar a una baja biosíntesis del AAL en EPA y DHA, es por esta razón que algunos autores consideran a estos ácidos ω -3 como esenciales también, aunque esta designación no es aceptado del todo.

Los peces y los humanos tienen una habilidad muy limitada para convertir en forma eficiente el AAL en EPA y DHA porque sólo hay una conversión de alrededor de 5% de ALA a EPA y menos de 0.5% a DHA en el caso de humanos (Guevara, 2009).

El metabolismo enzimático de los ácidos dihomo- γ -linolénico (20:3 ω -6), Ácido araquidónico (20:4 ω -6) y EPA (20:5 ω -3) producen una amplia variedad de productos

oxidados a los que, en conjunto, se denomina eicosanoides. Estos eicosanoides son mediadores potentes e importantes que intervienen en muchos procesos biológicos y desempeñan un papel esencial en las interacciones fisiológicas de coordinación entre las células.

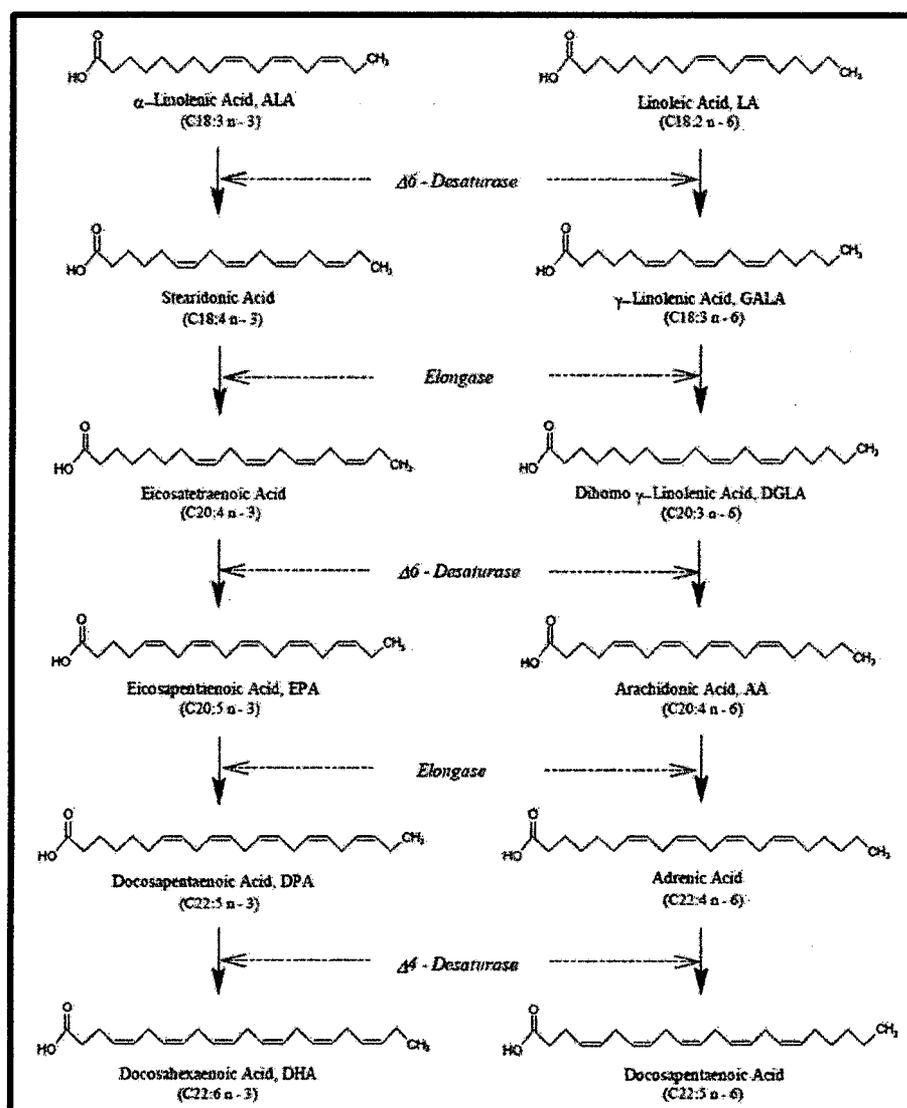


Figura 01. Vías metabólicas para la síntesis de ácidos grasos ω -3 y ω -6.
Fuente: Simopoulos (1991) citado por Rubio (2011)

Aunque el descubrimiento de los eicosanoides como productos del metabolismo de los ácidos grasos ω -6 y ω -3 (Tabla 04) es relativamente reciente, es probable que muchos de

los signos de la deficiencia de ácidos grasos esenciales se deban a alteraciones del metabolismo de los eicosanoides(Ziegler,1998).

Tabla 04. Eicosanoides formados a partir de los acidos grasos ω -3 y ω -6 y efectos.

AGPI	Eicosanoides	Efecto
C20:5 ω -3 Acido eicosapentaenoico	Tromboxano A ₃ (TBXA ₃) Prostaciclina I ₃ (PGI ₃)	Efecto debil sobre la agregacion plaquetaria: Estrechamiento de los conductos sanguineos. Inhibicion de la agregacion plaquetaria.
C20:4 ω -6 Acido araquidonico	Tromboxano A ₂ (TBXA ₂) Prostaciclina I ₂ (PGI ₂)	Fuerte estimulacion de la agregacion plaquetaria. Fuerte estrechamiento de los conductos sanguineos. Inhibicion de la agregacion plaquetaria; relajacion de los conductos sanguineos

Fuente: Shahidi (2000) citado por Flores (2006)

La Organización para Agricultura y Alimentación(FAO) y la Organización Mundial de la Salud(OMS) en su informe del año 2003 sobre dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas recomiendan una ingesta de grasas saturadas menor al 10 % y de grasa monoinsaturada del 15 al 30% de la energía total. Además, los ácidos grasos poliinsaturados totales han de representar un 6-10% y los ácidos grasos ω -3 en particular un 1-2% de la energía total(Carrero et al.,2005).

Los ácidos grasos omega-3 han sido asociados con multiples beneficios a la salud relacionados con el corazón, cerebro, ojos, articulaciones, estado de ánimo, comportamiento, cáncer, diabetes, desórdenes de la piel, embarazo y la lactancia(Michelsen,2001; Muggli,2001).

El interés e importancia en los ácidos grasos omega-3 en la alimentacion se ha originado principalmente por la sensibilización de los consumidores sobre los beneficios de los ácidos grasos omega-3 aspecto que ha incrementado la demanda por el consumo de alimentos enriquecidos con ácidos grasos omega-3 que tengan apropiados atributos nutricionales, sensoriales y funcionales.

Las principales organizaciones científicas de la salud y nutrición recomiendan que la ingesta AGPI-LC deba incrementarse por el consumo de dos a tres veces por semana de pescado graso o por la suplementación. La Sociedad Internacional de Estudio de los Ácidos Grasos y Lípidos (ISSFAL), Asociación Americana del Corazón (AHA), Instituto de Medicina (IOM) y la Fundación Británica de Nutrición (BNF) hacen recomendaciones sobre la ingesta diaria de ácidos grasos omega-3. La ingesta diaria mínima recomendada para adultos es aproximadamente 500 mg de DHA(C22:6 ω -3) combinado con EPA(C20:5 ω -3) para la salud cardiovascular (Sanguansri & Augustin,2007).

En el año 2000, la Food and Drug Administration (FDA) anunció que una buena salud demanda de suplementos dietéticos que contengan EPA y DHA para reducir el riesgo de enfermedades del corazón. La FDA recomienda a los consumidores no exceder de un total de 3 gramos por día de EPA y DHA con no más de 2 gramos por día de un suplemento dietético(Sanguansri & Augustin,2007; Carrero et al.,2005; Nissim,2008).

En los Estados Unidos(EE.UU.) para obtener una declaración de propiedades saludables los alimentos deben contener un mínimo de 125 mg de ácidos grasos omega-3 de cadena larga por porción y ser parte de un alimento que es bajo en grasa saturada, grasa trans y colesterol. En Australia y Nueva Zelanda, se ha permitido una declaración nutricional para los ácidos grasos omega-3 si el alimento contiene un mínimo de 30 mg de EPA y DHA en total ó 200 mg del AAL(C18: 3 ω -3) por porción, cuando un alimento es bajo en grasas saturadas y ácidos grasos trans(Sanguansri & Augustin,2007). La evidencia acumulada sobre los beneficios de los ácidos grasos omega-3, la creciente sensibilización de los consumidores y los avances en el procesamiento de AGPI están haciendo los alimentos enriquecidos una realidad en el mercado.

Para un correcto funcionamiento del organismo se tiene que establecer la relación adecuada entre los ácidos grasos omega-3 y omega-6. Actualmente, en las dietas occidentales existe una proporción demasiado elevada en la ingestión de omega-6 que suele oscilar entre un 10:1 a 20:1, cuando la proporción adecuada se situaría en un 3:1, es decir tres partes de omega-6 por una parte de omega-3. Esta enorme superioridad en la ingesta de

omega-6 frente a la de omega-3 puede ser responsable de algunas enfermedades cardiovasculares, diabetes, ciertas depresiones, etc. La solución consiste en aumentar el consumo de alimentos que contengan más omega-3 o tomar suplementos de este componente y disminuir aquellos alimentos muy ricos en omega-6 (Torrelo, 2010)

1.2.2. Beneficios a la salud de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga

❖ Ácidos grasos omega-3 y desarrollo infantil

Los ácidos grasos omega-3 son necesarios para una concepción normal, crecimiento y desarrollo del embrión. Durante el primer trimestre, la madre transfiere al feto a través de la placenta aproximadamente 50 a 60 mg/día de DHA. Se han encontrado altas concentraciones de DHA en las membranas del cerebro y de la retina, especialmente en los fotorreceptores, en base a lo cual se supone que juega un papel muy importante en la función visual y cognitiva (Jensen, 2006). La deficiencia de DHA se han asociado con problemas de visión y retardo en el desarrollo cognitivo (Piñeiro, 2009).

De acuerdo a lo anteriormente mencionado se evidencia la necesidad de establecer una adecuada ingesta de AGPI desde las primeras etapas del embarazo y durante la lactancia con la finalidad de lograr una buena transferencia de ácidos grasos al feto a través de la placenta y al recién nacido a través de la leche humana.

❖ Ácidos grasos omega-3 y la salud cardiovascular

De acuerdo a la AHA así como de diversas organizaciones internacionales, el consumo de ácidos grasos ω -3 puede beneficiar favorablemente a la salud cardiovascular de las personas sanas y de aquellas con alto riesgo de sufrir ECV (Domingo, 2007).

El mecanismo exacto mediante el cual los ácidos grasos ω -3 ejercen su efecto protector no está del todo claro. Al parecer la capacidad tiene que ver con las propiedades de los ácidos grasos ω -3 para influenciar: la coagulación sanguínea y la

trombosis, el perfil de los lípidos plasmáticos, la presión sanguínea, la arritmia y la inflamación. Los efectos ateroprotectores derivados de la ingesta de AGPI ω -3 provienen principalmente de su incorporación a los fosfolípidos de las membranas de las células, sustituyendo parcialmente el ácido araquidónico como sustrato inicial para la producción de eicosanoides (Carrero,2005).

Cuando las células vasculares sufren algún tipo de daño, se desencadena el proceso de agregación plaquetaria. Los intermediarios derivados del metabolismo de los AGPI-CL, ω -3 son menos protrombóticos y vasoconstrictores que los derivados procedentes del araquidónico (ω -6). El contenido en ácidos grasos de las plaquetas origina la producción de tromboxano A₂ a partir de la familia ω -6, o de tromboxano A₃ a partir de la familia ω -3. Este último posee un efecto proagregante menor que el tromboxano A₂, reduciendo, por tanto, la agregación plaquetaria y la trombosis (Connor,2000)

Por otra parte, un músculo cardíaco enfermo es susceptible de sufrir irregularidades en la actividad eléctrica (arritmias), que en muchas ocasiones son la causa de muerte súbita cardíaca. La proporción de ácidos grasos ω -3/ ω -6 en el músculo cardíaco parece estar relacionada con el riesgo de muerte súbita cardíaca. Se ha sugerido que la ingesta moderada de AGPI-CL, ω -3 puede reducir el riesgo de paro cardíaco como consecuencia del efecto regulador que estos ácidos grasos ejercen sobre las propiedades eléctricas del miocardio, disminuyendo por tanto la susceptibilidad a las arritmias ventriculares y, por consiguiente, el riesgo de muerte súbita(Siscovick et al.,1996; De Deckere et al.,1998)

Por otro lado ácidos grasos ω -3 no afectan el colesterol total. No obstante, incrementan el colesterol LDL (lipoproteínas de baja densidad) y reducen los triglicéridos(25 a 30%). El colesterol LDL tiende a elevarse en caso de hipertrigliceridemia y a reducirse y no modificarse en sujetos normales alimentados con fuentes concentradas de ω -3(Flores, 2006).

En la actualidad se afirma que el consumo de pescados y de aceites de pescados ricos en EPA y DHA reducirá los niveles de colesterol, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de triglicéridos, con la consiguiente disminución de las tasas de mortalidad cardiaca súbita.

❖ **Ácidos grasos omega-3 y las enfermedades inflamatorias.**

Los trastornos inflamatorios están asociados con enfermedades del corazón, artritis reumatoide, enfermedades intestinales y el asma. Los ácidos grasos EPA y DHA están relacionados con la disminución de problemas inflamatorios en numerosas enfermedades. Los mecanismos antiinflamatorios involucran la capacidad del EPA y DHA para modificar la proporción de ω -6 a ω -3, disminuyendo de ese modo la formación eicosanoides que causan altos niveles de respuesta inflamatoria. Las altas cantidades de ácido araquidónico en las membranas celulares se traducen en un aumento de la producción de leucotrienos, prostaglandinas tromboxano A₂ y por la lipooxigenasa (LOX) y la ciclooxigenasa (COX) que conllevan a una respuesta inflamatoria elevada (Flores, 2006).

El EPA y DHA de la ingesta, desplazan al AA de las membranas celulares. Las Prostaglandinas y leucotrienos formados a partir del EPA y DHA por las enzimas lipoxigenasa y ciclooxigenasa son diferentes estructuralmente y menos bioactivos, por tanto, originan a una menor respuesta inflamatoria. (Simopoulos, 2002; Ismail, 2005).

Los AGPI(ω -3) se incorporan en las membranas celulares y aunque el EPA no puede reemplazar al ácido araquidónico en la bicapa lipídica sí puede actuar como un sustrato de las ciclooxigenasas y la lipooxigenasa, reduciendo la síntesis y las concentraciones plasmáticas de TX y prostaciclina de la serie 2 y los leucotrienos de la serie 4 que presentan acciones proagregantes, vasoconstrictoras y proinflamatorias.

1.2.3. Desafíos de la utilización del aceite de pescado

La oxidación lipídica es el principal factor que reduce la calidad y aceptabilidad de los productos pesqueros con alto tenor graso y constituye un verdadero problema para los tecnólogos alimentarios. Los AGPI-CL son los principales sustratos del enranciamiento autooxidativo debido a que los dobles enlaces se convierten en centros activos que reaccionan velozmente con el oxígeno, la velocidad de reacción se ve potenciada por el grado de insaturación del ácido graso (Kamal-Eldin, 2003)

Según Belitz et al. (2009) el primer paso en la oxidación, es la sustracción de un átomo de hidrogeno de un ácido graso, la sustracción del hidrogeno tiene lugar preferentemente en posiciones donde la energía de disociación del enlace es baja, en la Figura 02 se indican las energías necesarias para sustraer un átomo de hidrogeno de los diferentes grupos existentes en un ácido graso.

	kJ/mol
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \text{ ---} \end{array}$	422
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \text{ --- CH ---} \end{array}$	410
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{--- CH --- CH = CH} \end{array}$	322
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{--- CH = CH --- CH --- CH = CH ---} \end{array}$	272

Figura 02. Energía para disociar un átomo de hidrogeno

Fuente: Belitz et al.(2009)

La oxidación del aceite de pescado se produce por medio de una reacción en cadena de radicales libres en la que se distinguen tres etapas (Figura 03): iniciación (1), propagación (2) y terminación (3). Durante un cierto tiempo la oxidación del sustrato es constante y lenta. A este periodo se le conoce como tiempo de inducción periodo tras el cual se da una exponencial absorción de oxígeno comúnmente conocido como la etapa de propagación.

Los peróxidos son los productos primarios de la oxidación, pero estos compuestos son inestables y sufren una degradación adicional para dar lugar a compuestos secundarios de la oxidación que se caracterizan por ser volátiles y no volátiles (Kamal-Eldin, 2003, Damodaran et al.,2008).

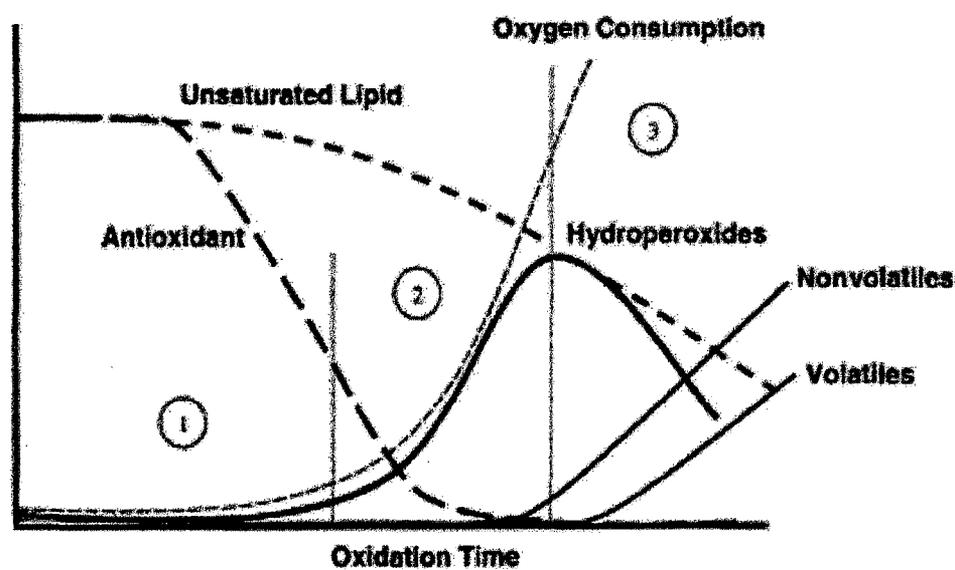


Figura 03. Cinética de autooxidación de los AGPI.

Fuente: Labuza (1971) citado por Kamal-Eldin (2003).

La velocidad de oxidación se incrementa con un aumento en la temperatura, con la exposición al oxígeno del aire, presencia de luz y contacto con metales prooxidantes, por lo cual se debe reducir al mínimo la exposición a estos factores.

Por otro lado la oxidación provoca el desarrollo de sabores desagradables a rancio y la degradación de los nutrientes esenciales, que afectan la calidad sensorial, nutricional y la estabilidad en anaquel del aceite de pescado y de los alimentos enriquecidos con aceite de pescado. Además, la oxidación induce la formación de potentes compuestos tóxicos y hace que los aceites se vuelvan perjudiciales para la salud humana. Otro problema asociado con el aceite de pescado es su inaceptable olor y sabor a pescado. El simple hecho de adicionar aceite de pescado a los productos alimenticios genera un perfil sensorial que convierte al

producto en inaceptable, incluso trabajando con aceite que no está oxidado (Lee & Ying, 2008).

Para estabilizar el aceite de pescado frente al deterioro oxidativo, se le han añadido antioxidantes sintéticos y/o naturales durante el proceso de obtención. Los antioxidantes sintéticos incluyen Hydroxylanisole Butilado (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) y Butilhidroquinona Terciaria (TBHQ) utilizados solos o en combinación. Los antioxidantes naturales, tales como tocoferoles, palmitato de ascorbilo, lecitina, carotenoides y los extractos de romero, se han convertido en los preferidos porque son naturales y tienen menos restricciones en las normas y reglamentos alimentarios. La eficacia de un antioxidante puede variar con el origen del aceite de pescado (Kulas & Ackman, 2003 Citados por Lee & Ying, 2008)

Es preciso señalar que el aceite es tan propenso a la oxidación que incluso con antioxidantes, el aceite aún se puede oxidar si se expone al aire, la luz o el calor durante un cierto período de tiempo. Los antioxidantes se consumen. Por lo tanto, es esencial eliminar el oxígeno, la luz y el calor en los aceites de pescado, almacenándolos en refrigeración bajo condiciones de oscuridad y en una atmósfera de nitrógeno (Shahidi & Kim, 2002 citados por Lee & Ying, 2008).

Sin embargo, el factor más importante en la producción de un aceite de pescado de buena calidad, es la calidad de materia prima de pescado al inicio del proceso. No debería haber sido contaminado o dañado y estar en condiciones refrigeradas a fin de minimizar la posible degradación microbiana, enzimática y la oxidación de los tejidos grasos del pescado.

1.3. Proceso de microencapsulación

La tecnología de microencapsulación es un campo de interés en una amplia gama de áreas científicas e industriales que van desde la obtención de productos farmacéuticos, químicos, alimentarios y productos para la agricultura. Como tecnología se caracteriza por ser versátil y de rápida expansión que ofrece numerosas aplicaciones beneficiosas a la

industria, así lo demuestra el creciente número de trabajos científicos publicados (Pasos & Ribeiro, 2010; Gouin, 2004).

1.3.1. Microencapsulación

La microencapsulación ha sido usada por la industria alimentaria desde hace más de 70 años. Aproximadamente entre los años 1930 y 1940 los procesos de encapsulación fueron desarrollados por la National Cash Register para la aplicación comercial de un tinte a partir de gelatina como agente encapsulante mediante un proceso de coacervación. Pese a su larga historia esta tecnología ha permanecido prácticamente sin sofisticar en comparación con otros campos de aplicación (Yañez et al., 2002).

Según Gouin (2004) la microencapsulación se ha utilizado en el pasado para enmascarar el sabor desagradable de ciertos ingredientes y también para convertir los líquidos a sólidos. Sin embargo, en los últimos años, el concepto de liberación controlada del ingrediente encapsulado en el lugar correcto y el momento adecuado se ha vuelto cada vez más importante.

En la actualidad la microencapsulación se define como un proceso de recubrimiento de materiales sólidos, líquidos o gaseosos en capsulas extremadamente pequeñas las que pueden liberar su contenido en forma controlada y en condiciones específicas (Desai & Park, 2005; Augustin et al., 2001; Passos & Ribeiro, 2010; Drusch et al., 2012; Fang & Bhandari, 2012 ; Sobel et al., 2014). Así mismo, Lozano (2009) menciona que la microencapsulación es el proceso por el cual partículas individuales o gotas de un material activo se rodean por una cubierta para producir capsulas en el rango de micras a milímetros, conocidas como microcápsulas.

En tecnología de alimentos se podría definir la microencapsulación como un proceso mediante el cual ciertas sustancias bioactivas (sabores, probióticos, vitaminas, antioxidantes, aceites esenciales, etc.) son atrapadas en una matriz o sistema pared con el objetivo de impedir su pérdida, para protegerlos de la reacción con otros compuestos

presentes en el alimento o para impedir que sufran reacciones de oxidación debido a la luz o al oxígeno. Siendo una ventaja adicional que el compuesto encapsulado se liberará gradualmente de la capsula que lo mantiene englobado o atrapado obteniéndose así productos alimenticios con mejores características sensoriales y nutricionales, solucionando de esta forma las limitaciones de empleo de los ingredientes alimenticios. Según Yáñez et al. (2002) el término microencapsulación se utiliza en la industria alimentaria o farmacéutica cuando se encapsulan sustancias de bajo peso molecular o en pequeñas cantidades, los dos términos encapsulación y microencapsulación, se usan indistintamente.

La sustancia que es encapsulada puede llamarse núcleo (core), agente activo, fase interna. La sustancia que está encapsulando puede llamarse cobertura, encapsulante, membrana, cáscara, material de pared, fase externa o matriz (Sobel et al., 2014; Rahman, 2007)

Las microcápsulas pueden variar de tamaño desde submicrómetros (nanocápsulas) hasta varios milímetros y tener multitud de formas diferentes, dependiendo de los materiales y métodos empleados para prepararlas (Rahman, 2007).

Según Hae-Soo (2014) basado en el tamaño de la cápsula, el nombre y la tecnología de la encapsulación cambian: Las cápsulas que varían de 3 a 800 μm de tamaño se llaman microcápsulas y la tecnología se denomina tecnología de microencapsulación (Ahn et al., 2010 citado por Hae-Soo, 2014). Si el tamaño de partícula varía de 10 a 1000 nm, estas se llaman nanoesferas y la tecnología se denomina tecnología de nanoencapsulación (López et al., 2006 citados por Hae-Soo, 2014). Según Kuang et al. (2010); Zuidam & Nedovic' (2010) la morfología de las microcápsulas se puede dividir en dos categorías generales (Figura 04): El tipo depósito (el núcleo está rodeado por una capa de material encapsulante) y el de tipo matriz (el núcleo está atrapado dentro de una red continua del material encapsulante).

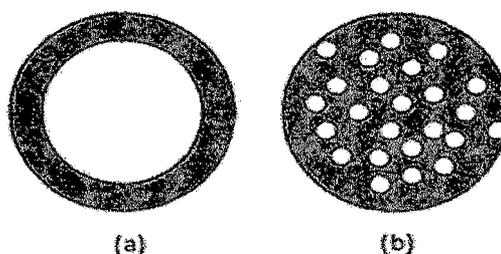


Figura 04. Morfología de las microcápsulas: (a) tipo depósito y (b) tipo matriz

Fuente: Kuang et al.(2010) ; Zuidam & Nedovic' (2010).

Las microcápsulas ayudan a que los materiales frágiles resistan las condiciones de procesamiento y empaqueo mejorando el sabor, aroma, estabilidad, valor nutritivo y apariencia de sus productos (Popplewell, 2001 citado por Yáñez et al., 2002).

Según Rahman (2007); Desai & Park (2005) las aplicaciones de la microencapsulación han ido incrementándose considerablemente en la industria alimentaria por varias razones, dentro de las principales tenemos:

- ❖ Protección de los componentes alimenticios encapsulados (probióticos, ácidos grasos poliinsaturados, vitaminas etc.) de factores adversos como el oxígeno, luz, calor, humedad permitiendo mantener su estabilidad y viabilidad en el tiempo.
- ❖ Reducción o retardo de su velocidad de evaporación o transferencia del núcleo a su ambiente externo.
- ❖ Las características físicas del material original pueden modificarse haciéndolo manejable. Por ejemplo un líquido puede convertirse en polvo facilitando la mezcla del encapsulado evitando la formación de grumos.
- ❖ El producto se puede diseñar para la liberación lenta a lo largo del tiempo o liberarse en un determinado instante. Por ejemplo en la encapsulación de vitaminas, minerales y otros nutrientes, éstos son liberados después de haberse consumido. Como la liberación se lleva a cabo en el estómago o el intestino permite una máxima absorción de los compuestos con un mínimo de reacciones adversas.

- ❖ El flavor del núcleo puede enmascararse.
- ❖ El núcleo puede diluirse aunque solo se requieran pequeñas cantidades, puesto que aun así se consigue la dispersión uniforme en el componente hospedador.
- ❖ Pueden emplearse componentes separados en una mezcla, que de otra forma reaccionarían el uno con el otro. Por ejemplo en la encapsulación de sabores, se reduce su volatilidad o previene reacciones indeseables con otros componentes del alimento aun cuando se almacene por un periodo prolongado.

1.3.2. Elementos para la producción de microcápsulas

La producción microcápsulas implica la selección el núcleo, elección del material de pared, el desarrollo de la formulación que incluye la búsqueda de la cantidad necesaria de la relación núcleo/material de pared y la aplicación de un proceso de producción adecuado (Sanguansri & Augustin, 2007).

1.3.2.1. Selección del núcleo

El primer paso es elegir un aceite fuente de ω -3, el cual se puede elegir entre una gama de aceites que son ricos en ácidos grasos omega-3.

El aceite de pescado es la principal fuente de AGPI-CL, ω -3 el cual lo encontramos principalmente en: Salmón, Atún, Sardinias, Anchoveta, Jurel, Caballa, Merluza. Aunque, también se puede encontrar ácidos grasos ω -3 (AAL, C18:3) en algunas fuentes vegetales como linaza, canola, espinacas, guisantes y frijoles (Flores, 2006). Es fundamental el uso de un aceite de alta calidad con un bajo grado de oxidación.

1.3.2.2. Selección del material de pared o matriz encapsuladora

Cuando se desea microencapsular un ingrediente alimenticio, es muy importante seleccionar un adecuado material de cobertura dado que es fundamental para el éxito de la microencapsulación (Lee & Ying, 2008)

Según Zuidam & Nedovic' (2010) las sustancias que pueden usarse para encapsular son muchas (Tabla 05), existen de diferentes tipos y propiedades. Sin embargo, sólo un número limitado ha sido certificado para aplicaciones en alimentos como materiales "generalmente reconocido como seguro" (GRAS).

Merece la pena mencionar que las regulaciones para los aditivos alimentarios son más estrictas que para productos farmacéuticos o cosméticos. Por consiguiente, algunos compuestos que son aceptados ampliamente para la encapsulación de drogas no han sido aceptados para uso en la industria de alimentos.

Tabla 05. Materiales de pared usados para la microencapsulación de alimentos

Categoría	Materiales de pared
Carbohidratos	Almidón, almidón modificado, maltodextrinas, ciclodextrinas dextranos, sacarosa, jarabe de maíz, quitosano
Proteínas	Gelatina, gluten, albumina, caseína, aislados proteico(suero, soya)
Gomas	Goma arábica, agar, alginato de sodio, carragenina
Lípidos	Ceras, parafinas, ácido esteárico, monoglicéridos, diglicéridos, aceites, grasas
Celulosas	Carboximetilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, nitrocelulosa, acetilcelulosa, acetato-butolato

Fuente: Zuidam & Nedovic (2010); Rahman (2007); Desai & Park (2005)

Según Rahman (2007) un material de cobertura ideal debe de reunir las siguientes características:

- a. Buenas propiedades reológicas a una concentración alta y fácil manipulación durante la encapsulación.
- b. Capacidad de dispersar o emulsionar el material activo y estabilizar la emulsión producida.
- c. No reaccionar con el material a ser encapsulado tanto durante el procesado como en el almacenamiento prolongado.
- d. Capacidad de sellar herméticamente y sostener el material activo dentro de su estructura durante el procesamiento y almacenamiento.
- e. Capacidad para eliminar totalmente el disolvente u otros materiales usados durante el proceso de encapsulación mediante desecación.
- f. Capacidad para impartir la máxima protección al núcleo frente a las condiciones ambientales.
- g. Solubilidad aceptable en disolventes admitidos por la industria de alimentos.
- h. Carencia de reactividad química con el material activo.
- i. Con propiedades de solubilización de las capsulas y con propiedades de liberación del material activo de la capsula.
- j. De bajo costo y de grado alimentario.

En la actualidad no existe un material de cobertura que satisfaga todos estos requerimientos, por lo cual en la práctica los materiales de pared se emplean en combinación o con adición de modificadores como secuestradores de oxígeno, antioxidantes, quelantes y surfactantes. Según Zuidam & Nedovic (2010) la mayoría de materiales de pared usados para la microencapsulación en alimentos son biomoléculas.

Según Lee & Ying (2008) los materiales de pared especialmente adecuados para la encapsulación de aceites deben poseer la capacidad de formar y estabilizar emulsiones proporcionando una firme y densa capa gruesa (película) alrededor de la superficie de las gotas de aceite de la emulsión

durante la homogeneización y formar una compacta pared que actúa como barrera al oxígeno entre las gotas de aceite en las microcápsulas.

Diversos estudios han demostrado que un sistema pared constituido por proteínas en combinación con carbohidratos es eficaz en la estabilización de aceites encapsulados durante el almacenamiento a largo plazo.

1.3.2.2.1. Aislado proteico de soya.

La proteína aislada de soya es una forma altamente refinada o pura de proteína de soya con un contenido proteico mínimo del 90% en base seca. Se elabora a partir de harina de soya desgrasada, que elimina la mayor parte de sus componentes no-proteicos, grasas y carbohidratos.

La funcionalidad de una proteína depende de la estructura de la molécula, en el caso de la soya, esta tiene presencia de grupos lipofílicos e hidrofílicos los cuales facilitan su asociación con grasa y aceite, sus propiedades pueden variar según el método de obtención; sin embargo, en general la proteína de soya se caracteriza por su capacidad emulsificante, capacidad de retención de agua, espumante, gelificante, proporciona a los sistemas alimenticios características de película, adhesividad, cohesividad, elasticidad y aumento de viscosidad. Por lo que suelen utilizarse en grandes cantidades como ingredientes funcionales en una amplia variedad de productos alimenticios (Escalona, 2004).

Cerca de un 75 % de las proteínas de la soya son globulinas, principalmente glicinina (11S) y β -conglucina (7S). La β -conglucina está compuesta por al menos 7 isómeros que son el resultado de sus tres subunidades, en tanto la glicinina, es más compleja, con 12 subunidades, la mitad de los cuales tiene puntos isoeléctricos ácidos y la otra mitad, puntos isoeléctricos básicos.

1.3.3. Métodos de microencapsulación

Existen diferentes métodos disponibles para producir microcápsulas, en general entre los más conocidos tenemos: Atomización, enfriamiento y refrigeración de aspersiones, cobertura en lecho fluidizado, liofilización, extrusión, coacervación, cocrystalización. Sin embargo las principales técnicas utilizadas para microencapsular ingredientes lipofílicos son atomización, coacervación y extrusión (Drusch et al., 2012).

El principio de las tecnologías de encapsulación es simple y generalmente se basa en la combinación de tres etapas consecutivas (Poncelet & Dreffier, 2007 citados por Passos & Ribeiro, 2010):

- ❖ El núcleo se mezcla dentro de un material encapsulante, en la mayoría de los casos una solución del polímero.
- ❖ La formulación resultante, en forma líquida, se dispersa en gotitas finas por goteo (gota a gota), pulverización o emulsificación. Este paso aumenta la superficie disponible del líquido para posteriores transformaciones (evaporación, refrigeración, congelación, reacciones químicas).
- ❖ El aceite o gotas acuosas se estabilizan en una tercera etapa. Las gotas de aceite pueden ser de un material fundido y se pueden transformar en partículas sólidas por enfriamiento. Dependiendo de su formulación, las gotas acuosas pueden ser sometidas a una serie de procesos de solidificaciones tales como la gelificación, polimerización o cristalización.

Se da un breve resumen de los principales métodos de encapsulación en el área de alimentos y los principios básicos que intervienen.

1.3.3.1. Atomización

La microencapsulación por atomización (aspersión, nebulización, spray drying) es el método más común de encapsulación de ingredientes alimenticios, ha sido utilizado en la industria de alimentos desde la década de 1950 para proporcionar cierta protección contra la oxidación de aceites y convertir

a polvos (Gouin, 2004). El secado por aspersión se desarrolló originalmente como un proceso de deshidratación para eliminar el agua y hacer productos acuosos polvos secos como la leche.

Es un proceso que implica una evaporación espontánea extremadamente rápida de el agua de una niebla de partículas finas producidas al atomizar un líquido (por ejemplo, emulsiones) en un atomizador a través de una boquilla o orificio a una presión muy alta. El flujo de aire caliente, ya sea en co-corriente o contra corriente en el interior del atomizador y en contacto con las partículas atomizadas, evapora el agua y forma partículas secas. Las partículas secas que caen a la parte inferior del secador se recogen. Las temperaturas utilizadas para el secado por pulverización en general están en el rango de 180-220 °C y 60 - 80°C para la temperatura de entrada del aire y respectivamente (Lee & Ying, 2008).

Una aplicación del proceso de atomización es la microencapsulación (Figura 1.1), similar a la de secado por atomización convencional, excepto en la etapa de preparación de la solución de alimentación que puede ser un poco más compleja, el cual consiste en disolver, emulsionar o dispersar el núcleo en una solución acuosa compuesta por el material de la pared (Fang & Bhandari, 2008).

Cuando se usa la atomización para la microencapsulación, el núcleo disuelto rápidamente se encapsula de manera uniforme en el material de pared. A pesar de las altas temperaturas utilizadas en el proceso para evaporar rápidamente el agua del material de recubrimiento y solidificarlo, la temperatura del núcleo se mantiene por debajo de 100°C.

Entre los parámetros más importantes a controlar durante el secado por atomización se encuentran: Las temperaturas de entrada y salida del aire de la cámara, el flujo de alimentación del producto a secar, el tiempo de residencia y el acondicionamiento de la materia prima (García et al., 2004).

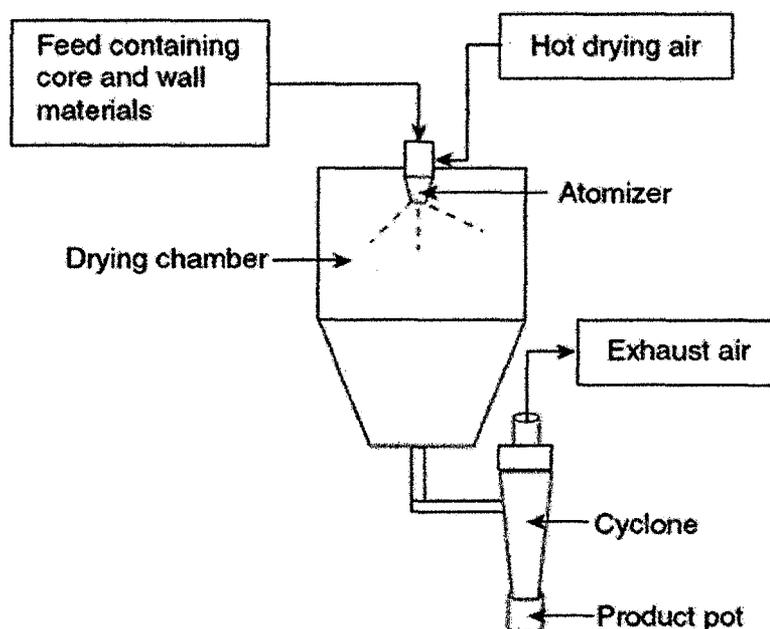


Figura 05. Diagrama típico para la encapsulación por atomización de ingredientes alimenticios y nutracéuticos

Fuente: Fang & Bhandari (2012)

En las últimas décadas el secado por aspersión, ha sido utilizado también como una técnica de encapsulación para microencapsular una amplia gama de ingredientes alimentarios tales como sabores, vitaminas, minerales, colorantes, grasas y aceites con el fin de protegerlos de su entorno (calor, humedad, aire) y extender la estabilidad en anaquel durante el almacenamiento. Actualmente es el método de encapsulación más utilizado en la industria alimentaria (Heinzelmann et al., 2000). Más del 90% de los aceites omega-3 microencapsulados son producidos por atomización.

Según Gouin (2004) los típicos materiales de pared usados, incluyen goma arábica, maltodextrinas, almidón modificado hidrofílico, y sus mezclas. Otros polisacáridos (alginato, carboximetilcelulosa, goma guar) y proteínas (proteínas de suero, proteínas de soja, caseinato de sodio).

Entre las ventajas sobre otros métodos de encapsulación se tienen: Fácil disponibilidad de los equipos, producción a gran escala, operación simple, proceso continuo, bajo costo de procesamiento y buena estabilidad del producto seco.

Según Matsuno & Adachi (1993) citados por Fang & Bhandari (2012) la prevención de la oxidación es un aspecto muy importante en la encapsulación de lípidos por atomización. El grado de protección dependerá de la naturaleza de los materiales de pared, tipo de lípidos y las condiciones de encapsulación usados.

1.3.3.2. Enfriamiento y refrigeración de aspersiones

En este proceso, la dispersión se atomiza con aire a temperatura ambiente o de refrigeración. El aire frío hace que la pared de encapsulación solidifique entorno al núcleo. Este proceso es similar al de deshidratación por atomización, la diferencia radica en que no se evapora agua alguna (temperaturas bajas). Las microcápsulas producidas por este método son insolubles en agua debido a su cobertura lipídica (Rahman, 2007; Augustin & Hemar, 2008). Los pasos más importantes en este proceso son: (a) preparación de la emulsión o/w, (b) homogenización y (c) atomización (Desai & Park, 2005)

1.3.3.3. Liofilización

La liofilización o desecación en estado congelado es uno de los procesos más usados para el secado de sustancias termosensibles que son inestables en soluciones acuosas. Se ha usado para encapsular esencias hidrosolubles y aromas naturales, las microcápsulas liofilizadas presentan una estructura más porosa que las atomizadas. Los pasos más importantes en este proceso son: (a) mezcla del material encapsulante con el núcleo y (b) liofilizado de la mezcla (Desai & Park, 2005).

Según Zuidam & Nedovic' (2010) después del secado por liofilización, la masa quebradiza obtenida se puede romper en trozos más pequeños por molienda, si es necesario. El uso de cantidades relativamente altas de crioprotectores (10% de proteínas de leche, 30% de maltodextrina o 10% de disacáridos) puede ayudar a estabilizar el agente activo sensible como probióticos o encapsulados sensibles como liposomas.

Debido a que el proceso de deshidratación para la encapsulación por liofilización se opera a temperaturas bajas, la principal ventaja de esta tecnología es: Un buen método para el secado de compuestos sensibles al calor (probióticos, enzimas y péptidos). Entre otras ventajas se incluyen el contenido de humedad del producto final y los productos secos tienen generalmente buena estabilidad y alta calidad (Oetjen & Haseley, 2004 citados por Fang & Bhandari , 2012)

Dentro de las principales desventajas de la liofilización se tienen: El alto consumo de energía, el largo tiempo de procesamiento y la estructura porosa obtenida, que en general no es una muy buena barrera entre el núcleo y su entorno. En comparación con el secado por atomización la liofilización es hasta 30-50 veces más caro (Gharsallaoui et al., 2007).

Buffo & Reineccius (2001) compararon distintos métodos de secado en la encapsulación de aceite esencial (AE) de naranja con goma acacia y almidón modificado. El estudio demostró que la liofilización ofrece las propiedades más deseables para encapsular el AE de naranja. Minemoto et al.(1997) compararon la oxidación de mentil linoleato encapsulado con goma arábica mediante secado por atomización y con secado por liofilización. Los resultados definieron a este último como el método más adecuado para la encapsulación. Además, el compuesto encapsulado por liofilización mostró una oxidación mucho más lenta a cualquier humedad relativa y no se vio afectado por el almacenamiento.

El estudio de la encapsulación de aceite de pescado por liofilización ofreció una oportunidad para conseguir un producto con buena resistencia a la oxidación (Heinzelmann & Franke, 1999).

1.3.3.4. Extrusión

La microencapsulación por extrusión involucra el paso de una emulsión del material activo y el material pared a través de un dado a alta presión (Tornillo extrusor). La extrusión constituye el segundo proceso más usado, después del secado por aspersion, para la encapsulación de sabores; aunque también se usan para encapsular vitaminas y colorantes que posteriormente se usan en la elaboración de bebidas, pasteles, gelatinas, postres entre otros.

Un proceso típico involucra la mezcla de sabores con jarabe de maíz o almidón modificado caliente, extrudiendo la mezcla en forma de esferitas (pellets) dentro de un baño con un disolvente frío como el isopropanol. El disolvente frío solidifica el jarabe en un sólido amorfo, bañando los sabores (Yañez et al., 2002).

Las características con las que cuenta esta técnica y que la hacen única y ampliamente usada son (Lakkis, 2007):

- ❖ Los extrusores son equipos que pueden manipularse de acuerdo a las temperaturas y velocidades de corte deseadas, variando parámetros como el diseño de tornillo, calentamiento del cilindro, velocidad de mezclado, velocidad de alimentación, contenido de humedad entre otros.
- ❖ Posibilidad de incorporar los agentes activos en varios puntos del proceso, para el caso de los materiales lábiles al calor estos pueden incorporarse al final del proceso para evitar su degradación.
- ❖ Se obtienen rendimientos altos, mayores al 30%.

Por otra parte, el gran tamaño de las partículas obtenidas (500-1000 μm) es una de las limitantes de esta técnica, lo cual condiciona su aplicación. Otra de las limitantes está relacionada con la escasa variedad de agentes encapsulantes.

1.3.3.5. Cocrystalización

Es un proceso de microencapsulación donde los ingredientes (núcleos) son incorporados en un conglomerado poroso de microcristales de sacarosa formados por cristalización espontánea. Los procesos son llevados a cabo por concentración de jarabes de sacarosa hasta supersaturación. Lo anterior se logra con agitación constante del material a encapsular, esto permite una nucleación y aglomeración del producto (Astolfi et al., 2005 citado por Parra, 2010).

Según Rahman (2007) el proceso de cocrystalización ofrece diversas ventajas como por ejemplo puede emplearse para desecar partículas. En la disolución altamente saturada, la nucleación y cristalización discurren a alta velocidad y el calor de cristalización desprendido se puede utilizar para realizar la deshidratación de partículas por evaporación. Mediante el proceso de cocrystalización, el núcleo en forma líquida puede ser convertido en forma de polvo seco sin desecación adicional.

La cocrystalización es una alternativa flexible y económica por ser un procedimiento relativamente simple; numerosos productos pueden ser encapsulados como jugos de frutas, aceites esenciales, saborizantes, aromatizantes y azúcar morena (sacarosa) etc. La estructura del cristal de sacarosa puede ser modificada para formar agregados de cristales muy pequeños que incorporan los sabores, un ejemplo puede ser la cristalización espontánea del jarabe de sacarosa lograda a altas temperaturas (cerca de 120 °C). Durante el proceso, el líquido saborizado es transformado en gránulos secos y algunos compuestos termosensitivos pueden ser degradados (Parra, 2010).

El aceite de la cáscara de naranja ha sido encapsulado utilizando procesos de cocrystalización, además de aceites vegetales. Un ejemplo de aplicación de esta técnica ha sido el encapsulamiento por cristalización de jugo de maracuyá (*Pasiflora edulis*) en sacarosa.

1.3.3.6. Coacervación

La coacervación, también llamada separación de fases, fue desarrollada y patentada en la década de 1950 por National Cash Register Company en Estados Unidos como medio para producir un sistema de tinta de dos componentes para papel copiator sin carbón. La coacervación es considerada por muchos como la técnica de encapsulación original y verdadera (Dziezak, 1988 citado por Rahman, 2007). La coacervación se define como la separación de dos fases líquidas en sistemas coloidales. Implica la separación de una fase líquida del material de cobertura de una disolución polimérica mediante el revestimiento de dicha fase como una capa uniforme en torno a las partículas del núcleo en suspensión. Seguidamente es solidificada la cubierta. La coacervación simple se refiere a sistemas que solo tienen un soluto coloidal (ej, gelatina), mientras que la coacervación compleja trata de sistemas conteniendo más de un soluto (ej. gelatina y goma acacia).

Los pasos más importantes en este proceso son: (a) formación de una fase triple químicamente inmiscible (una fase líquida o fase continua, un material a recubrir y un material de cobertura o de pared), (b) aplicación de la cobertura y (c) solidificación de la cobertura (Rahman, 2007; Sanguansri & Augustin, 2007), la solidificación del revestimiento se consigue por técnicas térmicas, entrecruzamiento o por eliminación del solvente; normalmente las microcápsulas se recogen por filtración o centrifugación, lavándolas con disolvente apropiado y desecándolas subsiguientemente con técnicas como la desecación de aspersiones o lecho fluidizado (Figura 06).

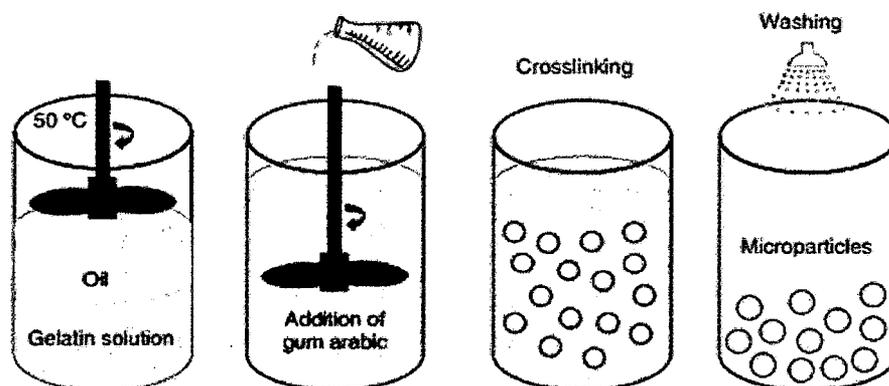


Figura 06. Representación de la obtención de microcápsulas por coacervación usando gelatina y goma arábica

Fuente: Alhassane et al.(2011) citado por Wen et al.(2014)

Se han elaborado microcápsulas usando proteínas como materiales de pared por el complejo de coacervación simple y la técnica consiste en una emulsificación doble y posterior entrecruzamiento (Crosslinking) con glutaraldehído o induciendo la gelificación por calor (Lee & Rosenberg, 2000a). Ambos enfoques proporcionan un medio para lograr alta retención del núcleo y dar como resultado microcápsulas insolubles al agua (Lee & Rosenberg, 2000b). Sin embargo, el uso de materiales de pared a base de proteínas en la industria de alimentos para ingredientes sensibles es limitada porque las proteínas son generalmente inestables, al calentamiento y son desnaturalizadas por los disolventes orgánicos, y otro aspecto a tener en cuenta, es que el agente entrecruzante es perjudicial.

1.3.3.6.1. Emulsiones y desestabilización

Una emulsión es un sistema que contiene dos líquidos inmiscibles, uno de los cuales está disperso (fase interna, dispersa o discontinua) en forma de pequeñas gotas esféricas en el otro (fase continua o externa) (McClements, 1999).

En la mayoría de alimentos el diámetro de las gotitas varía entre $0.1\mu\text{m}$ y $100\mu\text{m}$. Según Becher (1985) dependiendo de la naturaleza de las fases dispersa y continua, las emulsiones se clasifican como:

- Aceite en agua (O/W) dentro de las cuales tenemos mayonesa, leche, cremas, bebidas.
- Agua en aceite (W/O) aquí tenemos a la mantequilla, margarina entre otros.
- Múltiples, tipo $W_1/O/W_2$ y $O_1/W/O_2$ las cuales encuentran aplicaciones en cosmética y farmacia, constituyendo la medicina y tecnología de alimentos campos claros de aplicaciones potenciales (Garti & Benochou, 2003 citados por Muñoz et al., 2007).

La formación de una emulsión no es un proceso espontáneo ($\Delta G > 0$) en la práctica debe de contener un tercer componente, llamado emulsionante, el cual es una sustancia anfifílica que facilita la formación de la emulsión disminuyendo la tensión interfacial entre la fase apolar (oleosa) y la polar (acuosa) aportando estabilidad física durante un tiempo, que puede ser más o menos largo, dependiendo de la composición, características de procesado y condiciones externas durante el almacenamiento. Así mismo para formar una emulsión se requiere de energía externa para lograr cizallar, romper y así dispersar un líquido en el otro, por lo que es necesario manejar un sistema de dispersión u homogenización (McClements, 1999). Los homogeneizadores más utilizados en la industria alimentaria se muestran esquemáticamente en la Figura 07.

Según Flores (2006) al proceso consistente en la dispersión de un líquido en finas gotas en otro por acción mecánica se le conoce como emulsificación. El proceso incluye dos pasos. El primero la deformación y ruptura de las gotas el cual incrementa la superficie específica de la emulsión y segundo la

estabilización de las nuevas interfaces formadas por la acción de emulsificantes (agentes tensoactivos) u aditivos adicionales.

Según McClements (2015) la elección de un tipo particular de homogeneizador y sus condiciones de funcionamiento depende de las características de los materiales a homogeneizar (por ejemplo, viscosidad, tensión interfacial, sensibilidad al cizallamiento) y de las características finales de la emulsión requerida (concentración de gotas, tamaño de gotas, la viscosidad)

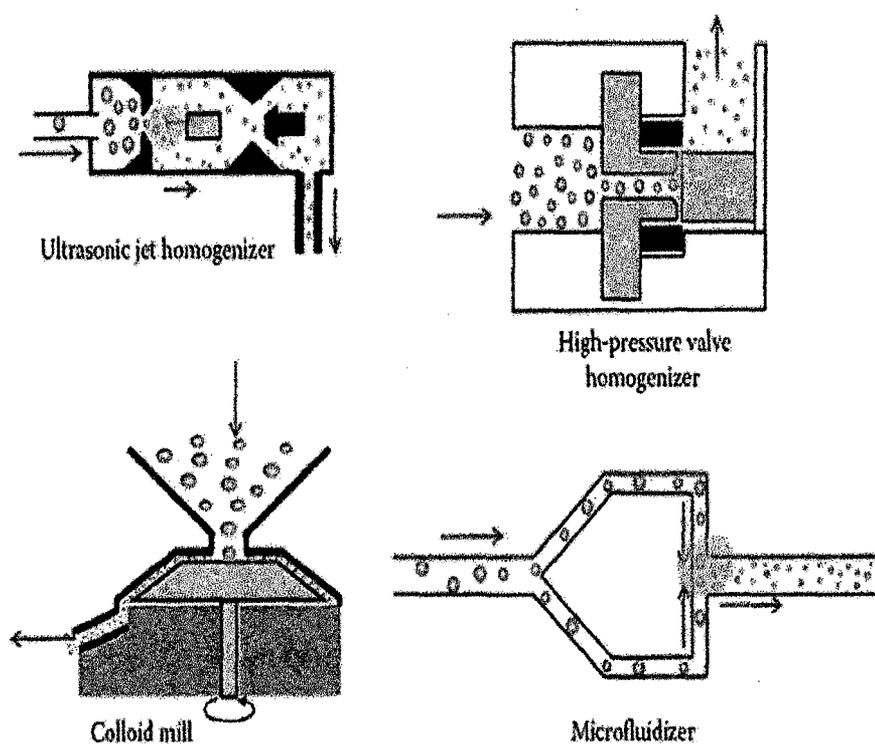


Figura 07. Dispositivos mecánicos de alta energía: homogeneizador de alta presión, molino coloidal, microfluidizador y homogeneizador ultrasónico

Fuente: McClements (2015).

Según McClements (2015) dependiendo de los ingredientes y de los métodos de procesamiento se pueden obtener emulsiones con un amplio rango

de diferentes tamaños de gotas. Las emulsiones se pueden clasificar en función del tamaño de la gota de la fase dispersa como (Figura 08): Microemulsiones (10-100 nm), nanoemulsiones también conocidos como miniemulsiones (100-1000nm) y macroemulsiones o simplemente emulsiones (0.5-100 μm). En la actualidad, parece no haber consenso sobre las clasificaciones de las emulsiones.

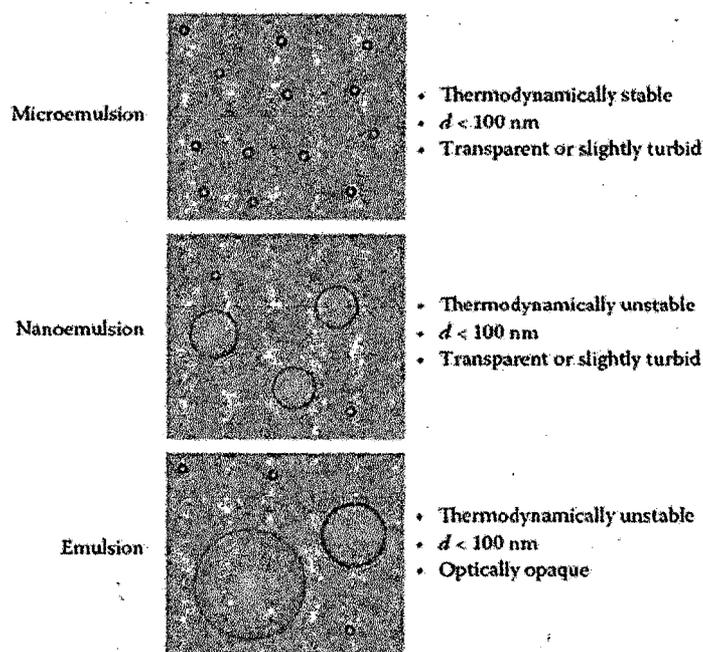


Figura 08. Representación esquemática para ver las diferencias entre emulsiones, nanoemulsiones y microemulsiones

Fuente: McClements (2015)

Las proteínas globulares como la de la soja y proteína de suero se utilizan como emulsionantes en numerosos productos comerciales debido a su capacidad para facilitar la formación de emulsiones y mejorar la estabilidad de una emulsión a largo plazo. La proteína se adsorbe rápidamente en la interfaz aceite-agua que se forma al homogenizar una fase acuosa y una fase oleosa, facilitando la formación de gotas debido a la disminución de la tensión interfacial. Estos cambios conformacionales promueven interacciones

hidrofóbicas y electrostáticas, que conllevan a la estabilización de película proteica alrededor de gotitas de aceite.

Según McClements (2015) las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables, por tanto, con el tiempo las fases tenderán a separarse a través de una variedad de diferentes mecanismos (Figura 09). La inestabilidad se debe al aumento del área durante la emulsificación (Villar et al., 2007) y cuando no hay cambios perceptibles en la distribución de glóbulos, su estado de agregación u ordenamiento espacial se dice que la emulsión es estable. Dentro de los principales factores que afectan la estabilidad de la emulsiones se tiene a la distribución del tamaño del glóbulo, naturaleza de la capa interfacial absorbida, naturaleza de la fase continua y naturaleza de la fase dispersa (Dickinson, 2003).

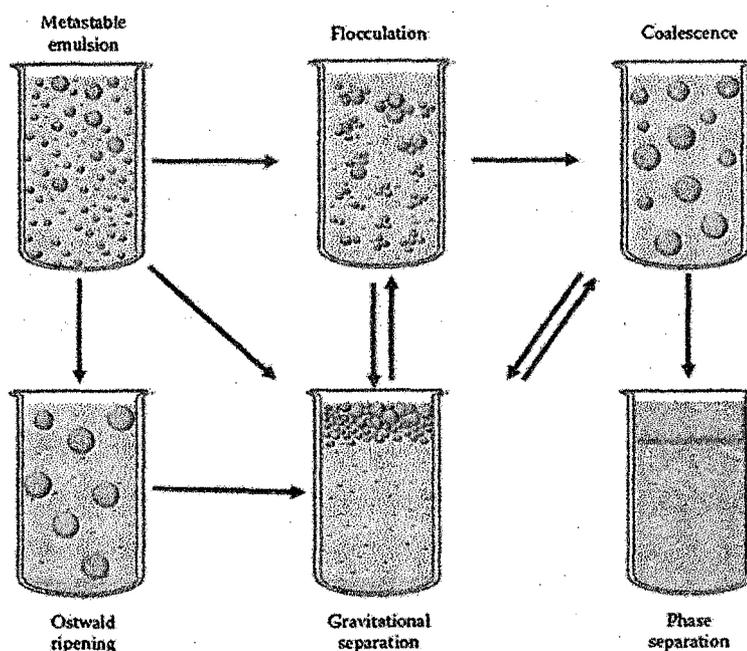


Figura 09. Diagrama esquemático de los mecanismos de desestabilización más comunes en emulsiones alimenticias.

Fuente: McClements (2015)

Las emulsiones múltiples se obtienen mediante un proceso llamado doble emulsificación, en el que una primera emulsión (emulsión primaria) que puede ser de tipo O_1/W_1 o W_1/O_1 se emulsifica nuevamente en una segunda fase continua que puede ser agua (W_2) o aceite (O_2) para formar finalmente emulsiones múltiples tipo $O_1/W/O_2$ o $W_1/O/W_2$ según sea el caso (Figura 10). La emulsión primaria se elabora bajo fuertes e intensas condiciones de emulsificación para obtener pequeñas gotas mientras que la emulsión secundaria se obtiene con una menor intensidad de emulsificación para evitar la ruptura de las gotas internas.

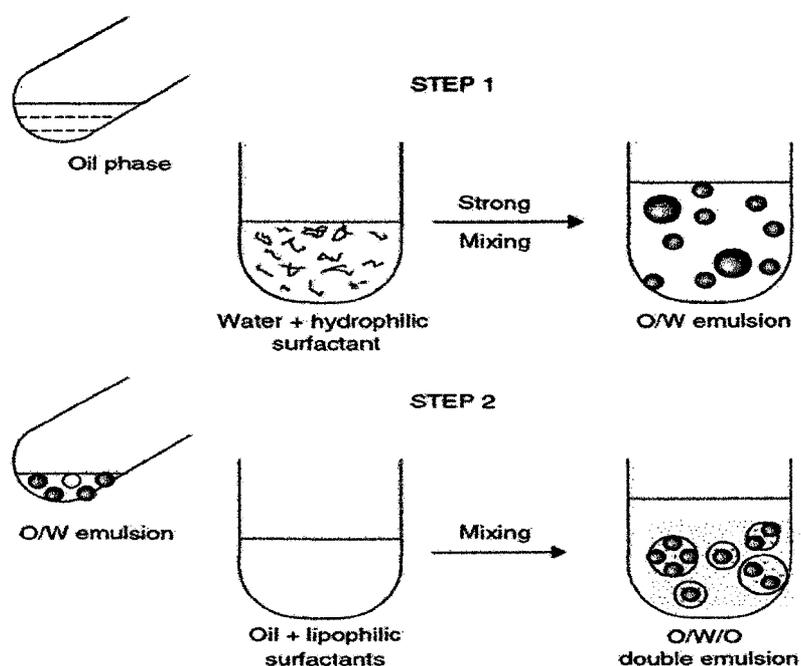


Figura 10. Esquema ilustrativo del proceso de dos etapas en la formación de una emulsión múltiple tipo O/W/O.

Fuente: Benichou & Aserin (2008)

Según Benichou & Aserin (2008) las emulsiones múltiples se componen de dos interfaces diferentes que requieren dos tipos diferentes de emulsionantes. En las emulsiones múltiples O / W / O el primer conjunto de emulsionantes para la interfaz interna, debe ser hidrófilo, mientras que el segundo conjunto de emulsificantes, para la interfaz externa, debe ser hidrófobo. Para emulsiones múltiples tipo W / O / W el orden de los emulsificantes es lo opuesto del anterior: el emulsificante de la fase interna es hidrófobo, mientras que de la fase exterior es hidrófilo. En muchos casos se recomienda la mezcla de dos o más emulsificantes para obtener un mejor resultado de estabilización (Figura 11).

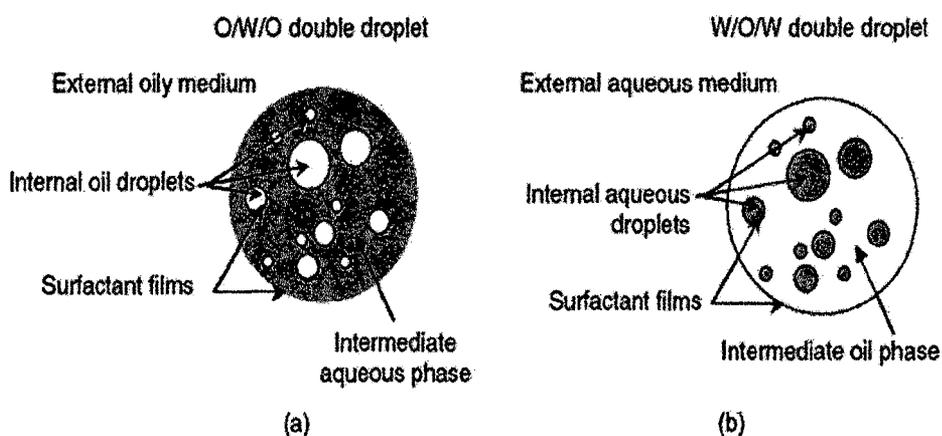


Figura 11. Esquema de los tipos de emulsiones: a) emulsión múltiple O/W/O y b) emulsión múltiple W/O/W.

Fuente: Benichou & Aserin (2008)

1.3.3.6.2. Reticulación proteica con la enzima transglutaminasa

La transglutaminasa es una enzima transferasa que tiene el nombre sistemático de proteína-glutamina y glutamiltransferasa (EC 2.3.2.13). Esta enzima cataliza las reacciones de transferencia de grupos acilo de los residuos glutamínicos formando enlaces ϵ -(γ -Gln) Lys intra e inter molecular del entrecruzamiento en proteínas (Whitehurst & Law, 2002). Este

entrecruzamiento y polimerización (Figura 12) ocasiona cambios físicos increíbles tanto en los sistemas biológicos como en los alimentos ricos en proteína.

La transglutaminasa es una enzima que está compuesta por 331 aminoácidos en una sola cadena polipeptídica, con un punto isoeléctrico de 8.9, el pH óptimo para la actividad enzimática que oscila entre 6.0 y 7.0, la temperatura ideal de esta enzima para su reacción es aproximadamente 50 °C.

A diferencia de las enzimas amilasas, proteasas que promueven la hidrólisis, la transglutaminasa cataliza la polimerización y la unión cruzada o entrecruzamiento (crosslinking) de proteínas. Las uniones cruzadas pueden ser tanto intermoleculares como intramoleculares. Los enlaces formados son de tipo covalente y por ende son más estables que los enlaces iónicos y los hidrofóbicos y no se pueden romper por calentamiento ni por fuerza física, siendo estos efectos muy importantes para la industria, pues agregan valor a los alimentos (Whitehurst & Law, 2002).

Varios investigadores han realizado estudios sobre el entrecruzamiento de diversas proteínas utilizando esta enzima para formar películas de biopolímeros (Nio et al., 1986; Motoki et al., 1987; Yildirim & Hettiarachchy, 1998; Lim et al., 1999; Liu et al., 1999; Babiker, 2000; Babin & Dickinson, 2001; citados por Cho et al., 2003). Así mismo la enzima ha demostrado ser útil en el endurecimiento de geles de surimi durante la reacción de polimerización (Seguro et al., 1995). La formación de geles y las propiedades viscoelásticas de los productos a base de surimi mejoran con el tratamiento con la enzima. En panificación la adición de transglutaminasa mejora la fijación, elasticidad, extensibilidad, desarrollo de la masa, y disminuye el trabajo de amasado, lo cual supone un ahorro energético para la industria. Y con respecto a la miga, su consistencia aumenta debido a una afirmación de la red de gluten. Las piezas obtenidas presentan un mayor volumen, con una mejor textura y

alveolos más homogéneos. Sin embargo se registran pocas investigaciones donde utilicen la transglutaminasa como agente entrecruzante del aislado proteico para la producción de microcápsulas.

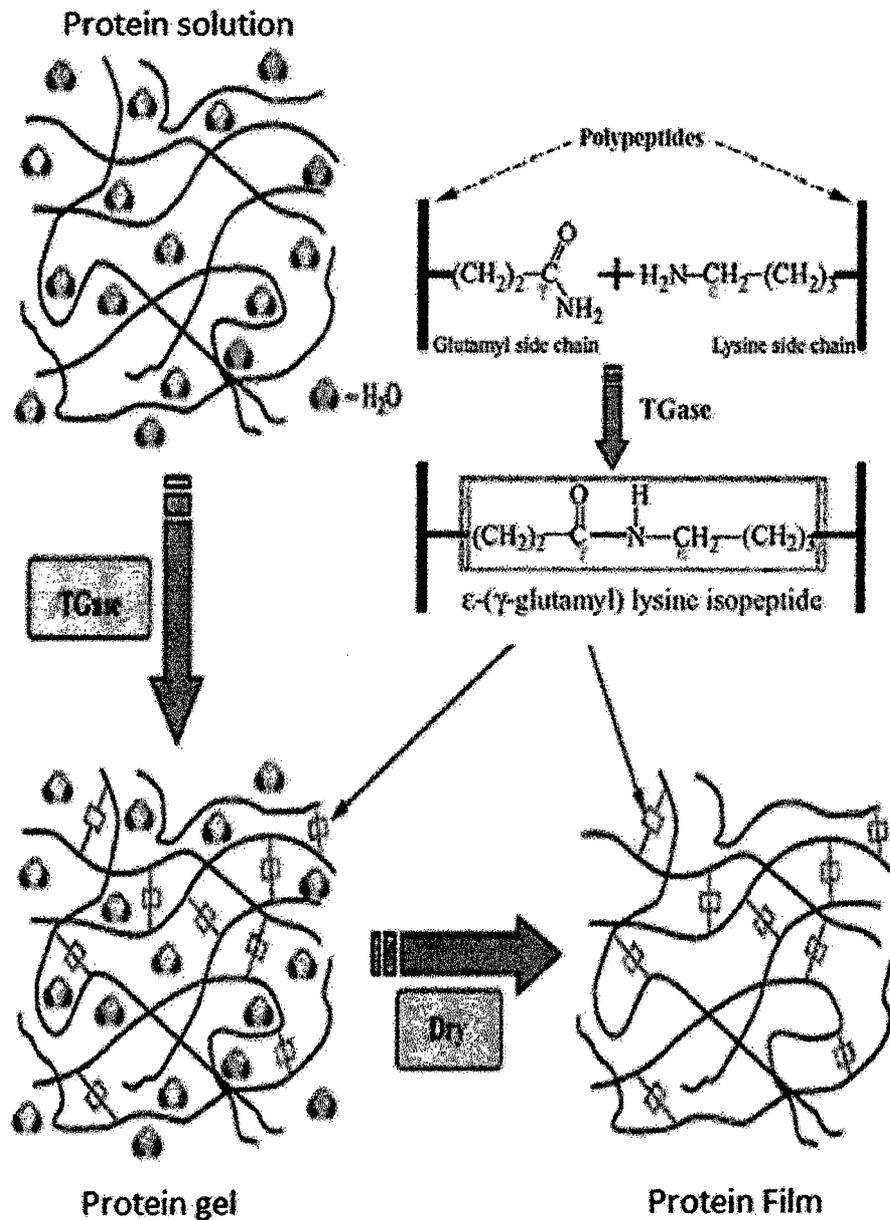


Figura 12. Reticulación de proteínas inducidas por la enzima transglutaminasa

Fuente: Whitehurst & Law (2002)

CAPITULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de físico química y sensorial del Instituto Tecnológico de la Producción (ITP)

2.2. Materiales

2.2.1. Materia prima e insumos

El aceite desodorizado de anchoveta fue proporcionado por la empresa SUDCHEMIS. El aislado proteico de soya conteniendo un 90 % de proteína de la marca Soale fue comprado a la empresa Montana. El emulsificante grindsted STS 30 fue comprado a la empresa Aromas del Perú. Se trabajó con la enzima comercial transglutaminasa ACTIVA TG-K que fue un donativo de la corporación Aginomoto del Perú.

2.2.2. Reactivos químicos

- ❖ Etanol 95% Pureza, grado ACS
- ❖ Hidróxido de sodio p.a. 97,0 – 98,5 % de pureza. Fisher Scientific
- ❖ Ácido acético glacial, Fisher Scientific, pureza 99.9 %, grado ACS.
- ❖ Yoduro de potasio, Pureza 97%.
- ❖ Alcohol etílico 95%.
- ❖ Sulfato de sodio anhidro, Mallinckrodt, Grado ACS.
- ❖ Cloroformo J.T. Baker, 99.9 % pureza, grado ACS
- ❖ Metanol, Omnisol, 99.98 % pureza, Grado ACS.
- ❖ Glicerina, Grado ACS.
- ❖ Sulfato de cobre pentahidratado p.a. 0,1 % de pureza. Merck
- ❖ Reactivo de Wijs, Merck.
- ❖ Solución de NaOH 0,1N
- ❖ Solución de tiosulfato de sodio 0,1N y 0,01N.
- ❖ Solución de yoduro potásico al 15%
- ❖ Solución indicadora de fenolftaleína al 1%
- ❖ Solución saturada de yoduro de potasio

- ❖ Estándar de albúmina sérica bovina
- ❖ Otros reactivos, especificados en los métodos de análisis.

2.2.3. Materiales de laboratorio

- ❖ Balones con tapa esmerilada de 250ml.
- ❖ Kitazato de 1000 ml
- ❖ Vasos precipitados: 25, 50, 100, y 150, 250, 500 y 1000 ml.
- ❖ Bureta de 25 ml.
- ❖ Campana desecadora.
- ❖ Matraces: 150 y 250 ml.
- ❖ Fiolas: 25, 100 y 500 ml.
- ❖ Micro pipetas: 100, 1000, 5000 μ L
- ❖ Pipetas: 0,5, 1 y 2 ml, 5, 10 Y 25 ml
- ❖ Probetas de 10, 50 y 100 ml.
- ❖ Termómetro, Cronometro.
- ❖ Papel whatman n° 4
- ❖ Bagetas
- ❖ Dedales
- ❖ Tubos de ensayo
- ❖ Tubos de centrifuga de 50 ml

2.2.4. Equipos

- ❖ Homogenizador Silent Crusher M, Marca Heidolph. Accesorio G/M 18
- ❖ Incubadora. Marca Memmert GmbH + Co.KG BE-400
- ❖ Balanza analítica. Marca Mettler, modelo PM 100 RO 0-110g
- ❖ Agitador vórtex. Marca Barnstead Thermolyne
- ❖ Analizador de actividad de agua Aqualab Pre. Marca Decagon, serie 3.
- ❖ Equipo de extracción Soxhlet, acoplado con baño de recirculación Selecta. RO 230V 5A 1300W 50H2.
- ❖ Campana extractora de gases. Marca Chem Gard.

- ❖ Centrífuga. Marca Thermo Electrón Corporation. Iec Centra CL2. RO 220-240V 50/60 H2 40 A
- ❖ Potenciómetro. Marca Mettler Toledo. Modelo FEP20 ATC Kit. RO 0-14 unidades de pH
- ❖ Refrigeradora. Marca Thermo
- ❖ Cámara Digital Profesional. Marca Olympus
- ❖ Bomba de vacío. Marca Ikeda scientific, Modelo PSW
- ❖ Evaporador rotatorio. Marca Heidolph.
- ❖ Estufa. Marca Binder ED -115
- ❖ Colorímetro. Marca Nippon Deshoku ZE 2000
- ❖ Selladora al vacío. Marca Multivac A30016
- ❖ Campanas de desecación
- ❖ Equipo liofilizador. Marca Labconco. Modelo 7400040.
- ❖ Cromatógrafo de gases. Marca Perkin Elmer, equipado con detector de ionización de llama (FID) y columna cromatográfica capilar supelcowax de sílica fundida de 30 m de longitud, 0.25 mm diámetro interior y 0.25 μ m de espesor de película.

2.3. Métodos de análisis

2.3.1. Análisis físico químicos del aceite de pescado

- ❖ Determinación del perfil de ácidos grasos por cromatografía gaseosa según el método de ensayo LABS-ITP-FQ-002-98, Rev. V, 2009. Método validado por el laboratorio de físico química LABS-ITP.
- ❖ Determinación del índice de yodo según el método de la AOAC. (2005).
- ❖ Determinación del índice de peróxidos según el método de ensayo LABS-ITP-FQ-002-98, Rev. V, 2009. Método validado por el laboratorio de físico química LABS-ITP según la AOAC. (2005).
- ❖ Determinación de ácidos grasos libres según el método de ensayo LABS-ITP-FQ-002-98, Rev. V, 2009. Método validado por el laboratorio de físico química LABS-ITP según la AOAC. (2005).

2.3.2. Determinación de la estabilidad física de la emulsión I

Se tomó aproximadamente (50) ml de la emulsión y se transfirió a tubos de centrifuga de 50 ml y se centrifugaron a 2000 rpm durante 20 minutos al cabo del cual se procedió a medir el volumen de la fase del exudado acuoso. Cada determinación se trabajó por triplicado. Los resultados se expresaron como porcentaje de estabilidad de la emulsión (EE %) de acuerdo a la siguiente expresión (Sosa, 2000).

$$E.E (\%) = \frac{\text{Volumen total} - \text{volumen fase acuosa}}{\text{Volumen total}} \times 100$$

2.3.3. Determinación del aceite libre de la emulsión I

El aceite libre de la emulsión(O/W) que no haya podido ser emulsificado se determinó mediante el método de extracción con éter de petróleo (Flores, 2006). Para lo cual se pesaron 10 g de la emulsión I en matraces de 100 ml y se lavaron por agitación con 30 ml de éter de petróleo y se procedió a decantar en frascos de 250 ml del evaporador rotatorio previamente tarado para evaporar el éter residual y determinar el aceite libre por diferencia de peso.

2.3.4. Determinación del contenido total de aceite en las microcápsulas

El aceite de pescado incorporado en las microcápsulas se extrajo mediante un aparato de extracción continua Soxhlet y se expresó en gramos de aceite de pescado por gramo de microcápsulas y/o en porcentaje (Gan et al., 2008).

2.3.5. Determinación de la eficiencia microencapsulación

La eficiencia de la microencapsulación se determinó en función a la proporción (expresado como porcentaje) del peso del aceite de pescado microencapsulado del peso del aceite de pescado a utilizado en la emulsión.

2.3.6. Determinación del perfil de ácidos grasos por cromatografía gaseosa

El aceite de pescado extraído de las microcápsulas fue saponificado y metilado a la vez por la reacción de las soluciones de NaOH 2N y HCl 2N en metanol respectivamente. Una vez obtenidos los ácidos grasos metilados fueron inyectados al cromatógrafo de gases, para finalmente obtener el perfil de ácidos grasos del aceite de pescado. Las condiciones de trabajo del cromatógrafo fueron: Temperatura del horno 240°C, temperatura del inyector 250°C, temperatura del detector 260 °C, volumen de inyección 2µL, presión de arrastre de 10 psi, columna capilar supelcowax-10.

2.3.7. Determinación de color

Los parámetros del color fueron medidos usando el Colorímetro Nippon Deshoku ZE 2000, usando el modelo de color Hunter, donde los parámetros de color son: luminosidad (L*), a* que va de - a es verde, +a es rojo y b* que va de - b es azul, +b es amarillo (Gan et al., 2008).

2.3.8. Determinación de la solubilidad de las microcápsulas

Se pesó 100 miligramos de microcápsulas en tubos de centrifuga, se adiciono 5 ml agua destilada y se incubo a 37 °C por 5 h. El sobrenadante se obtuvo por centrifugación a 2500 rpm por 15 min. La concentración de proteína soluble en la fase acuosa se determinó usando el método de Biuret.

2.4. Metodología experimental

Para obtener microcápsulas de aceite de pescado empleando aislado proteico de soya reticulado con la enzima transglutaminasa activa TG-K mediante un proceso de doble emulsificación se realizó una modificación al método desarrollado por Cho et al. (2003). La Figura 13 muestra el diagrama de flujo seguido para la obtención de las microcápsulas, en su descripción, se incluyó el diseño experimental.

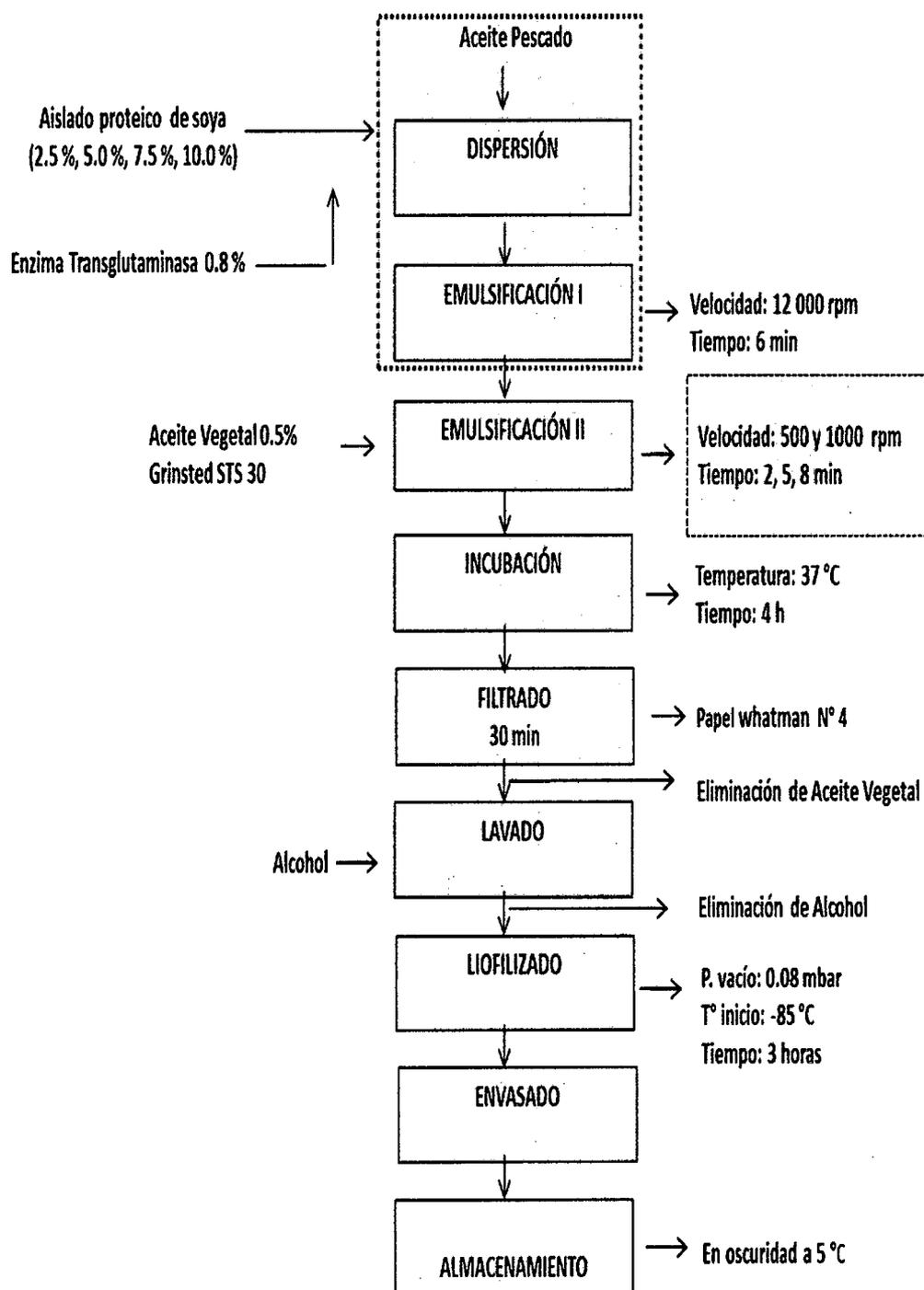


Figura 13. Diagrama de flujo de la microencapsulación del aceite de pescado mediante doble emulsificación.

Fuente: Elaboración propia (2015)

- ❖ **Dispersión:** El aislado proteico de soya fue disuelto en agua desionizada, mediante agitación durante 3 horas a temperatura ambiente y se dejó en refrigeración durante 16 h para su completa hidratación, seguidamente se adicionó la enzima transglutaminasa activa TG-K disuelta en proporciones de agua de 6 a 7 veces el peso de la enzima y se mezcló durante 10 minutos para asegurar el mezclado uniforme. Seguidamente se incrementó la velocidad de la agitación a 700 rpm para realizar una pre emulsión para lo cual se añadió lentamente el aceite de pescado a la solución de aislado proteico.
- ❖ **Emulsificación I.** Consistió en emulsificar la emulsión primaria(O/W) obtenida anteriormente, emulsificando el aceite de pescado (Núcleo): Aislado proteico de soya (Material de pared), para lo cual se utilizó el equipo de homogenización Silent Crusher tipo rotor-estator, accesorio 18 G/M.
- ❖ **Emulsificación II:** Una porción de la emulsión I se adiciono lentamente a un segundo medio conteniendo aceite vegetal al cual previamente se incorporó 0.5 % de emulsificante grinsted STS 30, la relación de la emulsión I y la nueva fase continua fue de 1:4 respectivamente y seguidamente se emulsificó nuevamente.
- ❖ **Incubación:** La emulsión O/W/O se incubo a 37 °C durante 4 horas, para dejar actuar a la enzima transglutaminasa TG-K en la reticulación (entrecruzamiento) del material de pared.
- ❖ **Filtrado y lavado:** Las microcápsulas gelificadas que se encontraban inmersas en el aceite vegetal se separaron por filtración empleando papel filtro whatman n° 4 y se lavaron mediante agitación con etanol 3 veces.
- ❖ **Liofilizado y envasado:** Las microcápsulas se congelaron para poder ser liofilizadas. Finalmente las microcápsulas secas en polvo, se envasaron en bolsas de polietileno transparente y almacenaron en refrigeración y en oscuridad para su respectiva caracterización. Se pudo también secar las microcápsulas mediante evaporador rotatorio al vacío, pero según pruebas preliminares se determinó que este secado influía en el color, por lo cual se optó por el liofilizado.

2.4.1. Diseño experimental

❖ **Determinación de las características físico químicas del aceite desodorizado de anchoveta utilizado.**

El aceite desodorizado de anchoveta fue caracterizado mediante la determinación del perfil de ácidos grasos mediante cromatografía gaseosa, determinación del índice de yodo, determinación del índice de peróxidos, determinación acidez, siguiendo las metodologías establecidas anteriormente.

❖ **Efecto del Material de pared y de la enzima transglutaminasa en la estabilidad física de la emulsión I (O/W) mediante pruebas aceleradas.**

El aceite de pescado se adicionó lentamente y se emulsificó a 12000 rpm durante 6 minutos empleando un equipo homogenizador tipo rotor estator. Con la finalidad de establecer la ubicación del rotor en frascos de homogenización se hicieron varias pruebas preliminares, variando la ubicación del rotor-estator y tipo de accesorio usado, determinándose que la ubicación sería en la mitad del frasco.

Finalizada la emulsificación se evaluó la estabilidad física de la emulsión mediante un test acelerado por centrifugación. La variable respuesta fue la estabilidad de la emulsión. En esta etapa se estableció el porcentaje de aislado de proteico de soya a usar.

Una vez establecido la mejor proporción de aislado proteico de soya, se trabajó a ese nivel y se adiciono la enzima transglutaminasa (0.2, 0.4, 0.6 y 0.8%) y se evaluó como esta influye en la estabilidad de la emulsión todo esto en un nuevo experimento estableciéndose finalmente el nivel de empleo de la enzima.

❖ **Efecto de las condiciones de emulsificación de la emulsión II (O/W/O) en el porcentaje de aceite de pescado en la microcápsula.**

Una parte de la emulsión I(O/W) se adicionó a cuatro partes de aceite vegetal conteniendo 0.5% de emulsificante grinsted STS y se emulsificó para formar una emulsión múltiple (O/W/O). Las condiciones de mezclado (tiempo y velocidad) a evaluar fueron tiempo (2, 5, 8 min) y velocidad (500 y 1000 rpm), seguidamente las nuevas emulsiones se incubaron a 37 °C durante 4 horas y se continuó con las demás etapas definidas anteriormente. En esta etapa se estableció el efecto de las condiciones de emulsificación y se seleccionó la combinación más apropiada.

❖ **Influencia de la relación del Núcleo: Material de pared en el contenido de aceite de pescado y en las características de secado de las microcápsulas.**

Se trabajó a las mejores condiciones establecidas en la etapa anterior buscando establecer la influencia del Núcleo: Material de pared en el contenido de aceite de pescado en las microcápsulas secas para lo cual se probaron las siguientes relaciones: 4:1, 1:1 y 1:2 buscando incrementar el contenido de aceite de pescado en las microcápsulas.

2.5. Análisis estadístico

- ❖ Para evaluar el efecto del aislado proteico de soya y de la enzima en la estabilidad física de la emulsión I (O/W) mediante pruebas aceleradas respectivamente, se realizó un ANVA a un nivel de confianza del 95% y una prueba de Tukey para conocer las diferencias entre los tratamientos. Las variables experimentales fueron el porcentaje de proteína de soya y porcentaje de enzima a adicionar respectivamente, la variable respuesta a evaluar fue el porcentaje de estabilidad de la emulsión.

- ❖ Para evaluar el efecto de las condiciones de emulsificación de la emulsión II (O/W/O) en el porcentaje de aceite de pescado en las microcápsulas se utilizó un diseño factorial en DCA(Diseño completamente al azar) y una prueba de Tukey para conocer las diferencias entre los tratamientos. Las variables experimentales evaluadas fueron tiempo (2, 5 y 8 min) y velocidad (500 y 1000 rpm) de emulsificación, la variable respuesta fue el porcentaje de aceite en las microcápsulas.

- ❖ Para evaluar la relación del Núcleo /Material de pared sobre el contenido de aceite de pescado en las microcápsulas se realizó un ANVA a un nivel de confianza del 95% y una prueba de Tukey para conocer las diferencias entre los tratamientos. Las variables experimentales fueron las 3 relaciones de Núcleo/Material de pared y la variable respuesta fue el contenido de aceite microencapsulado.

CAPITULO III
RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Caracterización fisicoquímica del aceite desodorizado de anchoveta

Las principales características fisicoquímicas del aceite desodorizado de anchoveta, se encuentran dentro de los valores permitidos y considerados propios al aceite de pescado (Tabla 06).

El elevado índice de yodo (192.4) se encuentra dentro del rango de índice de yodo (178-200) reportado por Allen (1995) para aceite de anchoveta; El índice de yodo está relacionado con el alto grado de insaturación, hecho que se ve reflejado con el alto porcentaje de AGPI-CL, principalmente EPA + DHA encontrados en el aceite de anchoveta. El alto valor de yodo representa una característica distintiva frente a los aceites vegetales que generalmente presentan índices de yodo inferiores a 150 g de yodo/100 g de aceite (Mehlembacher, 1979)

Tabla 06. Características fisicoquímicas del aceite desodorizado de Anchoveta

Características fisicoquímicas	Valor
Índice de yodo(g de yodo/100 g de aceite)	192.4 ± 0.46
Acidez libre(% de ácido Oleico)	0.05 ± 0.01
Índice de peróxido(meq peroxido/Kg)	0.10 ± 0.03
Omega -3 (% EPA+DHA)	31.04 ± 0.30

Fuente: Elaboración propia (2015).

El índice de peróxido evidencia una insipiente oxidación primaria pero que está por debajo a los valores reportados en otros trabajos de investigación (Velasco et al., 2009; Flores, 2006; Vásquez et al., 2002). La baja formación de peróxidos de algún modo está relacionada con el corto tiempo de almacenamiento (recientemente obtenido y purificado) y con la escasa presencia del oxígeno en el aceite, condición que se consiguió al adicionarle nitrógeno para desplazar al oxígeno del espacio de cabeza en las botellas de almacenamiento. La adición de nitrógeno frena la oxidación del aceite de pescado aspecto que fue observado por Ackman (1991) al comparar la oxidación en muestras de aceite de

pescado en capsulas de gelatina almacenadas a 40°C en un ambiente de nitrógeno. Del mismo modo Ordoñez et al.(1998) afirma que la oxidación no tiene lugar en ausencia de oxígeno, por lo tanto cualquier proceso que se aplique con el fin de disminuir o eliminar el oxígeno será efectivo para prevenir la oxidación.

La acidez expresada como porcentaje de ácido oleico se encuentra muy por debajo a 0.35 % expresada en la norma nacional para aceite de pescado refinado (NTN 321.009). Los bajos valores tanto índice de peróxido como la acidez evidencian la calidad del aceite de pescado empleado en la investigación.

3.2. Perfil lipídico del aceite

Al pescado graso de agua fría, se le atribuyen bondades nutricionales y virtudes terapéuticas propias del aceite en el que predominan AGPI-CL, ω -3, principalmente el EPA y DHA que en sumatoria conjunta representan un 31.04 % del total de los ácidos grasos presentes en el aceite, lo cual refleja que estos ácidos grasos forman el mayor porcentaje de los ácidos grasos presentes en el aceite tal como se puede ver en la Tabla 07, siendo esta característica diferenciadora frente a los aceite obtenidos de otras especies y frente a los aceites de origen vegetal. Lo cual concuerda con lo reportado por Zuidam & Nedovic' (2010) que afirman que el EPA Y DHA son ácidos grasos poliinsaturados que se puede encontrar en fuentes marinas en cantidades dentro del rango de 20-40% del contenido de la grasa y en algas cerca del 40% del contenido de la grasa. Del mismo modo Salas et al.(2002) encontró que la sumatoria de los ácidos grasos EPA + DHA en aceite de pescado fluctúan alrededor del 25.5 y 37.4 % a lo largo del año

Dentro del grupo de los ácidos grasos saturados y monoinsaturados destaca la predominancia del ácido palmítico (C16:0) y el ácido oleico (C18:1) respectivamente, similares valores han sido determinados en aceite semirrefinado de anchoveta (Flores, 2006).

Cabe precisar que el aceite de anchoveta presenta 1.21% de omega-6 (C18:2) siendo el contenido mínimo en comparación a los aceites de origen vegetal como el aceite de soya, girasol entre otros en donde se resalta su predominancia.

Tabla 07. Composición en ácidos grasos del aceite desodorizado de anchoveta

Ácido Graso	% Relativo
C14:0 Mirístico	8,17 ± 0,22
C15:0 Pentadecaenoico	0,54 ± 0,02
C16:0 Palmítico	17,93 ± 0,10
C16:1 Palmitoleico	9,02 ± 0,06
C17:0 Heptadecaenoico	0,46 ± 0,01
C18:0 Esteárico	3,44 ± 0,06
C18:1 ω-9 Oleico	9,14 ± 0,06
C18:1 ω-7 Vaccenico	2,97 ± 0,04
C18:2 ω-6 Linoleico	1,21 ± 0,01
C18:3 ω-3 α-Linolénico	0,83 ± 0,03
C18:4 ω-3 Estearidonico	2,57 ± 0,03
C20:0 Araquídico	0,23 ± 0,01
C20:1 ω-9 Eicosaenoico	0,99 ± 0,11
C20:3 ω-3 Eicosatrienoico	1,09 ± 0,09
C20:5 ω-3 Eicosapentaenoico(EPA)	18,59 ± 0,10
C22:1 ω-11 Cetoleico	0,73 ± 0,03
C22:5 ω-3 Clupadónico	2,23 ± 0,05
C22:6 ω-3 Docosahexaenoico(DHA)	12,45 ± 0,21

Fuente: Elaboración propia (2015)

Esta variada composición en ácidos grasos del aceite de pescado está fuertemente relacionada con la especie de pescado del cual fue obtenido, estación, área de captura, dieta, edad y madurez sexual (Carrizo, J. 1999; Kolakowska et al., 2003). Siendo la dieta el principal factor que contribuye en la composición de AGPI-CL, dado que especies como la anchoveta se alimentan principalmente de fitoplancton y zooplancton los cuales contienen

altas cantidades de EPA Y DHA, en consecuencia estos pasan a la cadena alimentaria en donde se acumulan(Zuidam & Nedovic', 2010).

3.3. Influencia del aislado proteico de soya en la estabilidad de la emulsión I (O/W)

La proteína y el aceite son dos importantes ingredientes en la elaboración de emulsiones alimenticias. El aceite dispersado en forma de pequeñas gotas esféricas es estabilizado físicamente en una fase acuosa por la proteína en una emulsión aceite en agua(O/W). En el estudio actual, se usó APS como MP debido a su alto valor nutritivo, contribución a la textura de los alimentos, buenas propiedades emulsionantes y bajo costo.

La obtención de una emulsión estable (emulsión I) es el primer paso en el proceso de microencapsulación(Bustamante et al.,2009) ; siendo este un requisito necesario para garantizar la estabilización exitosa de una emulsión múltiple(Cho & Park,2003). La EE hace referencia a la capacidad de la emulsión para resistirse al cambio de sus propiedades (distribución del tamaño de las gotas) a través del tiempo (Salager,1999).

En la Figura 14 se muestra los valores de la EE y en ella se puede apreciar que la estabilidad está fuertemente influenciada por la concentración del APS empleado en la formulación de las emulsiones. La EE se incrementa de 27.04 % a 84.44 % al aumentar la cantidad del APS de 2.5 % a 10 %, evidenciándose una diferencia significativa ($p<0.05$) de la EE al incrementar la concentración de proteína.

Al incrementar la cantidad APS mejora la adsorción y la cobertura superficial de las gotitas de aceite que permiten inhibir la agregación de las gotas. Al parecer la mayor estabilidad de las emulsiones obtenidas al trabajar con altas concentraciones de proteína de soya podría estar relacionada con la formación de una red de proteína agregada que atrapa las gotitas de aceite evitando así la desestabilización.

Al respecto Hwang et al.(1992) encontró que al incrementar la concentración de proteína se favorece la formación y la estabilidad de la emulsión. Esto podría deberse a que la proteína posee grupos hidrofílicos e hidrofóbicos que se absorben en la interface

O/W actuando como emulsionante, disminuyendo la tensión superficial y formando una barrera para evitar la coalescencia de las gotas (Hung & Zayas, 1992; Risch & Reineccius, 1988 citados por Cho et al.,2003; Kinsella,1976; Lam & Nickerson, 2013).

Al respecto Cho et al.(2003) menciona que la estabilización de las emulsiones empleando APS está relacionada a la complejidad de las estructuras terciarias y cuaternarias de las 2 principales fracciones de globulinas presentes (7S y 11S).

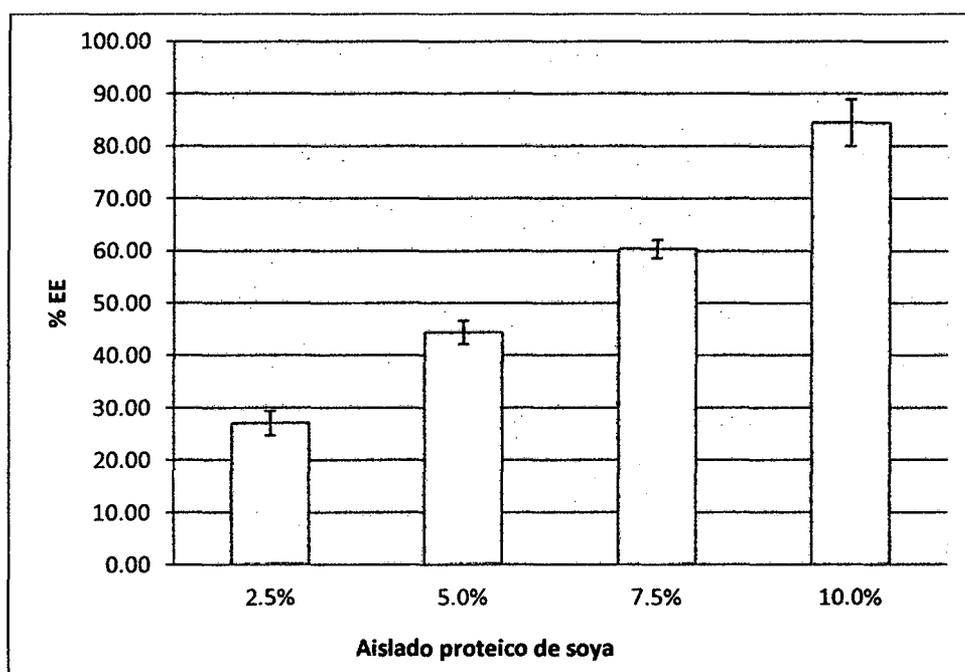


Figura 14. Efecto del aislado proteico en la estabilidad de la emulsión

Fuente: Elaboración propia (2015)

La baja estabilidad de las emulsiones preparadas con menores concentraciones de APS podría estar relacionado con la baja viscosidad de las mismas y con el despliegue de las moléculas de proteína en la superficie de las gotitas de aceite, lo que aumenta la interacción proteína-proteína que conducen a una disminución en la estabilidad de las emulsiones Dickinson & Matsumura (1991). Así mismo la baja estabilidad encontrada al trabajar con menores concentraciones de proteína se relaciona con la acción de la fuerza

centrífuga que acelera la desestabilización de las emulsiones teniendo en cuenta que estas mismas emulsiones almacenadas en condiciones ambientales se mantuvieron estables por más de un día.

En esta etapa se estableció trabajar a una concentración de APS del 10 % debido alta EE encontrada. Usar concentraciones superiores al 10 % de APS en solución dificulta la preparación de las emulsiones debido al incremento de la viscosidad que dificulta la emulsificación con el equipo usado.

A estas emulsiones se les determinó la cantidad de aceite libre que no pudo ser emulsificado, mediante el método de extracción con éter de petróleo, los resultados encontrados (0.34 %) guardan relación con los encontrados por Flores (2006) al trabajar con 2% lecitina y 3% suero de mantequilla. La cantidad de aceite no emulsificado guarda relación con la estabilidad física y compromete la estabilidad oxidativa de las emulsiones, dado que estas son más proclives a la oxidación al no estar la grasa protegida por el emulsionante. El principio de este método consiste en que la capa superficial formada por la proteína alrededor de las gotas de aceite protege la grasa emulsionada del acceso del solvente y solamente la no emulsificada o desestabilizada es disuelta y extraída por el solvente.

3.4. Influencia de la enzima transglutaminasa activa (TG-K) en la estabilidad de la emulsión I (O/W)

Las emulsiones son consideradas como sistemas termodinámicamente inestables que tienden a desestabilizarse en el tiempo. En ese sentido obtener una emulsión que perdure con las características deseadas a través de un determinado tiempo, es complicado y lo es más cuando se adicionan otros aditivos. Las emulsiones formadas con APS al 10% y emulsificados con el equipo Silent Crusher vieron afectadas su estabilidad al adicionarle la enzima transglutaminasa TG-K tal como se puede apreciar en la Figura 15. La EE disminuyó considerablemente de 84.44 % a 31.85 % al incrementar la cantidad de enzima añadida de 0 % a 0.8 % respectivamente. Las emulsiones que contenían 0.8% de enzima

transglutaminasa gelificaron y liberaron agua aspecto que repercutió negativamente en la estabilidad de las emulsiones debido a que el método mide cantidad de agua liberada.

Los resultados evidencian una marcada disminución de la EE al incrementar la cantidad de enzima transglutaminasa TG-K, aspecto que también pudo verse influenciado por los demás ingredientes acompañantes de la enzima transglutaminasa (Lactato de calcio, maltodextrina y otros) declarados en la ficha técnica del producto.

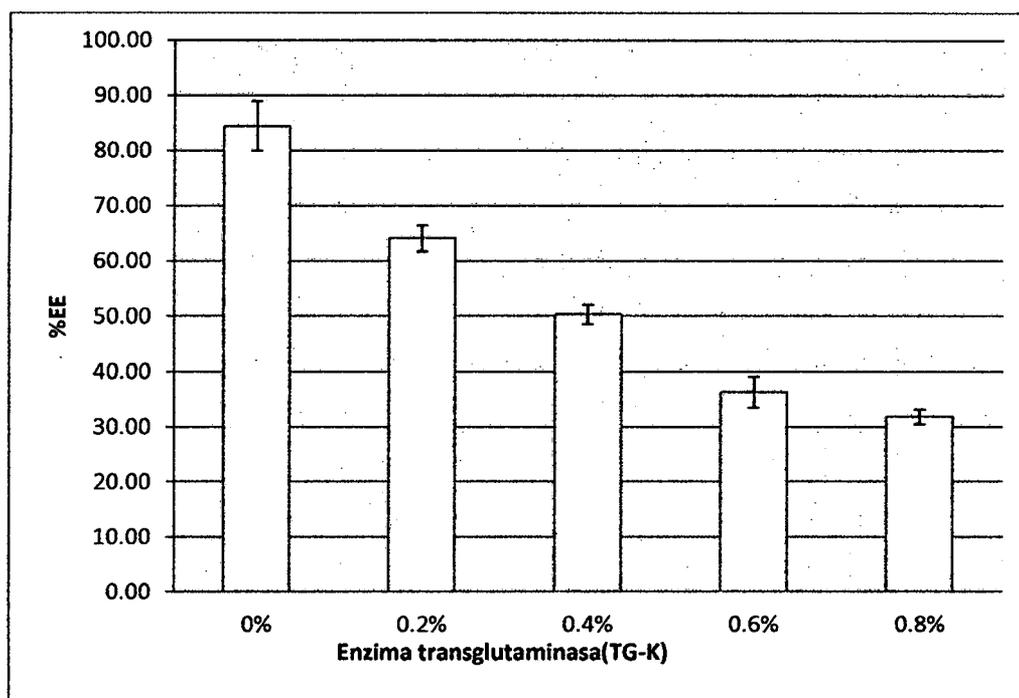


Figura 15. Influencia de la enzima transglutaminasa en la estabilidad de la emulsión I

Fuente: Elaboración propia (2015).

La gelificación de la proteína contenida en las emulsiones durante la evaluación de la EE mediante pruebas aceleradas por centrifugación fue marcadamente promovida por la adición de la enzima transglutaminasa, debido a que las emulsiones a las cuales no se les adicione la enzima no presentaron la formación de geles. Algo similar fue reportado por Cho et al.(2003) al elaborar emulsiones encontró que la formación de geles era promovido por la enzima transglutaminasa. Al respecto Caillard et al.(2008) reporta la formación de

geles por la acción de la enzima transglutaminasa cuyas características van a depender de la composición y concentración de proteína, así como de la concentración de la enzima transglutaminasa; así mismo hace referencia que la gelificación por la acción de la enzima transglutaminasa permite formar hidrogeles con propiedades que difieren de los obtenidos con otros métodos.

Dickinson et al.(1999) citado por Sharma et al.(2002) hicieron mención a que el entrecruzamiento con transglutaminasa previo a la etapa de emulsificación moderadamente incrementa la estabilidad de la emulsión elaborada con caseinato de sodio; sin embargo también acotaron que el entrecruzamiento después de la emulsificación mejora la EE en intervalos cortos de tiempo, pero en términos largos la EE se ve afectada significativamente. En general es limitada la información publicada sobre las características de las emulsiones estabilizadas con proteínas reticuladas con la enzima transglutaminasa.

3.5. Efecto de las condiciones de emulsificación de la emulsión II (O/W/O) en el contenido aceite de pescado encapsulado.

Al estudiar simultáneamente el efecto del tiempo y velocidad de emulsificación sobre contenido de aceite de pescado microencapsulado se evidenció que las condiciones de emulsificación de la emulsión II afectaron significativamente el contenido de aceite de pescado (% EPA+DHA) de las microcápsulas ($p < 0.05$).

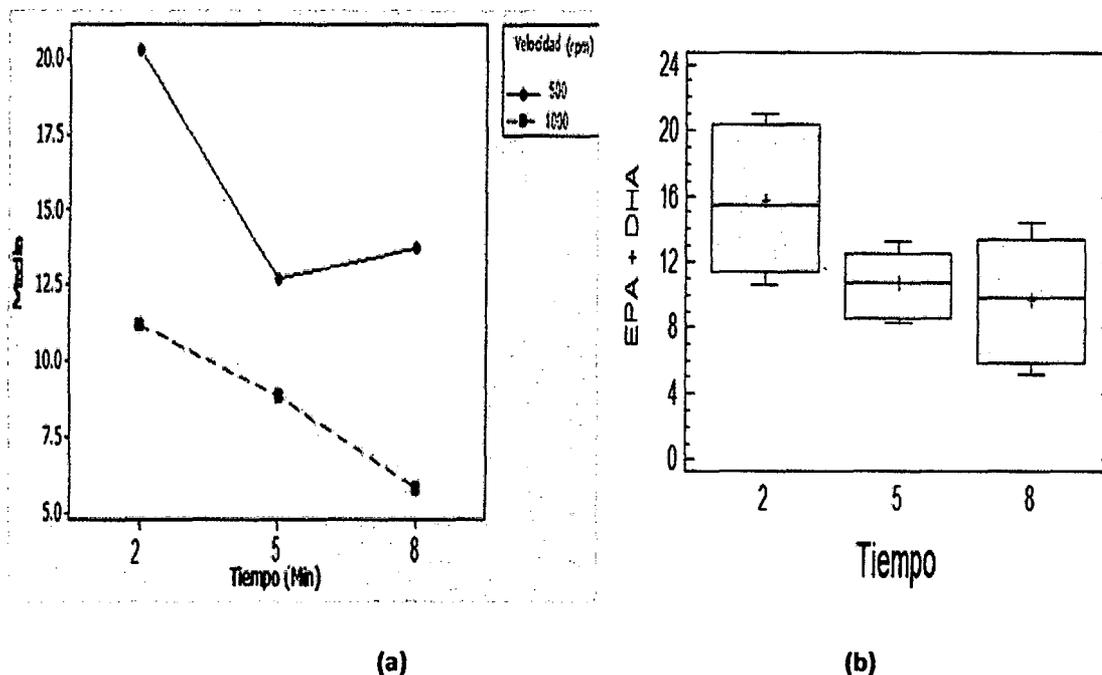


Figura 16. (a) Grafica de Interacción para EPA+DHA en las microcápsulas y (b) diagrama de cajas

Fuente: Elaboración propia (2015).

El p-valor de cada uno de los factores (tiempo y velocidad) y el de la interacción tiempo velocidad resultaron $p < 0.05$, lo cual comprueba la importancia estadística de cada uno de los factores a un nivel de significancia del 95 % sobre el contenido de aceite microencapsulado.

Según el perfil lipídico del aceite microencapsulado obtenido mediante cromatografía de gases, haciendo énfasis en el contenido de ácidos grasos omega-3(% EPA+DHA) debido a que son los ácidos grasos predominantes en el aceite de pescado se encontró que, el mayor contenido de aceite de pescado (20.26 % EPA + DHA) en las microcápsulas se obtuvo al aplicar una velocidad de emulsificación de 500 rpm durante 2 minutos, al aumentar la velocidad y el tiempo de emulsificación de 500 rpm a 1000 rpm durante 5 minutos y 8 minutos se evidencia una disminución drástica del contenido de aceite de

pescado en las microcápsulas. Lo cual se ve reflejado de una forma más clara al comparar el efecto del tiempo en la cantidad de aceite de pescado microencapsulado (Figura 16b)

La disminución del porcentaje de EPA + DHA encapsulado en las microcápsulas probablemente esté relacionado con el esfuerzo cortante excesivo al que se vio sometida la emulsión I durante la emulsificación II, aspecto que pudo haber repercutido en el debilitamiento y posterior ruptura de la membrana proteica que encapsula al aceite de pescado de algunas gotas (microcápsulas), sobre todo de las de mayor tamaño. Al romperse la membrana proteica, por una parte el núcleo se libera y pasa a la fase continua (aceite vegetal) externa y por otra parte el aceite vegetal probablemente se emulsifica nuevamente formando un núcleo diluido que se ve reflejado en menor porcentaje de EPA+DHA en las microcápsulas. El incremento del contenido del ácido graso omega-6 (C18:2, Linoleico) y la disminución del contenido de EPA+DHA confirman la inclusión del aceite vegetal en el interior de las microcápsulas. Al respecto Benichou et al. (2007) mencionaron que durante la formación de la doble emulsión, algunas de las gotitas de la emulsión primaria O/W colapsaron y una parte de la fase interna de aceite puede ser liberada o difundirse en la fase de aceite externa.

Skwierinski & Cardenas (2007) reportaron que las posibles razones del rompimiento de la membrana tiene que ver con el hinchamiento de las gotas de fase interna contenidas dentro de los glóbulos, el sometimiento de las gotas a un esfuerzo cortante excesivo o bien, una formulación inadecuada.

Cho et al.(2003) hace referencia a una menor retención del núcleo en las microcápsulas obtenidas debido a pérdidas del núcleo durante la formación de la doble emulsión O/W/O , durante la etapa de entrecruzamiento y durante la etapa lavado. Sin embargo no dan referencia sobre el perfil lipídico del núcleo encapsulado, que permita evidenciar un posible encapsulamiento también del aceite vegetal empleado en la segunda emulsificación aspecto que constituye una limitante.

Las pérdidas del núcleo durante la etapa de lavado podrían atribuirse tanto a la remoción de gotitas de núcleo de la superficie exterior de las microcápsulas húmedas y en

cierta extracción del núcleo del interior de las microcápsulas por un mecanismo de difusión (Lee & Rosenberg, 2000b).

En general factores como la estabilidad de la emulsión, el tipo de agente encapsulante y el método de encapsulación determinan la retención de compuestos hidrofóbicos en una microcápsula (Pierucci et al., 2007).

3.6. Influencia de la relación núcleo: material de pared en el contenido de aceite de pescado y en las características de secado de las microcápsulas.

Para aplicaciones específicas particularmente las nutricionales y las farmacéuticas diferentes contenidos del núcleo en las microcápsulas son necesarias. Con este propósito se buscó obtener microcápsulas con una mayor cantidad de aceite encapsulado para lo cual se probaron tres relaciones de N: MP. El análisis de varianza aplicado a las relaciones ensayadas evidenció que las relaciones evaluadas influyen significativamente ($p < 0.05$) en el contenido de aceite de pescado microencapsulado. Es decir son estadísticamente diferentes y se obtienen diferentes contenidos de aceite de pescado microencapsulado al menos con alguna de las relaciones estudiadas (Tabla 08).

Tabla 08. Contenido de aceite de pescado (% EPA+DHA) en las microcápsulas.

Relación Núcleo: Material de pared		
4:1	1:1	1:2
26,16 a	21,48 b	19,55 b
24,36 a	21,06 b	21,30 b
26,59 a	22,39 b	22,71 b
25,93 a		

Fuente: Elaboración propia (2015)

Al realizar las comparaciones múltiples a los distintos tratamientos se determinó que al emplear la proporción de 4:1 se obtuvo el mayor contenido de aceite de pescado

encapsulado (25.76 % EPA + DHA) comparado con las proporciones 1:1 y 1:2, aspecto que fue positivo pues era lo que se buscaba, sin embargo las microcápsulas obtenidas con esta proporción resultaron ser frágiles y no resistieron la prueba de secado por liofilización (Figura 17 a).

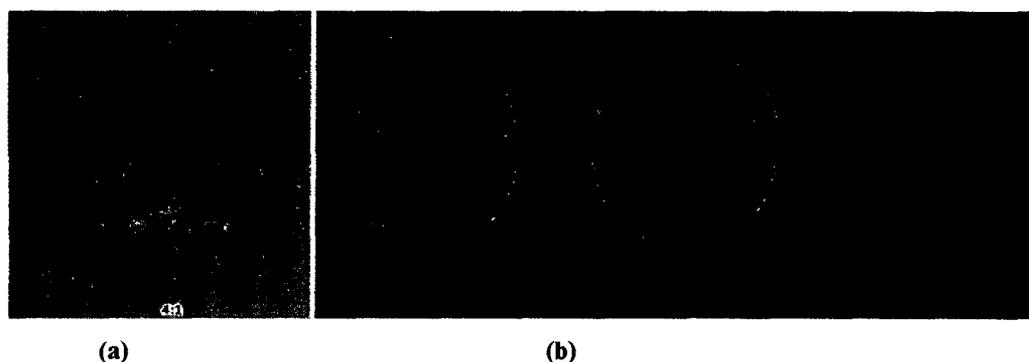


Figura 17. Microcápsulas obtenidas: (a) relación N:MP (4:1) y (b) relaciones 1:1 y 1: 2

Fuente: Elaboración propia (2015).

Durante las dos primeras horas del secado por liofilización de las microcápsulas, no se observó ningún cambio aparente en el color, sin embargo a partir de la tercera hora de secado, las microcápsulas pasaron de color blanco a un color amarillo indicativo de un colapso estructural de las microcápsulas. Probablemente la menor cantidad de material de pared empleado inicialmente resultó ser insuficiente para formar una capa densa de absorción alrededor del núcleo que si era abundante, teniendo en cuenta que se trató de una relación cuatro de núcleo y solo uno de material de pared, dando como resultado microcápsulas poco consistentes que no pudieron resistir el secado.

Al emplear las proporciones 1:1 y 1:2 los resultados estadísticamente no presentaron diferencias significativas, es decir presentaron similares resultados en cuanto a contenidos de aceite de pescado encapsulado, sin embargo las características visuales del polvo si variaron. Las microcápsulas obtenidas al emplear la proporción 1:2 presentaron mejores características en cuanto a forma y color que las microcápsulas obtenidas empleando la proporción 1:1. Por lo que se optó por trabajar con esta proporción.

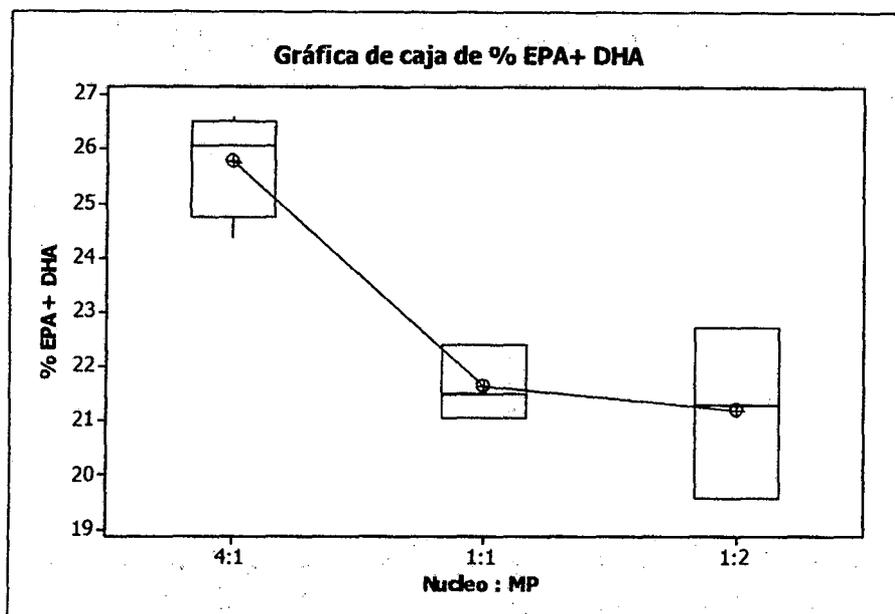


Figura 18. Diagrama de cajas de las proporciones de Núcleo: Material de pared usadas en la elaboración de microcápsulas

Fuente: Elaboración propia (2015)

Una representación esquemática de las diferencias encontradas en cuanto al aceite encapsulado en función a la relación ensayada se puede visualizar en el diagrama de cajas (Figura 18).

La mayoría de investigaciones revisadas en microencapsulación de aceites de pescado no hacen mención sobre cantidad de aceite encapsulado, sino más bien hacen referencia a la eficiencia de encapsulación del aceite debido a las relaciones N:MP obtenidas de acuerdo al método que podría ser atomizado, liofilizado, etc, estos métodos implican solo una emulsificación y la emulsión producida es automáticamente secada y no pasa a una segunda emulsificación como es nuestro caso. Por lo que la eficiencia de encapsulación reportada por las mismas es alta debido que casi todo el aceite es encapsulado. Por otro lado las microcápsulas obtenidas en su mayoría por estos métodos son altamente higroscópicas siendo esta una de sus desventajas. Sin embargo las microcápsulas producidas mediante doble emulsificación con reticulación con transglutaminasa tienen el plus de ser más resistentes al ataque de la humedad dado que su solubilidad es baja, siendo este un aspecto positivo de la técnica ensayada.

3.7. Caracterización de las microcápsulas

El contenido de humedad es un factor crítico en las microcápsulas formadas. El elevado contenido de humedad incrementa la viscosidad y pegajosidad de las partículas en el polvo aspecto que contribuye al apelmazamiento y la liberación y/o oxidación del núcleo (Beristain et al., 2002; Drusch et al., 2006 ; Le Meste et al., 2002, Partanen et al., 2005 citados por Wang et al.,2011). Las microcápsulas presentaron un contenido de humedad de 2.1 % en promedio (Tabla 09), un contenido bajo pero que es cercano a los resultados (2.24 %- 2.89%) publicados por Bae & Lee (2008) al obtener microcápsulas con proteínas de suero de leche.

Al respecto de la humedad, la industria alimentaria ha especificado que los polvos secos deben tener un contenido de humedad entre el 3% y el 4% (Masters 1991 citados por Legako & Turgut, 2010). El contenido de humedad de las microcápsulas obtenidas en este estudio está por debajo al límite inferior establecido, sin embargo para fines prácticos no se trata de una variación considerable. Por otro lado Wang et al. (2011) obtuvieron microcápsulas con proteína de cebada con contenidos de humedad de 0.75 a 0.90 %, estos resultados son mucho más bajos a los nuestros y son atribuidos a la naturaleza hidrofóbica de la proteína que excluye al agua de la matriz proteica.

La estabilidad física, química y microbiana depende en gran medida del contenido de agua, y esta a su vez está muy relacionada con la a_w . El concepto de actividad de agua ha sido usado como una evaluación fiable del crecimiento microbiano, oxidación lipídica, pardeamiento enzimático así como para la actividad enzimática en los alimentos. La a_w de las microcápsulas fue de 0.137 como era de esperar las microcápsulas presentaron baja actividad de agua debido principalmente a que la microcápsulas luego de ser lavadas con etanol que por si es un deshidratante posteriormente fueron secadas por liofilización. Estos valores se encuentran por debajo a lo reportado (0.21) por otros investigadores (Legako & Turgut,2010) al obtener microcápsulas de aceite de pescado con proteína de suero.

Tabla 09. Principales características de las microcápsulas

Propiedades de las microcápsulas	valores
Humedad (%)	2.1 ± 0.4
Actividad de agua (aw)	0.137 ± 0.024
Grasa Cruda (%)	24.6 ± 2.1
EPA+DHA (%)	21.3 ± 3.2
Solubilidad(mg/100g)	24.8
Eficiencia encapsulación (%)	43 ± 4
Color (L* ; a* ; b*)	81.78 ; 1.07 ; 17.63

Fuente: Elaboración propia (2015)

Las microcápsulas presentaron en promedio 24.6 % de grasa cruda (aceite encapsulado) valor bajo comparado con los 50 % - 60 % reportado por Gan et al. (2008) al obtener microcápsulas de aceite de pescado con proteína de soya reticulado a la vez con la enzima transglutaminasa y con el azúcar reductor ribosa, cabe resaltar que en este caso no se realizó una doble emulsificación, razón por la cual se obtuvo un alto contenido de aceite microencapsulado. El aceite microencapsulado presentó 21.3 % de EPA +DHA en promedio.

La eficiencia de encapsulación es un indicador apropiado para evaluar la calidad de las microcápsulas obtenidas y se calcula a partir de la relación entre el material activo encapsulado y el teórico o en disposición de ser encapsulado. Una de las razones de la baja eficiencia (43 %) encontrada podría estar relacionada con el gran tamaño de las gotas formadas con el equipo Silent Crusier tipo ultraturrax durante la elaboración de la emulsión, al respecto Heinzelmann et al.(2000) reportó que el bajo rendimiento (29.4 %) obtenido en uno de los tratamientos de microencapsulación podría estar explicado por tamaño grande de las gotas formadas inicialmente al elaborar emulsiones con un equipo de homogenización con una sola pasada y a baja presión. Sin embargo al incrementar el número de pases y la presión de homogenización el rendimiento o eficiencia de microencapsulación muestra valores comprendidos entre 68.9 % y 79.0 % lo cual representó una mejora.

Un comportamiento similar en relación al tamaño de la gota de aceite y una menor eficiencia de encapsulación fueron observado por Velasco et al. (2006); Velasco et al. (2000) al trabajar con un homogeneizador de rotor/estator en la elaboración de sus emulsiones, a base de aceite de girasol y aceite de pescado. De igual forma Flores (2006) encontró al elaborar emulsiones a base de aceite de pescado con ultraturrax, homogeneizador de presión y microfluidizador, tamaños grandes de los glóbulos de grasa al usar el ultraturrax, así mismo los tamaños de los glóbulos grasos disminuyeron al usar el homogeneizador de presión y el microfluidizador.

Lee & Rosenberg (2000a) obtuvieron un rendimiento superior al 90% en todos los tratamientos ensayados al microencapsular grasa de leche mediante doble emulsificación con posterior gelificación con calor. Sin embargo mencionan que obtuvieron un rendimiento inferior al microencapsular grasa de leche mediante doble emulsificación y entrecruzamiento químico con glutaraldehído (Lee & Rosenberg, 2000b).

Cho et al. (2003) reportaron que se obtiene una menor retención del núcleo al encapsular aceite de pescado mediante un proceso de gelificación enzimática usando proteínas entrecruzadas con transglutaminasa, en comparación a las microcápsulas obtenidas por atomizado. La baja retención del núcleo fue atribuida al prolongado tiempo (4 h) de entrecruzamiento al que se vio sometida la proteína.

La proteína de soya ha demostrado ser buen sustrato para actividad de la enzima transglutaminasa (Cho et al.,2003; Yasir et al.,2007). Una evidencia de la acción de la enzima sobre la proteína se ve reflejada en la disminución solubilidad en agua de la proteína como consecuencia del entrecruzamiento enzimático. Nuestro resultado de solubilidad de las microcápsulas (24.8 mg de proteína disuelta por cada/100 g de microcápsulas) de algún modo así lo demuestran. Sin embargo solubilidades más bajas a 10 mg de proteína soluble/100g de microcápsulas se han publicado por Cho et al.(2003), estas diferencias están relacionas con la eficiencia del entrecruzamiento enzimático, pureza de la enzima y temperatura de incubación(Lee & Rosenberg 2000a).

Gan et al.(2008) determinaron que la disminución de solubilidad de la proteína está relacionada con el entrecruzamiento proteico debido la formación de proteína polimerizada que es insoluble como consecuencia de la presencia de enlaces covalentes del entrecruzamiento(ϵ -(γ -glutamyl) lysine).

En relación a los parámetros de color de las microcápsulas se observó valores de 81.78 para L*, de 1.07 para a* y de 17.63 para b*. El alto valor de L* evidencia de que las microcápsulas tienden al color blanco. Valores cercanos se reportan para harina de tapioca (L*=86.2) (Von Atzingen & Machado,2005).

CONCLUSIONES

- ❖ El aceite de anchoveta desodorizado usado en la presente investigación fue de óptima calidad, las principales características fisicoquímicas: Índice de yodo de 192.4 g de yodo/100g, acidez 0.05 % de ácido oleico, Índice peróxido 0.10 mg peróxido/kg y 31.4 % de EPA + DHA.
- ❖ La estabilidad física de la emulsión I se vio influenciado por el nivel de empleo del MP y de la enzima transglutaminasa, la estabilidad de la emulsión empleando un 10 % de MP fue de 84.44 % y disminuyó a 31.85 % al adicionarle 0.8 % de enzima transglutaminasa.
- ❖ El contenido de FO de las microcápsulas se vio influenciado por las condiciones de emulsificación (tiempo y velocidad) durante la emulsificación II, se obtuvo un 20.26 % de EPA y DHA al emulsificar durante 2 min a una velocidad de 500 rpm en la doble emulsificación, siendo este el valor más alto encontrado. Al incrementar el tiempo y la velocidad disminuye el contenido de aceite en las microcápsulas.
- ❖ Las relaciones N: MP influyen en el contenido de FO de las microcápsulas. Se obtienen altos valores (25.76 % EPA +DHA) de aceite en la microcápsulas al incrementar el nivel del núcleo, sin embargo se obtienen microcápsulas frágiles. Por lo que se optó por trabajar con una relación de 1:2 dado que estas presentan un contenido similar de aceite a la relación 1:1. Pero con mejores características de color.
- ❖ Las principales características de las microcápsulas fueron. 2.1 % de humedad, 0.137 de a_w , 24.6 % de grasa cruda, 21.3 % de EPA + DHA. Las microcápsulas presentaron una solubilidad de 24.8 mg/100g de microcápsulas y 43 % de eficiencia de encapsulación.

RECOMENDACIONES

- ❖ Usar otros equipos de homogenización más eficientes con la finalidad de incrementar la estabilidad de la emulsión I en combinación con otros emulsificantes como materiales de pared, usando transglutaminasa pura con la finalidad de mejorar la eficiencia de encapsulación.
- ❖ Realizar el estudio de la estabilidad oxidativa de las microcápsulas para determinar el tiempo de vida útil de la misma.
- ❖ Usar las microcápsulas en ensayos de fortificación en alimentos de consumo masivo de corta vida útil con la finalidad de contribuir a la ingesta de ácidos omega-3 de origen marino.

BIBLIOGRAFIA

1. AOAC. 2005. **Official Methods of Analysis**. 18th ed. rev. 2, 2007. Washington, DC.
2. Ackman, R.; Macpherson, E. 1991. **Oxidation susceptibility of encapsulated fish oil products: a comparison of triglycerides versus free fatty acids. Omega 3 news unsaturated fatty acids and health**. 6(2):1-5 p.
3. Augustin, M.; Hemar, Y. 2009. **Nano and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients**. Chem. Soc. Rev. 38: 902-912 p.
4. Augustin, M.; Sanguansri, L.; Margetts, C. ; Young, B. 2001. **Microencapsulation of food ingredients**. Food Australian. v.56: 220 p.
5. Allen, D. 1995. **Fish oil compositions** In Hamilton R and Rice R. Fish oil Technology, Nutrition and Marketing. Wycombe. Barnes and associates.
6. Bae, E. ; Lee, S. 2008. **Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin**. Journal of Microencapsulation, 1-12.
7. Becher, P. 1985. **Encyclopedia of Emulsion Technology**. M.Dekker, N.York.
8. Belitz, D.; Grosch, W.; Schieberle, P. 2009. **Food Chemistry**. 4th. Rev. Springer-Verlag Berlin.
9. Benichou, A. ; Aserin, A. 2008. **Recent Developments in O/W/O Multiple Emulsions**. In Aserin, A. **Multiple Emulsions. Technology and Applications**. John Wiley & Sons. New Jersey.
10. Benichou, A.; Aserin, A.; Garti, N. 2007. **O/W/O double emulsions stabilized with WPI-polysaccharide conjugates**. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. Volume 297, Issues 1-3.
11. Bimbo, 2013. **Sources of omega-3 fatty acids** In Jacobsen, C.; Nielsen, N.; Frisenfeldt, A.; Moltke A-D. **Food enrichment with omega-3 fatty acids**. Woodhead Publishing. Oxford.
12. Buffo, R.; Reinneccius, G. 2001. **Comparison among assorted drying processes for the encapsulation of flavours**. Perfumer and Flavorist. 26, 58-67 p.

13. Bustamante, A.; Masson, L.; Velasco, J.; Dobarganes, M.; Chávez, J; Robert, P. 2009. **Encapsulación por liofilización de oleorresina de astaxantina obtenida de *Haematococcus pluvialis* con almidón modificado.** XIII Congreso Latinoamericano de Grasas y Aceites. Argentina, Rosario, Noviembre 2009.
14. Calvo,P.; Castaño,A.; Lozano,M.; Gonzales-Gomez, D. 2012. **Influence of the microencapsulation on the quality parameters and shelf-life of extra-virgin olive oil encapsulated in the presence of BHT and different capsule wall components.** Food Research International 45: 256–261.
15. Carrero, J.; Martín-Bautista,E.; Baró, L.; Fonollá,J.; Jiménez, J.; Boza, j.; López-Huertas, E. 2005. **Alimentos funcionales: Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta.**
16. Carrizo, J. 1999. **El aceite de pescado: Sus propiedades.** Aceites y grasas. 407-408 p.
17. Connor, W. 2000. **Importance of n-3 fatty acids in health and disease.** Am J Clin Nutr. 71:171S-175S.
18. Cho, Y.; Shim, K.; Park, J. 2003. **Encapsulation of fish oil by an enzymatic gelation process using transglutaminase cross-linked proteins.** Journal of Food Science, 68: 2717–2723.
19. Cho,Y. ; Park, J.2003. **Evaluation of Process Parameters in the O/W/O Multiple Emulsion Method for Flavor Encapsulation.** Journal of Food Science. 68: 2.
20. Damodaran,S.;Parkin,K.; Fennema,O. 2008. **Fennema química de los alimentos.** 3ra Ed. CRC Press. Boca raton.
21. De Deckere, E.; Korver, O.; Verschuren, P.; Katan, M. 1998. **Health aspects of fish and n-3 polyunsaturated fatty acids from plant and marine origin.** Eur J Clin Nutr, 52:749-753 p.
22. Desai, K.; Park, H. 2005. **Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients.** Drying Technology, 23: 1361–1394 p.
23. Dickinson, E. 2003. **Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems.** Food Hydrocolloids 17: 25-39 p.

24. Dickinson, E.; Matsumura, Y. 1991. **Time-dependent polymerization of β lactoglobulin through disulphide bonds at the oil–water interface in emulsions.** *International Journal of biology and Macromolecules*, 13(1). 26-30 p.
25. Domingo, J. 2007. **Review: Omega-3 fatty acids and the benefits of fish consumption: Is all that glitters gold?.** *Environment International* 33. 993–998 p.
26. Drusch, S.; Regier, M.; Bruhn, M. 2012. **Recent Advances in the Microencapsulation of Oils High in Polyunsaturated Fatty Acids.** In McElhatton,A.; Amaral, P. **Novel Technologies in Food Science: Their Impact on Products, Consumer Trends and the Environment.** Springer Science. New York.
27. Escalona, S. 2004. **Encapsulados de Luteína-Enocianina y su aplicación en alimentos.** Memoria para optar al título de Ingeniero en Alimentos. Universidad de Chile.
28. Fang, Z.; Bhandari,B.2012. **Spray drying, freeze drying and related processes for food ingredient and nutraceutical encapsulation.** In Garti, N.; McClements,D. **Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals.** Woodhead Publishing.
29. Flores, E. 2006. **Estabilización de emulsiones alimentarias, aceite de pescado en agua en función del procesado y del contenido de emulsificantes estabilizantes y antioxidantes.** Asamblea Nacional de Rectores. Lima. Peru.
30. García, G.; González, M.; Ochoa, M.; Medrano,H. 2004. **Microencapsulación del jugo de cebada verde mediante secado por aspersion.** *Revista Ciencia y Tecnología Alimentaria* 4(4): 262-266 p.
31. Gharsallaoui, A.; Roudaut, G.; Chambin, O.; Voilley, A.; Saurel, R. 2007. **Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview.** *Journal Food Research International* 40: 1107–1121.
32. Guevara, J. 2009. **Enriquecimiento de la carne de cuy con ácidos grasos omega-3 mediante la suplementación de las dietas con aceite de pescado y semillas de Sacha Inchi.** Tesis de doctorado en ciencia animal, Universidad Nacional Agraria la Molina. Perú.

33. Gouin, S. 2004. **Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends.** Trends in Food Science and Technology. 15, (7-8): 330-347.
34. Hae-Soo, K. 2014. **Overview of Nano and microencapsulation for foods** In Hae-Soo, K. **Nano and microencapsulation for foods.** Wiley-Blackwell. Korea.
35. Heinzelmann, K.; Franke, K. 1999. **Using freezing and drying techniques of emulsions for the microencapsulation of fish oil to improve oxidation stability.** Colloids and surfaces: Biointerfaces. 12, 223-229.
36. Heinzelmann, K.; Franke, K.; Velasco, J. ; Marquez-Ruiz, G. 2000. **Microencapsulation of fish oil by freeze-drying techniques and influence of process parameters on oxidative stability during storage.** Eur food Res Technol 211:234-239 p.
37. Hung, S.; Zayas, J. 1992. **Emulsifying capacity and emulsion stability of milk proteins and corn germ protein flour.** Journal of Food Science. 56. 5. 1216-1218
38. Hwang, J.; Kim, Y.; Pyun Y. 1992. **Effect of protein and oil concentration on the emulsion stability of soy protein isolate.** J Korean Agric Chem Soc 35(6):457-461.
39. Ismail, H. 2005. **The role of omega-3 fatty acids in cardiac protection: an overview.** Frontiers in Bioscience. 10: 1079-1088.
40. Jensen C. 2006. **Effects of n-3 fatty acids during pregnancy and lactation.** Am J Clin Nutr. 83(suppl):1452S-1457S.
41. Kamal-Eldin, A. 2003. **Lipid Oxidation Pathways.** AOCS press. Champaign Illinois. EE.UU.
42. Kinsella, J. 1976. **Functional properties of food proteins: a review.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 7:219-280 p.
43. Kolakowska, A.; Olley, J.; Dunstan, G. 2003. **Fish lipids.** in Sikorski, Z.; Kolakowska, A. **Chemical and functional properties of food lipids.** CRC Press LLC. Boca Raton, Florida.

44. Kolanowski, W.; Laufenberg, G.; Kunz, B. 2004. **Fish oil stabilisation by microencapsulation with modified cellulose.** *International Journal of Food Sciences and Nutrition.* 55: 333 -343
45. Kuang, S.; Oliveira, J. ; Crean, A. 2010 **Microencapsulation as a Tool for Incorporating Bioactive Ingredients into Food.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition,* 50:10, 951-968
46. Lakkis, J. 2007. **Encapsulation and controlled release Technologies in food systems.** Blackwell Publishing. Iowa. EE.UU. 3-9 p.
47. Lam,R.; Nickerson,M. 2013. **Review Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure–function approach.** *Food Chemistry* 141:975–984
48. Lee, S.; Ying, D. 2008. **Encapsulation of fish oils.** In Garti, N. **Delivery and controlled release of bioactives in foods and nutraceuticals.** CRC press Boca raton. Cambridge England.
49. Lee, S.; Rosenberg, M. 2000a. **Whey protein-based microcapsules prepared by double emulsification and heat gelation.** *Lebensm-Wiss Technol* 33:80.
50. Lee S.; Rosenberg, M. 2000b. **Preparation and some properties of water-insoluble, whey protein based microcapsules.** *J Microencaps* 17:29–44 p.
51. Legako, J.; Dunford, N. 2010, **Effect of Spray Nozzle Design on Fish Oil–Whey Protein Microcapsule Properties.** *Journal of Food Science,* 75: E394–E400
52. Lozano, M. 2009. **Obtención de microencapsulados funcionales de zumo de Opuntia stricta mediante secado por atomización.** Tesis de Ingeniero Industrial Universidad Politécnica de Cartagena, Colombia.
53. McCowen, K.; Bistrain, B. 2005. **Essential fatty acids and their derivatives.** *Curr. Opin. Gastroenterol.* 21 (2), 207-215.
54. McClements,D. 1999. **Food Emulsions. Principles, Practice and Techniques.** CRC Press LLC. Boca Raton, Florida.
55. McClements, D. 2015. **Nanoparticle and Microparticle Based Delivery Systems Encapsulation, Protection and Release of Active Compounds.** CRC Press. Taylor Francis Group. Boca Raton.

56. Mehlenbacher, V. 1979. **Análisis de grasas y aceites**, Enclopedia de la Química Industrial, Tomo 6 (1ª Edn.) Urmo, Bilbao.
57. Michelsen, B.; Madsen, S.; Gotfredsen, P., 2001. **Polyunsaturated fatty acids, in Guide to Functional Foods**. Young, J., Ed., Leatherhead Publishing, Surrey, England, p. 141.
58. Minemoto, Y.; Adachi, S.; Matsuno, R. 1997. **Comparison of oxidation of menthyl linoleate encapsulated with gum arabic by hot air-drying and freeze drying**. *J agric Food Chem.* 45, 4530-4534.
59. Muñoz, J.; Alfaro, M.; Zapata, I. 2007. **Avances en la formulación de emulsiones**. *Grasas y Aceites* 58(1). 64-73.
60. Muggli, R., 2001. **Health benefits of long-chain polyunsaturated fatty acids**, *Food Technol. Int.*, 22, 24
61. Nelson G. 1991. **Health effects of dietary fatty acids of fish oils**. *Food Technologie* v.40: 89-97 p.
62. Ordóñez, J.; Cambero, M.; Fernández, L; García, M.; García De Fernando, G.; De La Hoz, L.; Selgas, M. 1998. **Tecnología de los alimentos. Volumen II. Alimentos de origen animal**. Ed. Síntesis. Madrid. España.
63. Parra, R. 2010. **Revisión: Microencapsulación de Alimentos**. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín* 63(2):5669-5684.
64. Passos, M.; Ribeiro, C. 2010. **Innovation in Food Engineering New Techniques and Products**. CRC Press. Boca Raton. New York.
65. Piñeiro, G. 2009. **Contenido en ácidos grasos w-3 en dos especies de merluza "Merluccius capensis y Merluccius paradoxus" y su importancia en la prevención de enfermedades cardiovasculares**. Tesis de doctorado. Universidad de León. España.
66. Rahman, M. 2007. **Manual de Conservación de Alimentos**. Editorial Acribia. Zaragoza.
67. Rubio, N. 2011. **Supercritical fluid technology for extraction, concentration and formulation of omega-3 rich oils. A novel strategy for valorization of fish by-products**. Tesis de doctorado. Ingeniería química. Universidad de Burgos. España.

68. Ruxton, C.; Reed, S.; Simpson, M.; Millington, K. 2004. **The health benefits of omega-3 Polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence.** *J. Hum. Nutr. Dietet.*, 17, pp. 449–459
69. Sahena, F.; Zaidul, I.; Jinap, S.; Saari, N.; Jahurul, H.; Abbas, K.; Norulaini, N. 2009. **PUFAs in fish: Extraction, fractionation, importance in health.** *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety* 8. 59-74.
70. Salas, A.; Ayala, M.; Albretch-Ruiz, M. 2002. **Contenido de EPA Y DHA en aceite crudo de pescado producido en el Perú durante el periodo 1996-2000.** Instituto Tecnológico pesquero del Perú.
71. Salager, J. 1999. **Formulación, Composición y Fabricación de Emulsiones para obtener las propiedades deseadas. Estado del Arte.** Cuadernos FIRP S 747 A, B, C y D. Universidad de los Andes. Mérida.
72. Sanguansri, L.; Augustin, M. 2007. **Microencapsulation and Delivery of Omega-3 Fatty Acids.** In J. Shi (Ed.), **Functional Food Ingredients and Nutraceuticals: Processing Technologies.** CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton. New York.
73. Shahidi, F.; Han, X. 1993. **Encapsulation of food ingredients.** *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 33 501-547.
74. Seifried, B. 2010. **Physicochemical Properties and Microencapsulation Process Development for Fish Oil using Supercritical Carbon Dioxide.** Tesis de doctorado. Universidad de Alberta. Canada.
75. Seguro, K.; Kumazawa, Y.; Ohtsuka, T.; Toiguchi, S.; Motoki, M. 1995. **Microbial transglutaminase and ϵ -(γ -glutamyl) lysine crosslink effects on elastic properties of kamaboko gel.** *J Food Sci.* 60:305–311
76. Simopoulos, A. 2002. **The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids.** *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 56(8): 365-379.
77. Shahidi, F.; Finley, J. 2001. **Omega-3 Fatty Acids: Chemistry, Nutrition, and Health Effects.** Oxford University Press. V. 788.

78. Siscovick, D.; Raghunathan, T.; King, I.; Weinman, S. 1996. **Dietary intake and cell membrane levels of chain n-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of primary cardiac arrest.** J Am Med Assoc 274:1363-1367.
79. Sobel,R.;Versic,R.;Gaonkar,A. 2014. **Introduction to Microencapsulation and Controlled Delivery in Foods.** In Gaonkar,A.;Vasisht,N.;Khare,A.;Sobel,R. **Microencapsulation in the Food Industry A Practical Implementation Guide.** Academic Press. Elsevier. EE.UU.
80. Sosa, C. 2000. **Influencia de dos métodos de extracción de un aislado proteico de lupino (*lupinus neutrabilis*) en sus propiedades funcionales.** Tesis para optar el título de Ingeniero. UNALM. Perú
81. Skwierinski, A.; Cárdenas, A. 2007. **Estudio de la estabilidad de emulsiones múltiples W1/O/W2.** Proyecto de grado. Facultad de Ingeniería. Universidad de los Andes. Mérida.
82. Torrelo, G. 2010. **Tecnología de fluidos supercríticos y síntesis enzimática para la obtención de ésteres de fitoesteroles y otros ingredientes lipídicos funcionales.** Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. España.
83. Valenzuela, A.; Sanhueza, J. ; de la Barra, F. 2012. **El aceite de pescado: Ayer un desecho industrial hoy un producto de alto valor nutricional.** Rev.Chil. Nutr. 8(2):201-209.
84. Valenzuela, R.; Morales, G.; Gonzales, M.; Morales, J.; Sanhueza, J.; Valenzuela, A.2014. **Artículo de actualización: Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga w-3 y enfermedades cardiovasculares.** Rev Chil. Nutr.41:3.319-325 p.
85. Vasquez, F.; Ludeña, F.; Rojas,S.; Castillo, L. 2002. **Elaboración de leche pasteurizada enriquecida con ácidos grasos polinsaturados EPA y DHA provenientes del aceite semirrefinado de pescado.** Anales científicos LIII. UNALM. Peru.
86. Velasco,J.;Holgado,F.;Dobarganes,C.;Marquez-Ruiz,G.2009. **Influence of relative humidity on oxidation of the free and encapsulated oil fractions in freeze-dried microencapsulated oils.** Food Research International 42:1492–1500.

87. Velasco, J., Dobarganes, C. y Márquez-Ruiz, G. 2000. **Oxidation of free and encapsulated oil fractions in dried microencapsulated fish oils.** *Grasas y Aceites*.51:439-446.
88. Velasco, J., Marmesat, S., Dobarganes, C. y Márquez-Ruiz, G. 2006. **Heterogeneous aspects of lipid oxidation in dried microencapsulated oils.** *Journal of Agricultural Food Chemistry*.54:1722-1729.
89. Villar,F.; Milan,R.; Di Scipio,S. 2007. **Uso de la metodología de superficie de respuesta en el estudio del protocolo de mezcla para obtención de emulsiones concentradas O/W.** *Interciencia*. 32:6. 404-409 p.
90. Von Atzingen,M.; Machado,M.2005. **Evaluación de la textura y color de almidones y harinas en preparaciones sin gluten.** *Ciencia. Tecnología. Alimentaria*. 4: 5. 319-323 p.
91. Wang, R.; Tian, Z.; Chen,L. 2011. **A novel process for microencapsulation of fish oil with barley protein.** *Food Research International*. 44:9. 2735-2741 p.
92. Wen, J.; Chem, J; Alany, R. 2014. **Theories and concepts of Nano materials, Nano and Microencapsulation.** In Hae-Soo, K. *Nano and Microencapsulation for Foods*. Wiley-Blackwell. Korea.
93. Whitehurst, R.; Law, B. 2002. **Enzymes in Food Technology.** Great Britain Sheffield Academic Press, 138-140 p.
94. Yáñez, J.; Salazar, J.; Montoya, J.; Chaires, L.; Jiménez, J.; Márquez, M. Ramos, V. 2002. **Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación.** Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Cinvestav, v. 21, 313-319 p.
95. Yasir, S.; Sutton, K.; Newberry, M.; Andrews, N.; Gerrard, J. 2007. **The impact of transglutaminase on soy proteins and tofu texture.** *Food Chemistry* 104. 1491–1501 p.
96. Ziegler E.; Filer,L. 1998. **Conocimientos actuales sobre nutrición.** 7ª ed. Washington, DC: ILSI-OPS.

97. Zuidam, N.; Nedovic' V. 2010. **Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing**. Springer Science. New York.

ANEXOS

Verificación de supuestos

a). Test de Normalidad

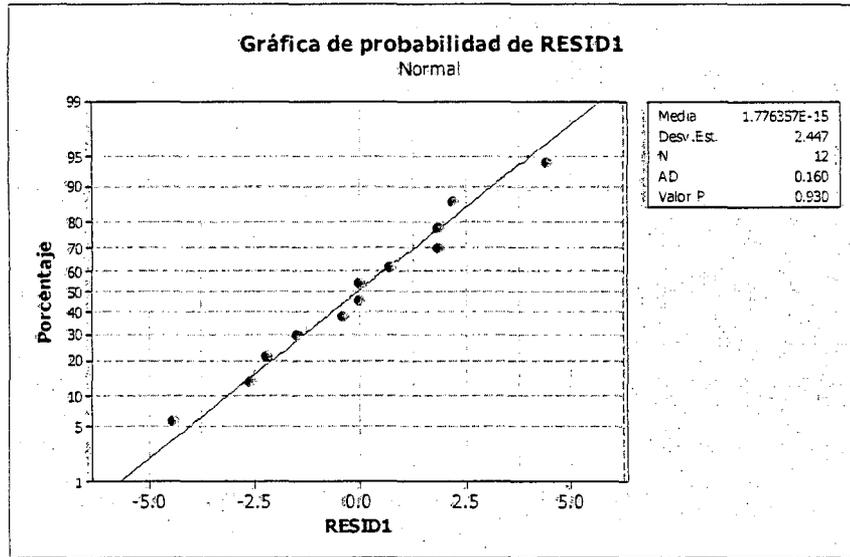


Figura 19. Grafica de probabilidad de residuos
Fuente: Elaboración propia (2015)

b). Homogeneidad de varianzas

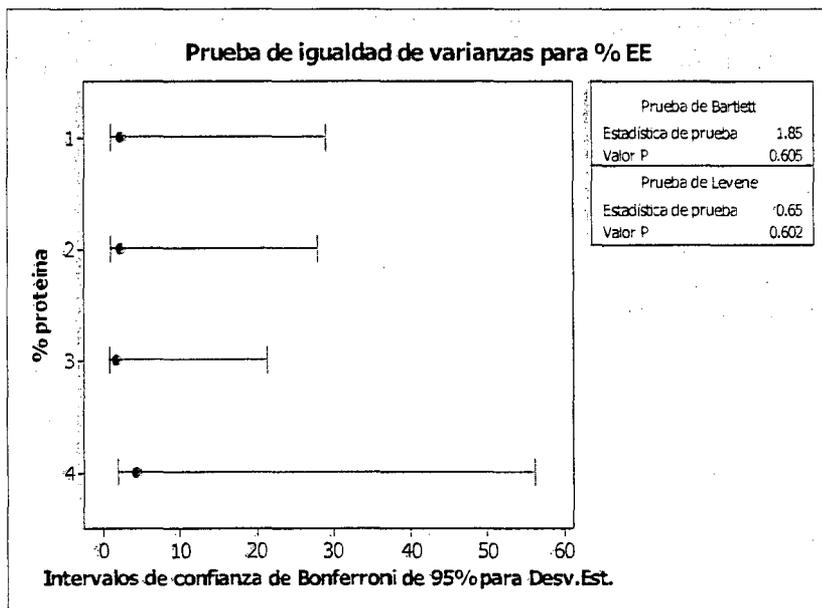


Figura 20. Prueba de igualdad de varianza
Fuente: Elaboración propia (2015)

2. EFECTO DE LAS CONDICIONES DE EMULSIFICACIÓN DE LA EMULSIÓN II (O/W/O) EN EL CONTENIDO ACEITE DE PESCADO ENCAPSULADO

Tabla 12. Análisis de varianza

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Velocidad	1	218.893	218.893	218.893	594.04	0.000
Velocidad*Tiempo	2	22.969	22.969	11.485	31.17	0.000
Tiempo	2	122.652	122.652	61.326	166.43	0.000
Error	12	4.422	4.422	0.368		
Total	17	368.936				

S = 0.607028 R-cuad. = 98.80% R-cuad.(ajustado) = 98.30%

Fuente: Elaboración propia (2015)

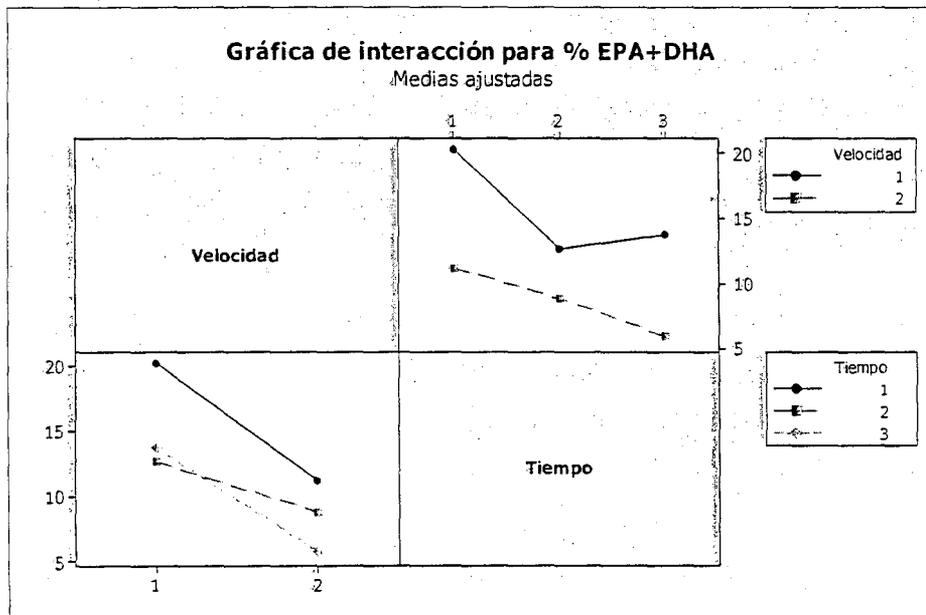


Figura 21. Gráfica de interacción para % de EPA+DHA

Fuente: Elaboración propia (2015)

Verificación de supuestos

a). Test de Normalidad

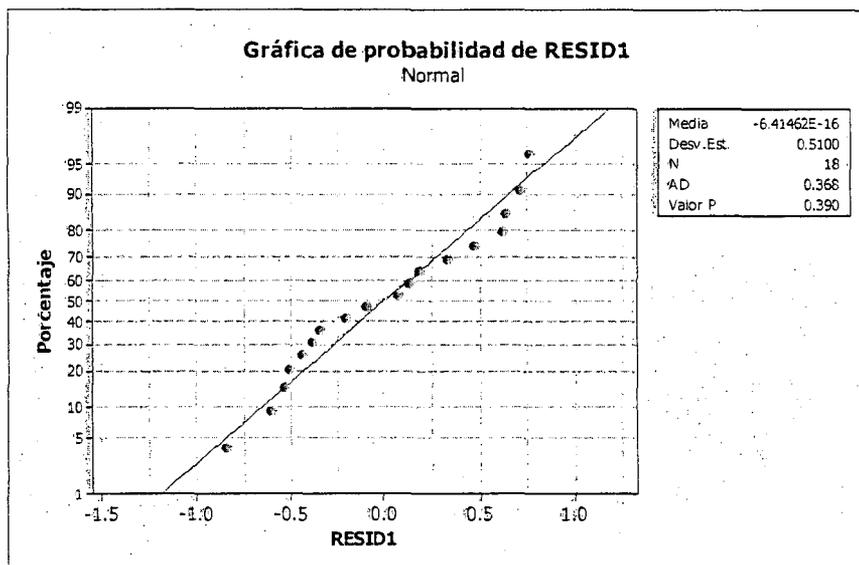


Figura 22. Grafica de probabilidad de residuos

Fuente: Elaboración propia (2015)

b). Prueba de homogeneidad de varianza

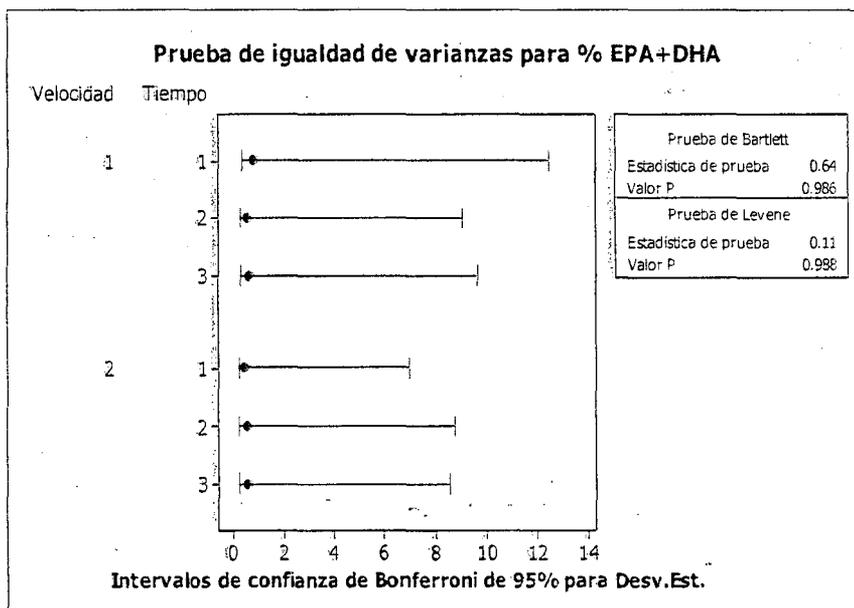


Figura 23. Prueba de igualdad de varianza

Fuente: Elaboración propia (2015)

3. INFLUENCIA DE LA RELACIÓN NÚCLEO: MATERIAL DE PARED EN EL PORCENTAJE DE ACEITE DE PESCADO (% EPA+DHA)

Tabla 13. Análisis de varianza

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Núcleo : MP	2	45.62	22.81	18.20	0.002
Error	7	8.77	1.25		
Total	9	54.40			

S = 1.120 R-cuad. = 83.87% R-cuad. (ajustado) = 79.26%
Fuente: Elaboración propia (2015)

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.	
1	4	25.760	0.973	(-----*-----)
2	3	21.643	0.680	(-----*-----)
3	3	21.187	1.583	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----
20.0 22.0 24.0 26.0

Desv.Est. agrupada = 1.120

Tabla 14. Información agrupada utilizando el método de Tukey

Núcleo: MP	Media	Agrupación
1	25.760	A
2	21.643	B
3	21.187	B

Fuente: Elaboración propia (2015)

VERIFICACION DE SUPUESTOS

a). Test de Normalidad

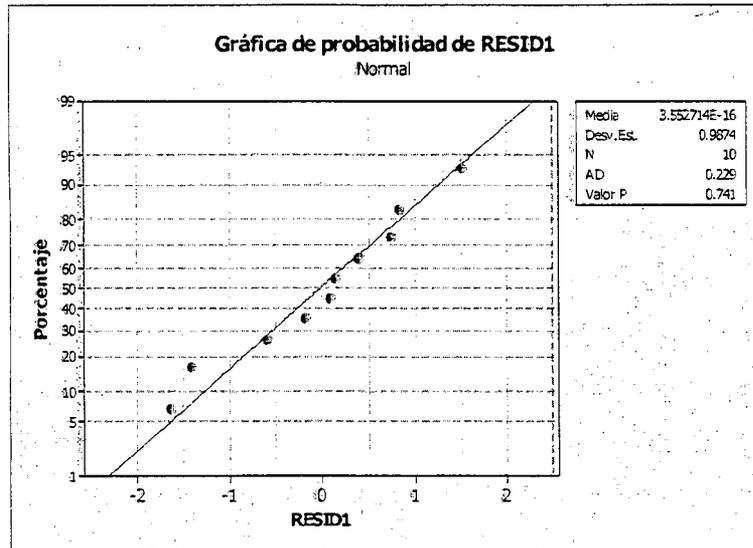


Figura 24. Grafica de probabilidad de residuos
Fuente: Elaboración propia (2015)

b). Homogeneidad de varianzas

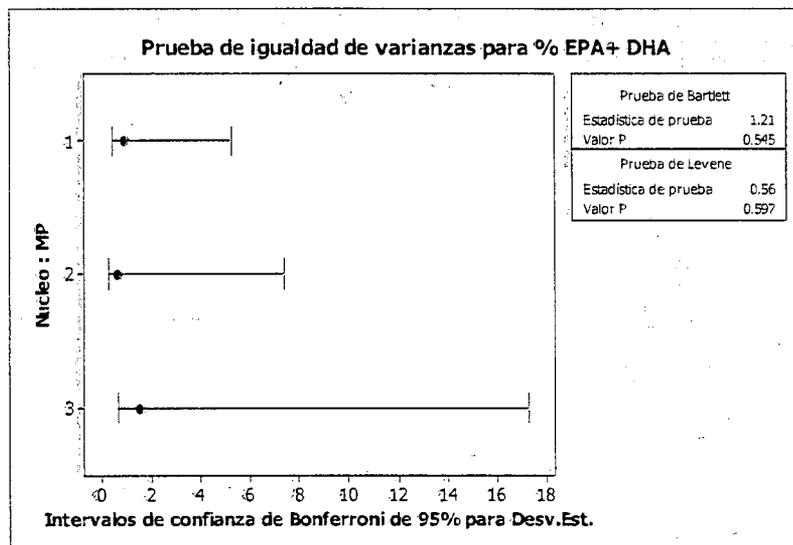


Figura 25. Prueba de igualdad de varianza
Fuente: Elaboración propia (2015)

ANEXO II. FICHA TÉCNICA DE LA ENZIMA TRANSGLUTAMINASA



FOOD INGREDIENTS DEPARTMENT
AJINOMOTO CO., INC.

15-1, KYOBASHI 1-CHOME CHUO-KU, TOKYO 104-8315 JAPAN
TEL : +81-3-5250-8146 FAX : +81-3-5260-8287

PRODUCT INFORMATION

ACTIVA® TG-K

Specifications

Item	Specification	Method*
Description	White powder	AJI TEST [Sensory analysis]
Loss on drying	Not more than 22.0 %	Japanese Standards for Food Additive (Loss on drying test [3 g, 100 °C for 3 hours])
Transglutaminase activity	78 – 126 U/g	AJI TEST [Hydroxamate method]
Arsenic (as As ₂ O ₃)	Not more than 2 µg/g	AJI TEST [Atomic absorption spectrophotometry]
Heavy metals (as Pb)	Not more than 20 µg/g	AJI TEST [Sodium Sulfide colorimetry]
Aerobic plate count	Not more than 3,000 /g	Standard Methods of Analysis in Japanese Food Safety Regulation [Standard agar medium]
Thermotolerant bacteria (mesophilic)	Not more than 300 /g	Standard Methods of Analysis in Japanese Food Safety Regulation [Standard agar medium]
Coliform bacteria	Negative/g	Standard Methods of Analysis in Japanese Food Safety Regulation [BGLB medium]

* All the methods are available on request to AJINOMOTO

Ingredients

Transglutaminase, Calcium Lactate, Maltodextrin and others

Shelf-life

Eighteen months from manufacturing date in the original unopened package in cool dry place.

Figura 26. Ficha técnica de la enzima transglutaminasa ACTIVA TG-K

Fuente: Ajinomoto (2010)

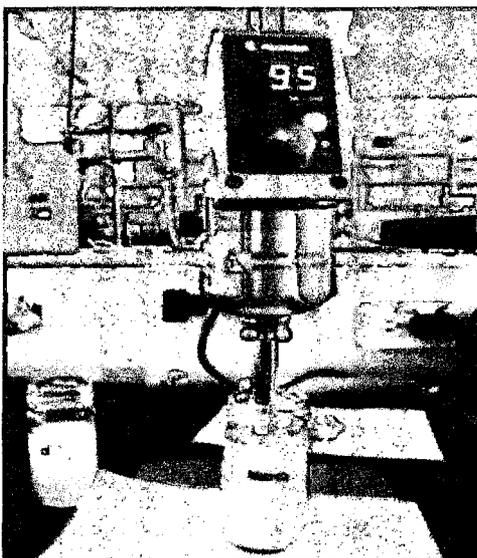
ANEXO III. FOTOS DEL PROCESO DE MICROENCAPSULACION

Figura 27. Elaboración de la emulsión O/W con el equipo Silent crusher
Fuente: Elaboración propia (2015)

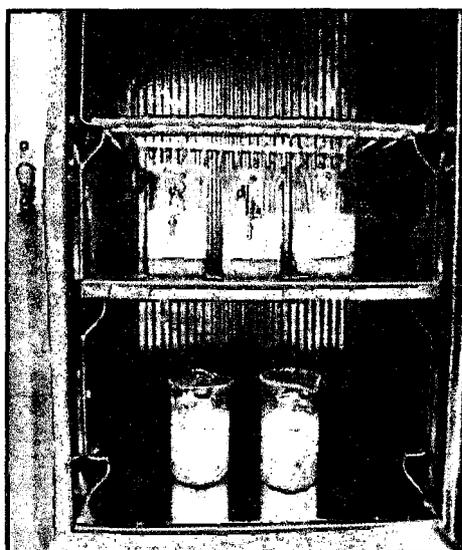


Figura 28. Incubación de las dobles emulsiones O/W/O a 37 °C /4 h
Fuente: Elaboración propia (2015)

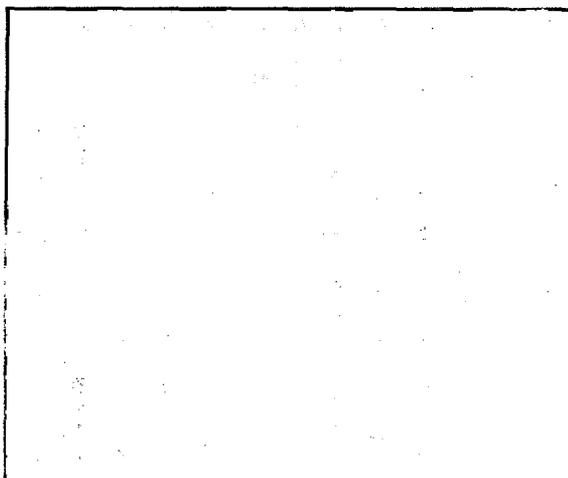


Figura 29. Microcápsulas al finalizar el tiempo de incubación, previo al lavado con etanol

Fuente: Elaboración propia (2015)

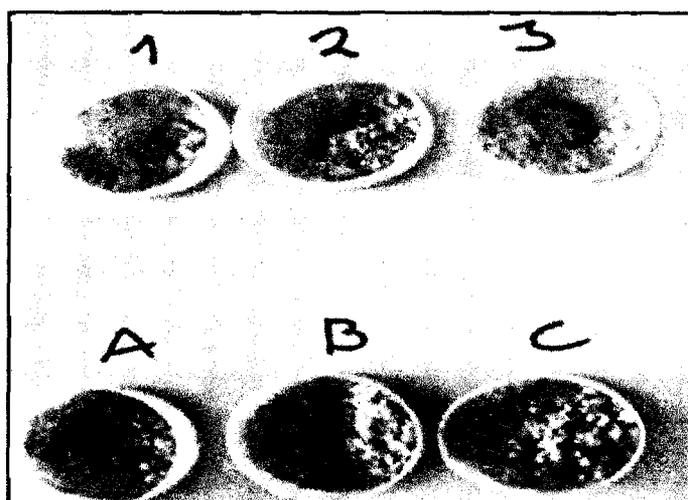


Figura 30. Microcápsulas después del secado por liofilización

Fuente: Elaboración propia (2015)

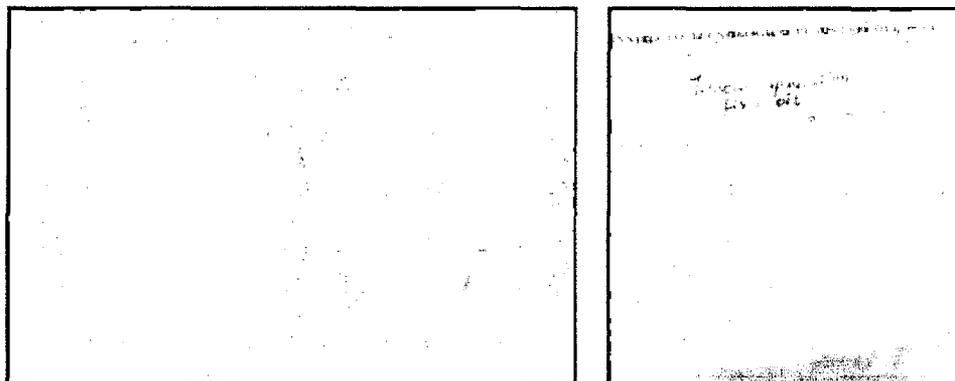


Figura 31. Microcápsulas al final del estudio

Fuente: Elaboración propia (2015)

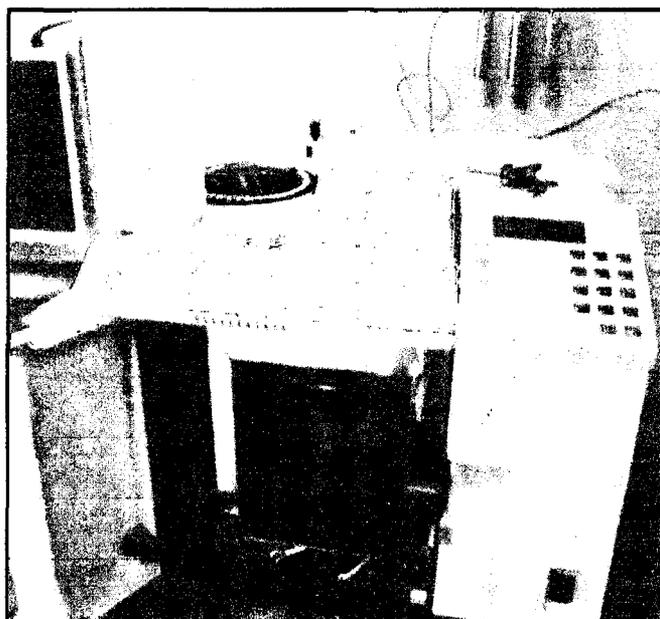


Figura 32. Cromatografo de Gases Perkin Elmer, vista del horno donde va la columna

Fuente: Elaboración propia (2015)

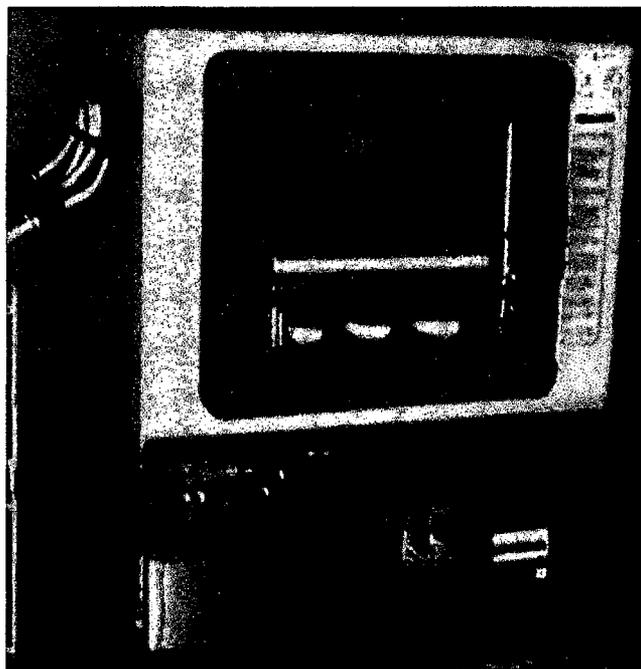


Figura 33. Liofilizador Marca LABCONCO

Fuente: Elaboración propia (2015)

**ACTA DE SUSTENTACIÓN PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

En la ciudad de Puerto Maldonado, siendo las¹⁰ horas con³⁰ minutos del día 23 de diciembre del 2015, en las instalaciones del anfiteatro N° ...⁰¹ de la Ciudad Universitaria de la UNAMAD, dando cumplimiento a la Resolución de Decanatura N° 227-2015-UNAMAD-DFI, se reunieron los miembros del Jurado integrado por los siguientes docentes:

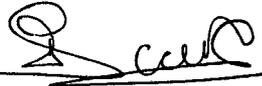
Ing. Raúl Huamán Cruz	(Presidente)
Dra. Roxana Madueño Portilla	(Secretaria)
Dra. María Isabel Cajo Pinche	(Vocal)
Mgt. Ronald Quispe Flores	(Accesitario)

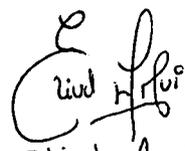
Con la finalidad de evaluar el Trabajo de Investigación titulado: “**Microencapsulación del Aceite de Pescado de Anchoqueta (Engraulis ringens) Mediante Doble Emulsificación Empleando Aislado Proteico de Soya Reticulado con Transglutaminasa**,” presentado por el Bach. Eliud Dennis Arpi Anco. Seguidamente se procedió con la exposición del trabajo de tesis por parte del sustentante, el jurado procede con la fase de preguntas respectivas y luego el sustento del tesista. Acto seguido, el jurado procede a la deliberación de forma reservada y libremente, declarando el trabajo expuesto como **APROBADO**, con el calificativo de MUY BUENO y una nota de Diecisiete, previo a esto los graduandos deberán de realizar el levantamiento a las observaciones entregadas por el jurado calificador.

En fe de la cual firmamos la presente acta, siendo las¹¹ horas con³⁰ minutos del día 23 de diciembre del 2015, se dio por culminado el presente acto de sustentación.


RAÚL HUAMÁN CRUZ.
PRESIDENTE


María Isabel Cajo P.
Vocal.


ROXANA MADUEÑO PORTILLA
SECRETARIA


Eliud Arpi Anco
Tesisista



INFORME DE CONFORMIDAD DE LEVANTAMIENTO DE
OBSERVACIONES

Puerto Maldonado,

Mediante el presente, los Docentes:

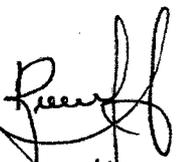
- Ing. Raúl Huamán Cuz (presidente)
- Dra. Roxana Madueño Portilla (secretaria)
- Dra. María Isabel Cajo Pinche (vocal)

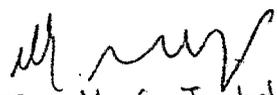
Miembros del Jurado Calificador de la Tesis intitulada:

« Microencapsulación del Aceite de Pescado de Anchoeta (*Engraulis Ringens*)
mediante doble Emulsificación empleando aislado Proteico de Soja Retiulado con Transglutaminasa
», sustentada (o) por el Bachiller. Eliud Dennis Arpi Anco
el día/mes, año 23/12/2015 en la Ciudad Universitaria de la UNAMAD, emitimos el
presente **INFORME DE CONFORMIDAD DE LEVANTAMIENTO DE
OBSERVACIONES**, con lo cual el Señor (ita) Tesista ha cumplido con realizar las
modificaciones a las observaciones realizadas durante la sustentación de la Tesis.

Es todo cuanto informamos a Usted Señor Decano, para los
fines correspondientes.

Atentamente;


Raúl Huamán Cuz
PRESIDENTE.


Dra. María Isabel Cajo
Pinche
VOCAL


ROXANA MADUEÑO PORTILLA
SECRETARIA