



**Universidad de Valladolid**



**ESCUELA DE INGENIERÍAS  
INDUSTRIALES**

**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID**

**ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES**

**Grado en Ingeniería Química**

**Estudio de Encapsulado de Extractos**

**Supercríticos de Salvado de Trigo**

**Autor:**

**González Redondo, Juan**

**Tutor:**

**Cocero Alonso, María José  
Navarrete Muñoz, Alexander  
Departamento de Ingeniería  
Química**

**Valladolid, Julio 2015.**



## Índice

Índice de figuras .....	4
1. RESUMEN: .....	5
2. ABSTRACT .....	7
3. INTRODUCCIÓN Y ESTADO DEL ARTE .....	9
3.1. Polifenoles .....	13
3.2. Ácido ferúlico .....	14
3.3. Reacción de Maillard .....	16
3.4. Alternativas de formulación .....	18
3.5. Nanoencapsulación .....	18
3.6. Liposomas .....	19
4. OBJETIVOS .....	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	25
5.1. Materiales .....	25
5.2. Proceso de encapsulación del ácido ferúlico .....	25
5.2.1. Preparación de la fase oleosa o dispersa .....	25
5.2.1.1. Método .....	25
5.2.2. Preparación de la fase acuosa o dispersante .....	26
5.2.2.1. Método .....	27
5.2.3. Emulsión .....	27
5.2.3.1. Método de generación de la macroemulsión .....	28
5.2.3.1.1. Método .....	29
5.2.3.2. Generación de la microemulsión por ultrasonidos .....	29
5.2.3.2.1. Método .....	31
5.2.4. Realización de la suspensión .....	31
5.2.4.1. Método .....	32
5.2.5. Secado por spray .....	32

---

5.2.5.1.	Método.....	34
5.2.6.	Medida del contenido total de polifenoles en la muestra.....	35
5.2.6.1.	Método.....	36
5.2.7.	Microscopía electrónica de barrido .....	36
5.2.7.1.	Método.....	37
5.2.8.	Medida del tamaño de partícula.....	37
5.2.8.1.	Método.....	38
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	39
6.1.	Concentración de antioxidantes en las muestras.....	39
6.2.	Análisis de morfología y tamaño de partícula .....	43
7.	CONCLUSIONES.....	57
	BIBLIOGRAFÍA.....	59

Índice de figuras

<i>Figura 1: Estructura y composición en peso del grano de trigo.....</i>	<i>10</i>
<i>Figura 2: Estructura molecular del Ácido Ferúlico .....</i>	<i>14</i>
<i>Figura 3: Formación de la glucosamina inestable y reordenamiento de Amadori. ....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 4: Distribución de la carga en el liposoma en función de sus propiedades .....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 5: Fórmula molecular de la lecitina de soja .....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 6: Comportamiento de las burbujas durante la homogeneización con ultrasonidos].....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 7 Estructura del almidón E-1450 .....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 8: Esquema de secadero en spray .....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 9: Microscopio de barrido de electrones de la Universidad de Valladolid.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 10: Distribución del tamaño de partícula. ....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 11: SEM 1000 x de la muestra 1. Plano general. ....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 12: SEM 10000x de la muestra 1. Zoom de una aglomeración .....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 13: SEM 10000x de la muestra 1. Superficie porosa de partícula. ....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 14: Distribución del tamaño de partícula. ....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 15: SEM 1000x de la muestra 2. Plano general. ....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 16: SEM 20000x de la muestra 2. Superficie porosa de la partícula.....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 17: Distribución del tamaño de partícula. ....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 18: SEM 1000x de la muestra 3. Plano general. ....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 19: SEM 5000x de la muestra 3. Superficie lisa de la partícula. ....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 20: Mecanismo de preparación de partículas por spray drying .....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 21: Distribución del tamaño de partícula. ....</i>	<i>54</i>

---

1. RESUMEN:

En el presente estudio se tiene como objetivo analizar la conservación de polifenoles a lo largo de un proceso de encapsulación de extracto de salvado de trigo obtenido mediante extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico, así como la morfología y tamaño final de las partículas. El contenido de antioxidantes se ha analizado por el método de Folin-Ciocalteu, pero con resultados poco concluyentes, por lo que se han planteado otras posibles vías para futuros estudios. En cuanto a morfología, los análisis de tamaño de partícula por Light Scattering, y las imágenes tomadas por SEM, permitieron determinar que a un mayor contenido de agente pared, se reduce la porosidad de las partículas finales, así como los aglomerados formados en suspensión por parte de las partículas porosas.

PALABRAS CLAVE: Ácido ferúlico, reacción de Maillard, encapsulación, polifenoles, extracto de salvado de trigo



---

2. ABSTRACT

The present research aims to analyze polyphenol conservation during an encapsulation process of bran extract obtained previously with supercritical CO<sub>2</sub> together with the size and morphology of the particles. Antioxidant content has been analyzed by Folin-Ciocalteu method, but results weren't conclusive, so that it has been purposed another alternatives for future studies. As for morphology, size analysis and SEM images, have shown that a greater amount of wall agent, reduces particle porosity, and the agglomerations formed in suspension by porous particles.

KEYWORDS: Ferulic acid, Maillard reaction, encapsulation, polyphenols, wheat bran extract



### 3. INTRODUCCIÓN Y ESTADO DEL ARTE

El pan es uno de los alimentos más ampliamente consumidos en el mundo. Es imposible hablar de la historia humana sin hacer referencia al pan o al trigo. El pan es simplemente una mezcla de harina, agua, levadura, y cloruro sódico, en correctas proporciones, fermentado y cocido en un horno. El consumo del mismo varía en función del país [1], en números de 2013, el consumo en España de pan, por habitante y año fue de 36,12 Kg, lo cual supone un gasto del 5,75% del gasto en la cesta de la compra de un hogar medio, ésta cifra se ha visto aumentada con respecto a la del año anterior en un 1,5% debido al incremento de consumo del pan fresco integral, y de pan fresco sin sal, cuyos consumos aumentaron en un 14,3% y un 18,2% respectivamente [2].

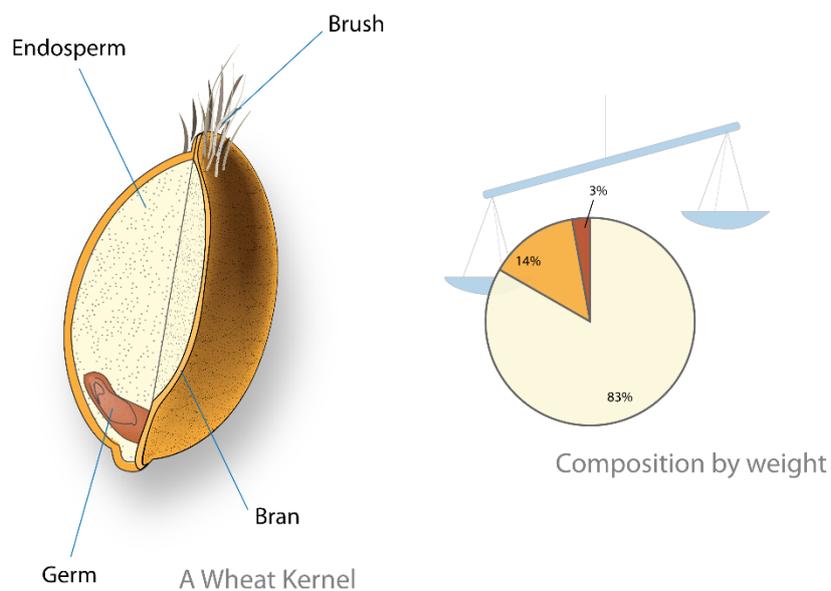
El beneficio que esto supone es la existencia de un sector del mercado destinado al consumo de un determinado tipo de pan, aunque el verdadero reto surge a la hora de incluir a los consumidores habituales del pan procedente de harinas refinadas, en el sector de los consumidores de pan integral.

Para distinguir entre ambos tipos de panes, es necesario recurrir primero a la estructura del grano de trigo. En el grano de trigo se distinguen tres partes principales (Figura 1):

- Endosperma: Compuesto por gránulos de almidón en una matriz de proteínas, supone entre un 80 y un 85% del peso del grano.
- Germen: Compuesto por el embrión, y es rico en lípidos, proteínas, azúcares neutros, y vitaminas. Constituye un 3% en peso del grano.
- Salvado: Son las capas periféricas del grano, que rodean el endosperma, compuesto por celulosa y polifenoles en su mayoría, representa entre un 13 y un 17% del peso del grano. Está compuesto por diferentes capas.
  - o Pericarpio interno y externo: Compuestos por células vacías, con células pared, lignina y dímeros del ácido ferúlico y polisacáridos.
  - o Recubrimiento de la semilla: rico en alquilresorcinoles.

- Capa hialinica: Compuesta en su mayoría por arabinoxilanos (67% w/w), y rica en monómeros del ácido ferúlico.
- Aleurona: Tejido unicelular, que representa entre un 45 y un 50% de la fracción de salvado, está compuesta principalmente por arabinoxilanos, beta-glucanos, y proteínas. Sus compuestos fenólicos están altamente esterificados con arabinoxilanos (98,5%) [3].

En función de cada una de esas partes a la harina se distingue entre dos tipos, harina refinada, sólo contiene el endosperma, y por lo tanto un contenido elevado en almidón y casi nulo en antioxidante, y harinas integrales, en las que se incluye salvado, germen y endosperma y cuyo contenido en antioxidantes y por lo tanto beneficios para la salud son superiores [3].



	Carb./g	Protein/g	Fat/g	Fiber/g	Iron (% daily req.)	Others
<b>Bran</b>	63	16	3	43	59	vitamin Bs
<b>Endosperm</b>	79	7	0	4	7	
<b>Germ</b>	52	23	10	14	35	vitamin Bs omega-3/6 lipids

Nutritional Value (per 100g)

Figura 1: Estructura y composición en peso del grano de trigo [68]

---

Existen evidencias epidemiológicas de que, el consumo diario de cereales integrales, y enriquecidos en salvado (Componente que no se encuentra en el pan procedente de harina refinada), puede reducir el riesgo de obesidad y enfermedades cardiovasculares. Además, la autoridad europea de seguridad alimentaria, ha reconocido recientemente que el consumo de salvado acelera el tránsito intestinal [4]. La digestión incrementa la solubilidad y actividad de compuestos fenólicos ligados y, como han demostrado estudios al respecto, esta puede ser la razón de por qué el consumo de cereales integrales ayude a prevenir el cáncer de colon [5].

Independientemente de sus propiedades, la característica final que va a inclinar al consumidor a comprar un pan u otro es el aroma, ya que es lo primero que se percibe al realizar la compra. Existen dos tipos de aromas, el que se percibe cuando la nariz está cerca del alimento, aroma principalmente asociado a la corteza del pan, y el retro olor que se percibe al ser masticado dicho alimento, donde influye sabor de corteza y miga, en ambos casos los compuestos volátiles son los que están implicados. Cuando esos compuestos volátiles alcanzan las células de la mucosa olfativa, envían una señal al cerebro que permite discriminar el aroma percibido [1].

En estudios previos se analizan los principales componentes aromáticos de la corteza del pan, con el fin de distinguir cuales son aquellos que le confieren sus propiedades organolépticas. El más importante de ellos es la 2-acetilpirrolina, que se encuentra muy presente en panes elaborados con harinas refinadas, pero poco presente en panes elaborados con harinas integrales, eso propicia que los procedentes de harinas refinadas sean los más consumidos por el público [3] [6].

Con el fin de determinar cuál es el compuesto que interfiere en la obtención de la 2-acetilpirrolina durante la elaboración [6], se realizaron análisis de la composición de los diferentes panes, que demuestra que el contenido en compuestos fenólicos en los panes integrales es superior. Finalmente se llega a la conclusión de que dichos polifenoles son los causantes de una variación en la reacción de Maillard (reacción que proporciona el sabor a los alimentos), y generan intermedios de reacción que inhiben la obtención de los principales

---

compuestos organolépticos del pan, obteniéndose así notas terrosas en las pruebas del sabor, ligadas con la presencia de 2-etil-3,5-dimetilpirazina [6].

Aunque la composición del pan y la elección de la harina es determinante para el sabor del mismo, existen otros factores. El uso de enzimas y aditivos es uno de ellos, las enzimas proporcionan precursores para la fermentación de las levaduras y las reacciones dadas por aumento de temperatura. Las amilasas y las glucosidasas son responsables de producir azúcares reductores, que actúan con los sustratos durante la fermentación de la levadura, y se genera una mayor cantidad de aminoácidos que participan en la reacción de Maillard variando el sabor final del pan. Los aditivos como los fructo-oligosacáridos, añadidos para aumentar los beneficios para la salud, aumentan los compuestos característicos de las reacciones de Maillard, mejorando el sabor [1].

Como otro de los factores que influyen en el sabor del pan, también cabe destacar la cocción, para la que existen dos métodos, por quema de gas y por quema de madera. Dependiendo de la forma que se use para cocer el pan se potencian más la generación de unos compuestos volátiles u otros, por ejemplo en el caso de quema de madera se muestran unas reacciones de Maillard más pronunciadas, más específicamente se potencia la generación de furanos y tetrahidrofuranos. Por otro lado la ventaja que presenta el pan por quema de gas, es una mayor cantidad de furfurales [1].

Los factores anteriores están más orientados al estudio de la corteza del pan, ya que es donde se produce la reacción de Maillard (sólo se da donde existe una tostación), la miga por el contrario está influenciada por el tipo de fermentación y la bacteria responsable de ello [1], aunque no es objeto de estudio en éste proyecto, puede ser planteado como otra vía de análisis por parte de la industria para mejorar la calidad de su producto.

Como último punto destacar el efecto del almacenamiento del pan. Se han realizado estudios acerca de ello, realizando análisis de la composición de los panes, y catas de panes, recién elaborados y tras estar almacenados, 1, 2 y 3 semanas. Las conclusiones fueron que los panes almacenados durante 2 y 3 semanas presentaron sabores originados por la oxidación de los lípidos,

---

---

mientras que aquellos que sólo estuvieron una semana, o estaban recién elaborados tenían notas características de los productos de cocción o fermentación, esto es debido a la desaparición de los compuestos volátiles a lo largo del tiempo de almacenamiento. Por lo tanto es un factor relevante a la hora de determinar la calidad del producto final, así como posible futuro objeto de estudio para beneficiar a productores y consumidores [7].

De entre todos ellos, el que va a ser analizado en más profundidad, es el que relaciona la influencia en las propiedades organolépticas del pan, con la presencia de polifenoles.

### 3.1. Polifenoles

La primera noticia que se tiene acerca del beneficio para la salud de los polifenoles proviene de hace 3000 años, cuando el ayurveda indio (Antiguo sistema de medicina indio), estaba en pleno auge [8]. Actualmente se han identificado más de 8000 estructuras fenólicas distintas, algunos de los alimentos ricos en polifenoles son ampliamente consumidos en muchos países, como el té, el café, el vino tinto o el chocolate. Comparados con los antioxidantes sintéticos como el butilato de hidroxianisol o el butilato de hidroxitolueno, los procedentes de plantas son más aceptados por los consumidores, y representan una parte importante en su dieta diaria [9].

Los polifenoles son un grupo de metabolitos secundarios de las plantas, con al menos un anillo aromático en su estructura, y que contienen uno o más grupos hidroxilo en su estructura. Los polifenoles en comidas o bebidas son metabolizados por la microflora del intestino a aldehídos y ácidos fenólicos. De los cuales se puede destacar la acción que tienen protegiendo las células contra el daño oxidativo, y por tanto prevenir el riesgo de varias enfermedades degenerativas asociadas al estrés oxidativo causado por los radicales libres. El stress oxidativo se define comúnmente como el desequilibrio entre las especies oxidantes y reductoras a nivel celular de un organismo [10]. Además el efecto de los ácidos fenólicos obtenido en estudios previos, con ratas de laboratorio,

donde se ha demostrado que los ácidos fenólicos, tienen propiedades antiinflamatorias reduciendo los niveles de prostaglandinas E2 y TNF- $\alpha$  [11].

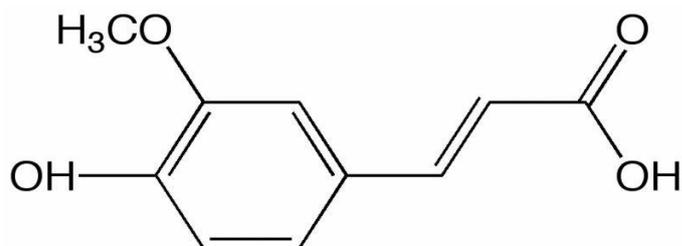
Los compuestos fenólicos se clasifican en dos grupos: flavonoides, integrados por antocianinas, flavonoles y dihidroflavonoles, y los no-flavonoides, que comprenden alcoholes mono-fenólicos, ácidos fenólicos y estilbenos [12].

### 3.2. Ácido ferúlico

De entre todos los polifenoles presentes en el pan integral, el ácido ferúlico es el mayoritario de ellos, supone un 95% de los polifenoles totales que se encuentran en el trigo [3]. El ácido ferúlico es un derivado del ácido cinámico y, al igual que los polifenoles, es un metabolito secundario de las plantas, y antioxidante fenólico, diferenciado de otros fenoles por la presencia de un grupo ácido en su estructura [13].

Se encuentra presente en pre-germinados del arroz marrón [11], en un amplio rango de vegetales y en la estructura de la semilla del trigo, donde se encuentra de dos formas, libre y ligada, siendo ésta última la mayoritaria de las dos, de las cuales depende la biodisponibilidad del mismo [14].

El ácido ferúlico, al tratarse de un antioxidante, protege a las células de radicales libres y, gracias a su estructura molecular (Figura 2), puede deslocalizar electrones desapareados sin perder estabilidad [15], el efecto de deslocalización se debe principalmente a su núcleo fenólico y la cadena larga lateral, que le permite hibridarse. Además se han reportado efectos neuro y radio protectores, de protección pulmonar y anti-aterogénicos (previene malformaciones en fetos) [11].



*Figura 2: Estructura molecular del Ácido Ferúlico*

---

Tiene la desventaja, al igual que otros polifenoles, de tener una baja biodisponibilidad, por lo cual no es asimilado completamente por el organismo. Existen estudios que cuantifican la dosis de ácido ferúlico que se elimina por la orina, identificando su biodisponibilidad, variando en rangos de entre 0,4 y 98%, dependiendo de la fuente. El procedente del trigo tiene una baja biodisponibilidad, un 3%, en comparación con fuentes como el tomate (11-25%), o la cerveza (19-98%) [16].

El ácido ferúlico constituye un 0,66% del peso seco del salvado [17], entre 0,8 y 2 g/kg [16]. De entre las dos formas, la que destaca por su acción en el desarrollo de las reacciones de Maillard, es la libre [6], reduciendo la obtención de 2-acetilpirrolina, considerado como el componente principal del sabor del pan y, de éste modo, afectando negativamente a las propiedades organolépticas del mismo. La escasez de 2-acetilpirrolina va ligada con las connotaciones organolépticas del pan duro [1]. También afecta a las propiedades físicas ya que, al ser añadido al pan en cantidades entre 250 ppm y 5000 ppm, el volumen que alcanza se reduce entre un 3,6 y un 21% debido a que inhibe la acción de la levadura y disminuye la resistencia del gluten así como la tolerancia al mezclado, cabe destacar que esto se da al añadir el compuesto puro al pan, y que desde la matriz del cereal puede no tener los mismos efectos [18].

En estudios previos, el problema que se genera a lo largo de la producción del pan, es que en torno a un 27% del ácido ferúlico ligado se libera, pasando la concentración de ácido ferúlico libre, de 1,3 mg/kg a 68 mg/kg, debido al aumento de temperatura del pan al ser horneado. En dichos estudios es donde se ha estudiado el efecto de la liberación del ácido ferúlico en la reacción de Maillard, añadiendo a la harina refinada una cantidad equivalente de ácido ferúlico para incrementar su concentración hasta la alcanzada en panes elaborados con harinas refinadas, tras lo cual se ha elaborado el pan y se ha realizado una cata del mismo. Los resultados probaron que el sabor sí se ve afectado, y por tanto el detrimento de las propiedades organolépticas va a ir ligado al incremento de ácido ferúlico libre [6].

### 3.3. Reacción de Maillard

La reacción de Maillard es una reacción no enzimática, que se da entre los grupos amino de los nucleófilos, y los grupos carbonilo de los azúcares reductores debido a un proceso térmico, y es la reacción que determina las propiedades organolépticas de los alimentos cocinados. Debido a las características que confiere a los alimentos ha sido ampliamente estudiada por las industrias en los últimos años, con el fin de obtener mejores alimentos a partir de diferentes materias primas [19].

El término reacción de Maillard engloba una amplia red de reacciones en las que se distinguen tres etapas, y cuyos intermedios y productos van a venir determinados por condiciones tales como pH, naturaleza de reactivos, o temperatura, entre otros [20].

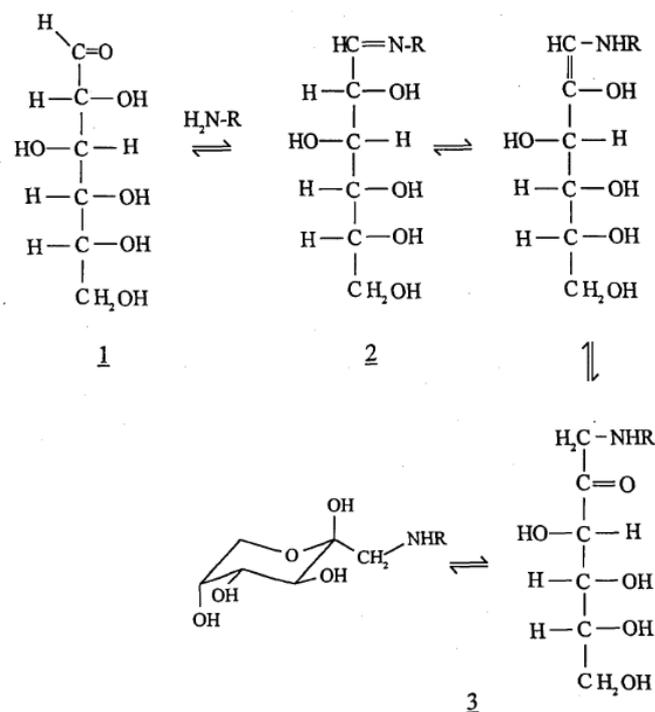


Figura 3: Formación de la glucosamina inestable y reordenamiento de Amadori [22].

- Primera etapa: El grupo carbonilo del azúcar reacciona con el grupo amino del aminoácido, produciéndose la unión entre aminoácidos y azúcares [21].

- Segunda etapa: La glucosamina de la etapa anterior, al tratarse de un compuesto inestable, se reordena formando cetosaminas, a través de una reacción de isomerización en medio ácido conocida como reordenamiento de Amadori (Figura 3) [22].
- Tercera etapa: Se producen los polímeros que dan coloración al alimento, conocidos como melanoidinas, compuestas por largas cadenas de cetosaminas [21].

En la elaboración de un pan, durante la cocción, la temperatura y humedad influyen en la intensidad de la reacción de Maillard, normalmente las temperaturas oscilan entre 195 y 220°C, dependiendo de la temperatura la reacción puede verse acelerada. En términos de humedad, habitualmente la cocción se lleva a cabo en una atmósfera saturada con vapor de agua, con el objetivo de retrasar la creación de la corteza, obteniendo panes con más miga [1].

Es en éste proceso de horneado donde la presencia de los polifenoles influye, variando los perfiles aromáticos del pan. El ácido ferúlico, que se encuentra de forma predominante en el salvado, y por tanto no afecta a panes elaborados con harinas refinadas [6]. Interviene en ésta cadena de reacciones inhibiendo la producción de la 2-acetilpirrolina, ya que capta los grupos carbonilos, atrapándolos, y no los permite reaccionar y, como antes se ha comentado, modifica negativamente las propiedades organolépticas del pan. Por lo tanto los panes elaborados con harinas integrales, al tener menor cantidad de productos aromáticos característicos debido a la acción del ácido ferúlico, tienen una aceptación más reducida por parte del público.

Con el fin de evitar que se generen los intermedios de reacción que modifican las propiedades organolépticas que el consumidor busca, es necesario plantear una nueva formulación para el ácido ferúlico, para obtener una mejora en el pan, tanto en sabor como en estructura, a la vez que se conservan las propiedades antioxidantes del mismo.

### 3.4. Alternativas de formulación

En función de la utilización existen nuevas formulaciones para el ácido ferúlico:

- Finalidades farmacodirigentes- Con el objetivo de dirigir los antioxidantes a puntos del organismo determinados. Debido a los efectos que produce en el organismo el ácido ferúlico habitualmente se buscan formulaciones para ello, mediante el uso de Solid lipid nanoparticles (SLN), o niosomas, que sirven como transportadores.
- Finalidades alimenticias- Con el objetivo de proteger los antioxidantes, y permitir una mayor biodisponibilidad.
  - o Uso de dextrinas, para transporte de ferúlico y gálico [23]. Presentan una buena eficiencia, el problema que plantea para éste estudio es la adición de la dextrina, que se obtiene introduciendo almidón en medio ácido o calentándolo [24], y modifica la formulación original del pan, añadiendo un compuesto ajeno, que puede afectar en el sabor.
  - o Productos basados en almidón, habitualmente se trata de almidones modificados. Al ser la harina el componente principal del pan, y estar compuesta en su mayoría por almidón, supone una buena alternativa como material pared en la encapsulación, ya que permite la modificación de la formulación del ferúlico, sin la desventaja de añadir compuestos nuevos a la hora de elaborar el pan.

### 3.5. Nanoencapsulación

La nanoencapsulación está definida como una tecnología que permite encapsular sustancias en miniatura en forma de paquetes bioactivos en la nanoescala. Habitualmente ha sido utilizada como forma de proteger compuestos bioactivos, con el fin de evitar que se vean deteriorados por los posibles factores ambientales adversos, al mismo tiempo que permite una liberación controlada y más efectiva de los micronutrientes que almacena [25].

La nanoencapsulación también implica la incorporación, absorción, o dispersión de compuestos bioactivos en forma de pequeñas vesículas de diámetros nanométricos. Reducir el tamaño de las partículas también otorga otras posibilidades, como una mejor adhesión a determinados tejidos animales, para permitir una liberación más puntual del compuesto encapsulado [25].

### 3.6. Liposomas

Los liposomas son un tipo de nanocápsulas esféricas huecas que se forman espontáneamente cuando los lípidos formadores se dispersan en un medio acuoso, lo cual se debe a las propiedades hidrofóbicas de la cadena del lípido, y con el objetivo de reducir las interacciones de la cadena hidrocarbonada con el agua [26], el objetivo final es obtener una forma de mínima energía, en donde existe un determinado área de contacto entre los grupos polares y la fase acuosa óptimo [27].

Su composición es similar a la de las membranas celulares, compuestas en su mayoría por lípidos que presentan parte polar y apolar, y obteniendo de éste modo propiedades anfífilas [26]. Los lípidos más extensamente utilizados son los fosfolípidos, que forman bicapas lipídicas (Figura 4), y son extensamente utilizados como surfactantes, materiales dirigentes de compuestos hidrofóbicos [28] y sistemas de reparto de fármacos a través de la piel [29].

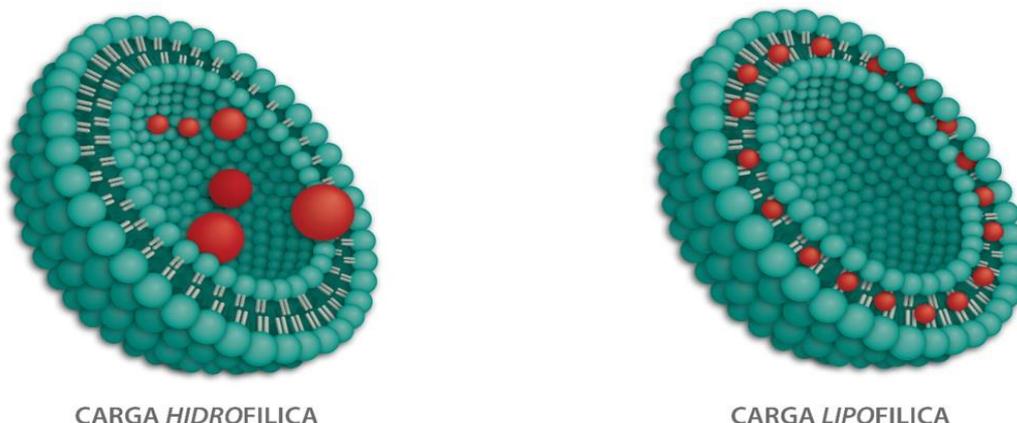


Figura 4: Distribución de la carga en el liposoma en función de sus propiedades [66]

Son moléculas que forman dispersiones coloidales (aquellas en las cuales las partículas que las componen, en al menos una de sus tres dimensiones tienen una medida de entre  $10^{-9}$  y  $10^{-6}$  metros [30]) donde se orienta la parte polar de la molécula surfactante hacia el exterior del liposoma, y la parte apolar hacia el interior, con el objetivo de “escudar” a los grupos hidrofóbicos, dando lugar a la formación de la capa exterior de la cápsula [26], y actuando además como estabilizantes de esas dispersiones [28].

Pueden organizarse en una gran variedad de estructuras supramoleculares en disolución acuosa con el fin de eliminar las interacciones cadena hidrocarbonada-agua. Lo que va a determinar la agrupación supramolecular va a ser la carga del grupo polar, y la longitud y saturación de las cadenas hidrocarbonadas que contenga la molécula [26], así como las interacciones con los grupos polares adyacentes (fuerzas de atracción y repulsión), o fuerzas estéricas o iónicas. Todas estas condiciones van a hacer que, cada uno de los agregados que conforman la superestructura, tenga un determinado volumen de interacción, y en función de la forma de ese volumen se generarían diferentes superestructuras [30].

Presentan la desventaja de la pérdida de material a la hora de realizar el encapsulado, y de poder desestabilizarse debido a la presencia de azúcares y sales en la matriz en la que se encuentren [31].

Aunque se forman de manera espontánea, se puede proporcionar energía a la macroemulsión, con el fin de producir un reordenamiento de las moléculas obteniendo un menor tamaño de partícula, y logrando un equilibrio termodinámico en la fase acuosa, entre las posibles técnicas de adición de energía a la macroemulsión destacan sonicación de alta intensidad, homogeneización a alta presión, extrusión, homogeneización por membranas, y microfluidización. Lo que permiten estas técnicas es reducir el tamaño de las partículas, generando una suspensión de nanoliposomas, que han de ser capaces de retener su tamaño nanométrico y estabilidad, en todo el tiempo que permanezcan almacenados y hasta el final de su aplicación [25].

Todas las técnicas de nanoencapsulación son utilizadas para producir nanosuspensiones de compuestos activos, recubiertas con una capa exterior

---

---

de materiales pared, tanto en forma líquida como seca. Lo que permite la generación de las nanopartículas en forma seca es la posibilidad de controlar la liberación de los compuestos bioactivos. En contra el secado aumenta el stress sufrido por las partículas durante el procesado, por tanto hay que destacar la gran importancia que tienen las condiciones de secado, ya que van a ser significativas a la hora de estudiar la estabilidad de las nanocápsulas [25].



---

#### 4. OBJETIVOS

En el presente estudio se pretende observar el efecto que tiene el uso de distintas proporciones de agente encapsulante (Almidón modificado), agente surfactante (fosfatidilcolina, componente principal de la lecitina de soja), y concentración de extracto en la fase oleosa, en la conservación de los antioxidantes de extracto de salvado de trigo sometido a un proceso de encapsulación mediante secado por spray, y en la morfología y comportamiento final de las partículas.



---

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Materiales

Para la realización de los ensayos se usa una mezcla de extractos de aceite de salvado de trigo extraído a diferentes condiciones y mezclado para ser homogéneo, con 1634,06 ppm de ácido ferúlico, ácido esteárico, lecitina de soja (Glama-sot, SOTYA, S.A.) para la preparación de las microemulsiones, y agua desionizada, etanol del 96%, (Panreac), y almidón modificado (E-1450, Capsul), para el secado de las partículas.

### 5.2. Proceso de encapsulación del ácido ferúlico

#### 5.2.1. Preparación de la fase oleosa o dispersa

Se comienza con la realización de una fase oleosa, que posteriormente será encapsulada, la fase oleosa contiene ácido esteárico y diferentes cantidades de extracto. Se selecciona ácido esteárico como compuesto adicional para acompañar la fase dispersa puesto que evita que los antioxidantes estén sometidos a altas temperaturas, así como por su bajo coeficiente calorífico. Dentro de otros ácidos grasos se selecciona el esteárico puesto que, en comparación con otros de similar peso, como el ácido palmítico y el ácido tetradecanóico, permite una mayor eficacia y capacidad del encapsulado [32].

##### 5.2.1.1. Método

Se pesan por separado la cantidad de ácido esteárico y de extracto de salvado de trigo en una balanza analítica con un error de  $\pm 0,01 g$ , en un vaso de precipitados de 250 ml se mezcla el ácido esteárico y el extracto de salvado e introducimos un agitador. Tras realizar la mezcla se sitúa el vaso en una placa calefactora BioCote Stuart SD162, con agitación y un termostato dentro y fijamos la temperatura de calentamiento a 80°C, mantener agitación y calor hasta tener fundido todo el ácido esteárico y observarse una mezcla homogénea.

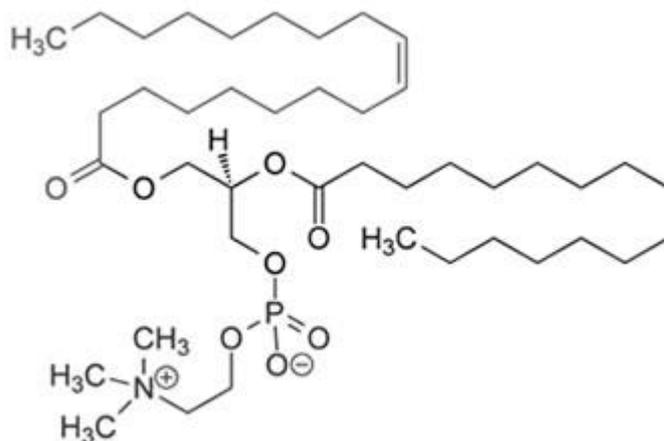
Para realizar los ensayos se usan 3 tipos distintos de muestra (Tabla 1), referido a la relación existente entre extracto y ácido esteárico que se van a introducir en el emulsionador, para ello se preparan 3 muestras con concentraciones de 10%, 20% y 30% referentes al porcentaje en peso que representa el extracto de salvado frente al peso total de la fase oleosa.

**Tabla 1:** Cantidades de ácido esteárico y extracto de salvado utilizadas para la elaboración de la fase oleosa

Extracto/Fase oleosa	Extracto de salvado (g)	Ácido esteárico (g)
10%	1,5	13,5
20%	3,0	12,0
30%	4,5	10,5

### 5.2.2. Preparación de la fase acuosa o dispersante

Se prepara la disolución, con una concentración de un 5% en peso, de lecitina de soja en agua. La lecitina de soja es un buen emulsionante puesto que consta de dos partes, una hidrófila y otra lipófila, gracias a estas partes se puede realizar la posterior emulsión, permitiendo que la parte lipófila se introduzca en la fase oleosa y la hidrófila en la fase acuosa (Figura 5) [33]. El uso de un surfactante apropiado permite la presencia estable de una emulsión bifásica, proporcionando una dispersión homogénea de la fase oleosa [34], los más extensamente utilizados para obtención de liposomas son los fosfolípidos [26]. Los fosfolípidos son una clase de lípidos anfifílicos caracterizados por la carga negativa del grupo fosfato que llevan en la cabeza, unida a cadenas de ácidos



**Figura 5:** Fórmula molecular de la lecitina de soja [64]

---

grasos no polares. De entre los diferentes fosfolípidos, el elegido es la lecitina de soja (fosfatidilcolina), que es un componente abundante en las membranas celulares tanto de plantas como de animales. Ha sido ampliamente utilizada como aditivo alimentario, emulsionante, y como agente encapsulante de sabores [26].

#### 5.2.2.1. Método

Se pesan las cantidades de agua desionizada y lecitina de soja (Glama-sot, SOTYA, S.A.) por separado en una balanza analítica con un error de  $\pm 0,01 g$ , tras lo cual se mezclan en un vaso de precipitados de 250 ml. Se sitúa el vaso sobre la placa calefactora termostatada BioCote Stuart SD162, se introduce la sonda en el vaso y se fija la temperatura a 80°C, manteniendo en todo momento agitación constante.

#### 5.2.3. Emulsión

Una emulsión es una dispersión de dos o más líquidos inmiscibles de manera más o menos homogénea. Un líquido (Fase dispersa) es dispersado en otro (Fase continua o dispersante), por lo tanto la emulsión que se realiza es de aceite en agua. Lo que va a determinar si una emulsión es de aceite en agua o de agua en aceite viene dado por la regla de Bancroft, que dice que la fase en la cual el surfactante es más soluble, es la fase continua, decir que, independientemente de en qué fase haya más solubilidad, a bajas concentraciones de surfactante, lo que nos va a determinar el tipo de emulsión va a ser la técnica utilizada [35].

Las emulsiones pueden producirse de forma natural, como en el caso de nuestro organismo, donde los jugos gástricos dispersan las grasas. Dentro de las emulsiones existen tres tipos, las diluidas, donde el volumen de la fase dispersa no excede el 0,1% del volumen total del sistema, suelen ser soluciones coloidales. El segundo tipo son las disoluciones concentradas, donde el volumen de la fase dispersa no excede el 74% del volumen total del sistema. Pueden verse desestabilizadas por efectos de sedimentación de

partículas, además también puede producirse coalescencia entre ellas, estratificándose la emulsión. El último tipo son aquellas donde el volumen de fase dispersa excede el 74% del volumen total del sistema, son similares a sólidos, y tienen tendencia a una inversión de fases, donde la dispersa pasa a ser el medio dispersante, y viceversa [36]. La emulsión utilizada en éste estudio es del segundo tipo.

En éste caso la fase dispersa es el extracto de salvado con el ácido esteárico, y la fase continua es agua, donde se usa un emulsionante para estabilizar la disolución, lecitina de soja.

El proceso de emulsión consta de dos partes, una primera es la generación de una macroemulsión, y la segunda se trata de la generación de una microemulsión por ultrasonidos.

#### 5.2.3.1. Método de generación de la macroemulsión

Las macroemulsiones son utilizadas para obtener pinturas, cosméticos, o procesado de textiles, y por su habilidad para transportar o solubilizar sustancias hidrofóbicas en una fase acuosa continua. En alimentación, se dan en mayonesas, o condimentos para ensalada, y han de permanecer estables durante el tiempo de vida que tengan. Generalmente son estabilizadas con compuestos anfifílicos, que disminuyen la tensión superficial, y generan una barrera física, estérica o eléctrica, alrededor de los compuestos que engloban [37].

Una macroemulsión es una mezcla, termodinámicamente inestable, de aceite y agua, se trata de dispersiones de partículas de entre 0,5 y 1  $\mu\text{m}$ , a través de las cuales la luz no pasa puesto que las partículas tienen el tamaño necesario para dispersar la luz visible. No pueden tener partículas de mayor tamaño, puesto que las fuerzas que se generan por las diferencias entre el aceite y el agua, hacen que se dispersen de nuevo. Cabe destacar que cuanto más energía sea proporcionada a la generación de una emulsión, menor tamaño de partícula se obtiene [38].

Hay dos vías principales de mejorar la estabilidad en una macroemulsión. Incrementar la concentración de surfactante, o reemplazar total o parcialmente el surfactante por un polímero. Los polímeros tienen elevado peso molecular y por tanto, su adsorción y desorción son más lentas que en compuestos surfactantes con menor peso molecular. La adición de polímeros supone el riesgo de variar las propiedades de la emulsión, y que termine teniendo las características únicamente del polímero [37].

#### 5.2.3.1.1. Método

Se dispone previamente de la fase oleosa y la fase acuosa a una temperatura de 80°C, la macroemulsión se genera al mezclar, con agitación mecánica, la fase acuosa y la oleosa con agitación a la temperatura de 80°C sobre la placa calefactora termostatada BioCote Stuart SD162. Es importante la realización de este proceso a 80°C, puesto que de lo contrario el ácido esteárico solidifica y variaría la composición de la fase oleosa invalidando los resultados.

Para cada concentración de fase oleosa se encuentran tres casos (Tabla 2), en función de la relación existente entre cantidad de fase oleosa respecto al peso total de la emulsión.

*Tabla 2: Cantidades de Fase oleosa, lecitina de soja y agua desionizada utilizadas para la elaboración de la macroemulsión*

<i>Fase oleosa/Total emulsión</i>	<i>Fase oleosa (g)</i>	<i>Lecitina de soja (g)</i>	<i>Agua desionizada (g)</i>
10%	15,0	6,75	128,25
20%	15,0	3	57
30%	15,0	1,75	33,25

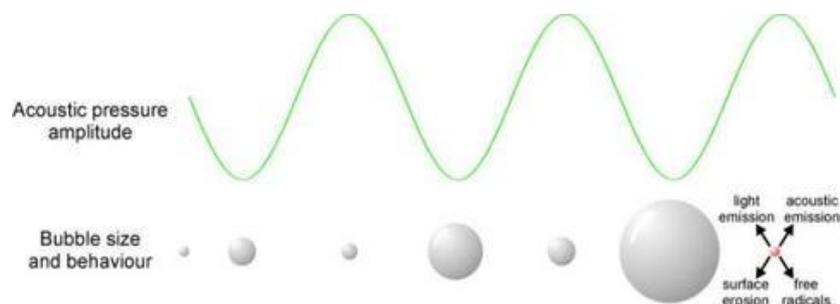
#### 5.2.3.2. Generación de la microemulsión por ultrasonidos.

Una microemulsión es una mezcla, termodinámicamente estable, de aceite y agua en forma de dispersión con partículas no mayores de 200 nm, las cuales

están dispuestas en forma de micelas [38]. Al generar la microemulsión lo que se obtiene es una dispersión con partículas de menor tamaño que las de la macroemulsión con una mayor estabilidad y homogeneidad [39], al mismo tiempo que se espera eliminar las posibles aglomeraciones de partículas existentes [40].

En el presente estudio la técnica usada para la generación de la microemulsión es la emulsión por ultrasonidos. La homogeneización por ultrasonidos está basada en la cavitación, que es la formación de la fase vapor cuando un líquido se somete a presiones reducidas, manteniendo constante la temperatura ambiente [41]. Cuando los líquidos están expuestos a intensas ondas de ultrasonidos, el sonido se propaga a través del líquido causando ciclos alternativos de alta y baja presión (En éste caso unos 20000 ciclos por segundo).

Durante el ciclo de baja presión se crean burbujas en el líquido, dado que se alcanza la presión de vapor del líquido a la temperatura de operación, cuando las burbujas alcanzan cierto tamaño, colapsan violentamente en el ciclo de alta presión (Figura 6). En ésta implosión se generan altas presiones y velocidades locales, que resultan en corrientes y turbulencias que rompen las aglomeraciones de partículas obteniendo partículas más pequeñas. Otro factor que influye a la hora de realizar una microemulsión con ultrasonidos es la amplitud de onda, se obtiene una cavitación más efectiva a mayor amplitud de onda [39].



*Figura 6: Comportamiento de las burbujas durante la homogeneización con ultrasonidos [65]*

---

#### 5.2.3.2.1. Método

Tras obtener la macroemulsión, se introduce a 80°C en el emulsionador. Se utilizó el emulsionador UP 400S Ultrasonic Processor (400 W, 24 KHz; Heilscher, Alemania) para conseguir la microemulsión, sonicando durante 10 minutos a 50% de intensidad y un ciclo de 0,5, manteniendo una agitación constante en el vaso en el que se realiza la emulsión.

#### 5.2.4. Realización de la suspensión

Para la realización de la suspensión se requiere disolver la emulsión, previamente preparada, en la disolución secante, compuesta por agua desionizada y etanol, que disminuye el calor latente de la misma, reduciendo el estrés térmico sufrido por las partículas a la hora del secado, puesto que no es necesario alcanzar temperaturas tan elevadas de evaporación, y por otro lado contiene el material de la pared disuelto, que va a servir como recubrimiento para el encapsulado. La microencapsulación de emulsiones usando carbohidratos es uno de los métodos más utilizados, con el fin de mejorar la estabilidad frente al calor y el tiempo de vida de las partículas [42]. En éste caso se trata de almidón modificado E-1450.

Los materiales de la pared deben ser capaces de formar emulsiones y estabilizar los componentes activos durante la fase inicial del secado, como otro requisito han de fluir con facilidad con una alta concentración de sólidos, y continuar protegiendo el componente activo una vez que éste se encuentra de forma particulada [43].

Dentro de los materiales estructurales se va a trabajar con almidón modificado E-1450 (Figura 7). Se trata de un material modificado química, enzimática, y físicamente, para mejorar las propiedades del almidón original [44]. En concreto el E-1450 se trata de octenil succinato sódico de almidón [45], con propiedades emulsificantes, soluble en agua fría y, en pocos casos, en agua caliente [46].

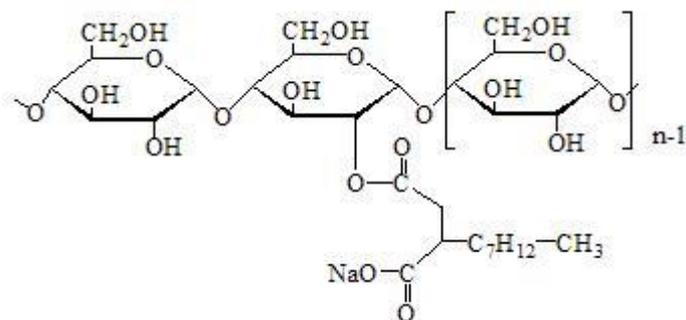


Figura 7 Estructura del almidón E-1450 [46]

#### 5.2.4.1. Método

Se toman 500 ml de agua destilada y 100 ml de etanol, y se introducen en una botella de capacidad de un 1 litro, posteriormente se pesa la cantidad necesaria de E-1450 para cada experimento, dependiendo del porcentaje de encapsulante con el que se vaya a trabajar (Tabla 3), usando una balanza analítica con un error de  $\pm 0,01$  g, añadiéndolo a la mezcla etanol agua, siempre con agitación constante, hasta que se disuelva, una vez disuelto el almidón se adicionan 30 g de emulsión y los 400 ml de agua destilada restante, manteniendo agitación constante a la hora de la realización del secado para lograr la máxima homogeneidad posible.

Tabla 3: Cantidades utilizadas para la preparación de la suspensión

	Emulsión (g)	E-1450 (g)	Etanol (ml)	Agua desionizada (ml)
1%	30,0	10	100	900
3%	30,0	30	100	900
10%	30,0	100	100	900

#### 5.2.5. Secado por spray

El secado de nanopartículas facilita el manejo almacenamiento y la dispersibilidad en disoluciones acuosas de las mismas. Las técnicas de nanoencapsulación en combinación con técnicas de secado son esenciales para transformar suspensiones en una forma seca y estable. Una de las técnicas más habituales es el secado por spray [25].

---

El secado por spray es una transformación continua de una alimentación en estado fluido en una corriente de salida particulada, formada mediante la atomización de la corriente de entrada en un medio secante, en éste caso aire [47].

Consta de cuatro procesos principales:

- Dispersión de la alimentación, mediante atomización.
- Mezclado del spray con el medio secante, de entre las opciones posibles, se selecciona un mezclado por co-corriente, donde el aire caliente entra en la misma dirección que la alimentación, permitiendo que la mayor temperatura del aire y la mayor cantidad de humedad se den al mismo tiempo reduciendo el stress térmico al que se encuentra sometida la muestra.
- Secado de la alimentación, éste proceso se comienza a dar tan pronto como comienza el contacto entre el aire seco y la muestra húmeda. Dada la gran área específica y la existencia de gradientes de humedad y temperatura la transferencia de materia y energía en ésta etapa es muy elevada.
- Por último la separación del producto del aire, en éste caso se usa un ciclón, donde las partículas sólidas se separan [48].

La atomización se lleva a cabo mediante una boquilla a presión o nozzle, que gira sobre sí misma, mediante esa rotación lo que logra es proporcionar energía cinética al fluido, generando a la salida de la boquilla una película delgada de fluido a alta velocidad, cuando esa película deja el nozzle, se forman los primeros ligamentos en el fluido que posteriormente pasan a ser gotas, éstas gotas, que contienen pequeñas partículas suspendidas dentro de ellas, pasan a estar expuestas al gas caliente, donde tiene lugar una rápida evaporación, en el momento que la evaporación ha finalizado la partícula comienza a calentarse, debido a lo cual se debe cuidar las temperaturas de entrada y salida de las corrientes en el secadero [47].

### 5.2.5.1. Método

El equipo usado es un secadero en spray modelo Mobile Minor de Gea Niro, se trata de un secador por atomización rotativa. La suspensión se bombea mediante una bomba peristáltica marca Watson-Marlow 520R, funcionando a 7,8 r.p.m. La presión del nozzle del secadero se fija en 2,8 bares, y las temperaturas de trabajo fueron 90°C para la corriente de alimentación y 60°C para la corriente de salida.

Para la puesta en marcha primero se enciende el ventilador del secadero, y seguidamente la resistencia para calentar el aire, mantener únicamente el flujo de aire hasta que la corriente de salida alcance aproximadamente 60°C, ya que así se proporciona cierta inercia térmica al sistema. Una vez alcanzada la temperatura se comienza a bombear una corriente de agua desionizada, que va a permitir ajustar las temperaturas de entrada y de salida del secadero adecuadamente cuando un líquido pasa a través de él, ya que normalmente se producen ciertos saltos de temperatura a la hora de comenzar a bombear líquido. Cuando, al bombear agua, se alcanza una temperatura de salida de en torno a los 58°C se puede comenzar a bombear la solución que se quiere secar. Finalmente se recoge la muestra secada, se pesa, y se almacena para la posterior medida de antioxidantes.



Figura 8: Esquema de secadero en spray [67]

### 5.2.6. Medida del contenido total de polifenoles en la muestra

Los polifenoles se caracterizan por tener en su estructura uno o más grupos hidroxilo, unidos a, al menos, un anillo aromático [12]. En ésta prueba el polifenol a analizar se trata del ácido ferúlico, caracterizado por disponer de un grupo ácido en su estructura, y ser el antioxidante mayoritario presente en el salvado de trigo. La medida de los mismos va a realizarse mediante el método de Folin Ciocalteu, que permite determinar los polifenoles totales en una disolución mediante espectrofotometría con ultravioleta visible, se trata de un método sensitivo [49].

Los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu (fosfomolibdato y fosfotungstenato sódicos), resultando un compuesto con coloración azul que puede ser determinado espectrofotométricamente a 750 nm [50]. Durante la reacción se produce una reducción del  $\text{Mo}^{+6}$  a  $\text{Mo}^{+5}$ , que es azul y puede ser medido ópticamente [51]. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos cromógenos de tungsteno ( $\text{W}^{8}\text{O}^{23}$ ) y molibdeno ( $\text{Mo}^{8}\text{O}^{23}$ ), siendo proporcional el color al número de grupos hidroxilo de la molécula [10]. Es uno de los mejores métodos para determinar el contenido en polifenoles totales en vino, extractos de plantas y productos similares, aunque puede presentar una serie de problemas ya que, al no tratarse de un método específico, puede estar afectado por otras moléculas reductoras no fenólicas y, por lo tanto, hay que tener cuidado con moléculas de éste tipo [52].

Para medir la coloración se utiliza una espectrofotometría de ultravioleta visible, que consiste en la utilización de luz en los rangos del visible, infrarrojo cercano y ultravioleta cercano, para la determinación de la concentración de una disolución con la Ley de Lambert-Beer, a partir de la absorbancia que presenta. Para ello se utiliza un espectrofotómetro, que permite medir la intensidad de luz que pasa a través de la muestra, y compararla con la intensidad de la luz antes de incidir en la misma, para posteriormente calcular la absorbancia que presenta como el  $-\log(I/I_0)$  [53].

#### 5.2.6.1. Método

Se toman 0,5 g de la muestra a analizar, y se disuelven en 10 ml de una disolución agua-etanol al 50% en volumen con pH 1 (acidificado con ácido sulfúrico), tras lo cual se lleva a un baño de ultrasonidos durante 10 min, para ayudar a que el disolvente haga buen contacto con los antioxidantes y se extraigan del sólido. Una vez hecho se filtra la muestra con un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  para eliminar todos los sólidos posibles de la muestra. Tras lo cual la muestra se hace reaccionar con reactivo de Folin-Ciocalteu, donde la disolución adopta color azulado, y se analiza la coloración en un espectrofotómetro, con una longitud de onda de 754 nm, donde en función de la absorbancia, y mediante la Ley de Lambert-Beer se determina la concentración de polifenoles totales en la muestra.

#### 5.2.7. Microscopía electrónica de barrido

El fundamento del SEM (Scanning electron microscopy) (Figura 9) radica en que los electrones emitidos por un cátodo de tungsteno pasan a través de una columna, en la que se ha hecho un vacío de hasta  $10^{-7}$  mmHg. En ella, el haz inicial es concentrado por una serie de lentes electromagnéticas desde entre 25000 y 50000 nm a 10 nm. El haz electrónico se desplaza por toda la superficie de la muestra, e irá barriéndola. Al incidir el haz electrónico en la superficie, se producen electrones secundarios, que son captados por un detector, dando origen a varios fotones. Los fotones pasan por un fotomultiplicador, amplificando la señal recibida pasando a través de los dínodos, hasta finalmente obtener más electrones. Esos electrones, tras pasar por un videoamplificador, se dirigen a un tubo similar a un osciloscopio de rayos catódicos, sobre cuya pantalla se produce la imagen [54].

El SEM permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, entregando información morfológica del material analizado. Se pueden realizar estudios de aspectos morfológicos de zonas microscópicas de distintos materiales. Alcanzan una resolución de hasta 100 Angstrom, y tiene una gran profundidad de campo que resuelve una imagen

tridimensional de la muestra [55]. Presenta la ventaja de poder caracterizar materiales sólidos, pero con la limitación de sólo poder analizar sólidos [56].



*Figura 9: Microscopio de barrido de electrones de la Universidad de Valladolid [69]*

#### 5.2.7.1. Método

Se pega la muestra en una lámina adhesiva de carbono, y se sacude para eliminar las partículas que puedan despegarse o moverse durante la experiencia, la muestra se introduce en una cámara donde su presión se reduce hasta 3 mmHg, tras lo cual se realiza un barrido del sólido para obtener la imagen final.

#### 5.2.8. Medida del tamaño de partícula

La determinación del tamaño de partícula se llevó a cabo mediante difracción láser (Mastersizer 2000 de Malvern). El fundamento de éste análisis es que la luz difractada por las partículas es captada por distintos detectores y transformada en valores de tamaño en función de los índices de refracción de los materiales. Las mediciones las realizan dos láser, rojo y azul, que trabajan a 633 y 466 nm respectivamente [57].

Este equipo acoplado a un sistema de alimentación de polvo seco (Sirocco, Malvern), fue usado para el análisis de las muestras secas. Para el análisis de muestras por vía húmeda, en suspensión, se utilizó un sistema de alimentación por vía líquida (Hydro 2000 SM, Malvern).

#### 5.2.8.1. Método

Para llevar a cabo la medida de las muestras por vía seca, se sitúa la bandeja para entrada de material, que está preparada para alimentar entre 2 y 10 gramos de muestra, previa entrada al tubo, hay una cubeta filtro con bolas, que con la vibración que aplica el equipo para desplazar el material, separan las aglomeraciones de partículas.

Para las muestras por vía húmeda, se realizó una suspensión de la muestra en agua destilada, tras lo cual se llevó a agitación, hasta obtener una suspensión homogénea. Una vez preparada la muestra se procede a su medida, se introduce en el sistema de alimentación por vía húmeda del dispositivo, y se obtiene la medida final. Entre muestra y muestra, lavar al menos tres veces, con el fin de evitar restos que puedan alterar futuras medidas.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Concentración de antioxidantes en las muestras

Con el fin de medir el efecto del secado en spray y de las condiciones del proceso de la microencapsulación en el contenido final de antioxidantes, se ha medido el contenido total de polifenoles, mediante el método de Folin-Ciocalteu en los encapsulados finales.

Éstos resultados se encuentran recogidos en la tabla 4.

*Tabla 4: Medidas de polifenoles totales para las muestras encapsuladas.*

Extracto/Fase oleosa (% masa)	Fase oleosa/Emulsión (% masa)	CAPSUL/Disolución secante (% masa)	Concentración de polifenoles medida (ppm)	Concentración de polifenoles teórica (ppm)
10%	10%	1%	214.760	34,162
10%	10%	3%	184.800	14,271
10%	10%	10%	286.600	4,698
10%	20%	1%	144.200	57,002
10%	20%	3%	189.380	26,356
10%	20%	10%	283.560	9,146
10%	30%	1%	931.140	73,349
10%	30%	3%	597.060	36,720
10%	30%	10%	188.880	13,364
20%	10%	1%	454,140	68,323
20%	10%	3%	201,320	28,543
20%	10%	10%	345,240	9,396
20%	20%	1%	258,680	114,004
20%	20%	3%	241.680	52,712
20%	20%	10%	215.020	18,292
20%	30%	1%	283.060	146,699
20%	30%	3%	75.900	73,441
20%	30%	10%	211.980	26,727
30%	10%	1%	694,800	102,485
30%	10%	3%	543,260	42,814
30%	10%	10%	694,800	14,093
30%	20%	1%	547,560	171,006
30%	20%	3%	524,220	79,067
30%	20%	10%	379,260	27,438
30%	30%	1%	640,000	220,048
30%	30%	3%	306,400	110,161
30%	30%	10%	366,560	40,091

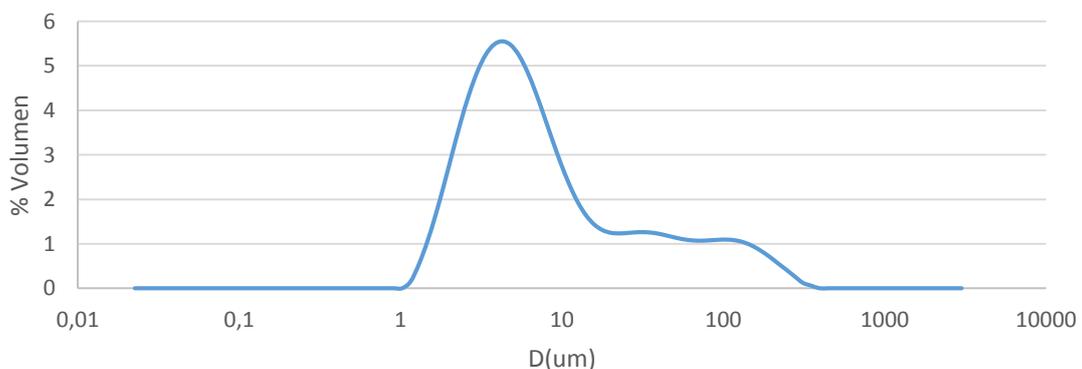
Las muestras destacadas en color naranja, son las que corresponden a las que han sido analizadas estructuralmente, tanto en tamaño de partícula, como en el SEM. Las muestras destacadas en color morado son las que han dado los resultados más alto, y más bajo en el TPC, y cuyo tamaño de partícula es analizado para poder plantear posibles interferencias en la medida.

El factor más destacable dentro de los resultados es que, todos ellos tienen un valor de TPC superior al teórico calculado, posiblemente debido a interferencias. La medida del contenido total de polifenoles, al ser calculada mediante absorbancia, puede estar condicionada por la presencia de partículas en la suspensión, el filtro utilizado para eliminar las partículas de las muestras a analizar, tiene una luz de 220 nm y, en caso de haber partículas de menor tamaño presente, la medida podría verse afectada y ser errónea, sería necesario por tanto, usar un filtro con una luz de malla inferior al mínimo tamaño de partícula presente en la suspensión, con el fin de obtener una medida correcta de los polifenoles.

Para comprobar la influencia de las partículas en suspensión a la hora de tomar la medida, se realiza un Light Scattering por vía húmeda, tras haber sido sometida cada muestra a un baño de ultrasonidos 45 min, sobre las muestras más y menos concentradas, según resultados del TPC, y para observar la influencia de las partículas no retenidas. Distribuciones de tamaño de partícula:

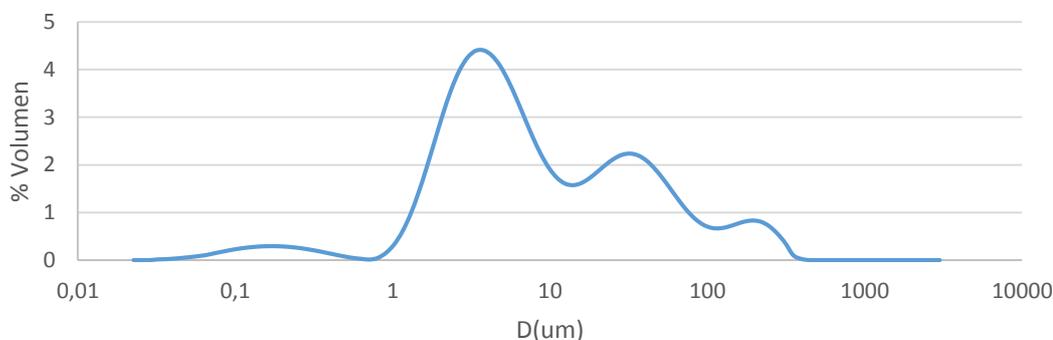
- Muestra 1:

La que más TPC ha mostrado en los resultados (10% Ext/F.Oleosa, 30% F.Oleosa/Emulsión, 1%CAPSUL).



- Muestra 2:

La que menos TPC ha mostrado en los resultados (20% Ext/F.Oleosa, 30% F.Oleosa/Emulsión, 3%CAPSUL).



Se observa que en la muestra 1, no hay partículas por debajo del rango de los 220 nm, y en la muestra 2 sí, lo cual querría decir que los resultados de la muestra 2 deberían ser los mayores, al no ser éste el caso, se puede descartar la alternativa de la presencia de partículas en suspensión, como posible alteración de la medida de polifenoles totales. Se requiere buscar otras alternativas posibles.

La medida de polifenoles totales con el método de Folin-Ciocalteu presenta el problema de no ser específica, ya que el reactivo de Folin-Ciocalteu puede reaccionar con otras sustancias como azúcares, aminas aromáticas, dióxido de azufre, ácido ascórbico, y ácidos y bases orgánicas [58]. Además los polifenoles se suelen degradar con facilidad, dando lugar a más radicales libres, que reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, obteniéndose una mayor coloración, y que supone un error añadido al resultado [59].

Generalmente el resultado de éste método se proporciona en equivalentes de ácido gálico, que puede no ser el standard ideal, puesto que en caso de existir un mayor número de grupos fenólicos en la muestra a analizar, puede dar lugar a resultados erróneos. Por tanto a modo general, el método de Folin-Ciocalteu suele permitir una estimación del resultado final que se va a obtener, pero no un resultado exacto, ya que los resultados del mismo suelen ser superiores al real [58].

Con el fin de determinar adecuadamente los polifenoles presentes sería recomendable acudir al uso de un método standard. Los métodos standard para la medida y determinación de un compuesto particular suelen ser HPLC, y espectrofotometría de masas [58].

Por último como otras posibles vías para determinar los polifenoles, en éste caso la posibilidad que permite el ácido ferúlico, sería la medida de flavonoides totales o bien la medida de actividad antioxidante, según los métodos descritos por Al-Saeedi y otros [60].

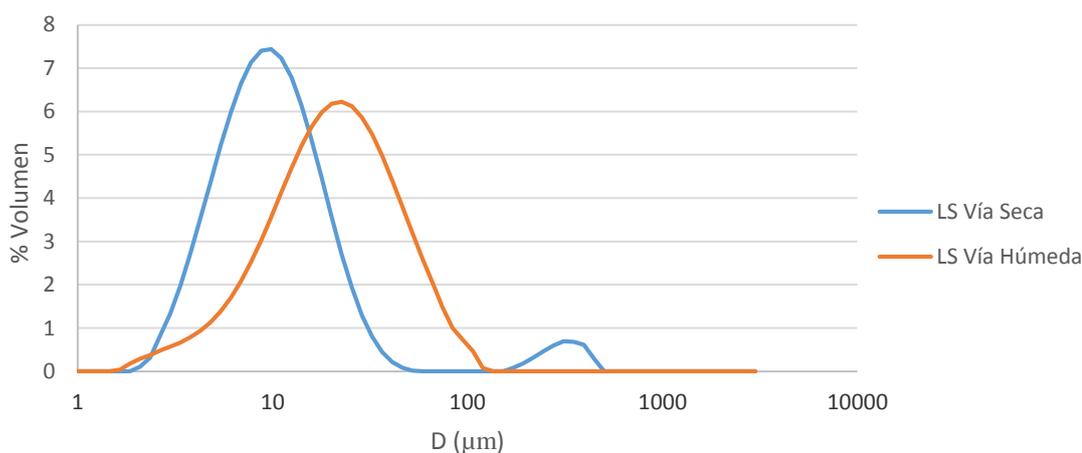
Estas últimas, junto con el uso de métodos standard, podrían ser unas buenas alternativas para el caso presente, en la determinación de ácido ferúlico, por otro lado, y observando los resultados teóricos que deberían obtenerse, al ser concentraciones tan bajas, los resultados que nos pueda proporcionar el método de Folin-Ciocalteu podrían no llegar a ser fiables, ya que un mínimo error, alteraría en demasía el resultado final, bien sea por alteración, o por falta de fiabilidad en la escala, como ha terminado resultando.

## 6.2. Análisis de morfología y tamaño de partícula

Se analizó el tamaño de partícula mediante Light Scattering (LS). Para observar el efecto de tener las partículas en suspensión o las partículas en sólido, la medida se hizo tanto por vía húmeda como por vía seca, para tres muestras que fueron analizadas por microscopía electrónica de barrido (SEM). Las tres muestras fueron seleccionadas con el fin de comparar, entre la 1 y la 2, la influencia de una mayor cantidad de fase oleosa en la emulsión, y entre la 1 y la 3, comparar la influencia de la cantidad de CAPSUL en la estructura y tamaño finales de las partículas.

### - Muestra 1:

Muestra con un contenido de extracto en fase oleosa del 30%, un 10% de fase oleosa en la emulsión, y un 1% de CAPSUL (Porcentajes en peso). Los resultados obtenidos fueron los siguientes:



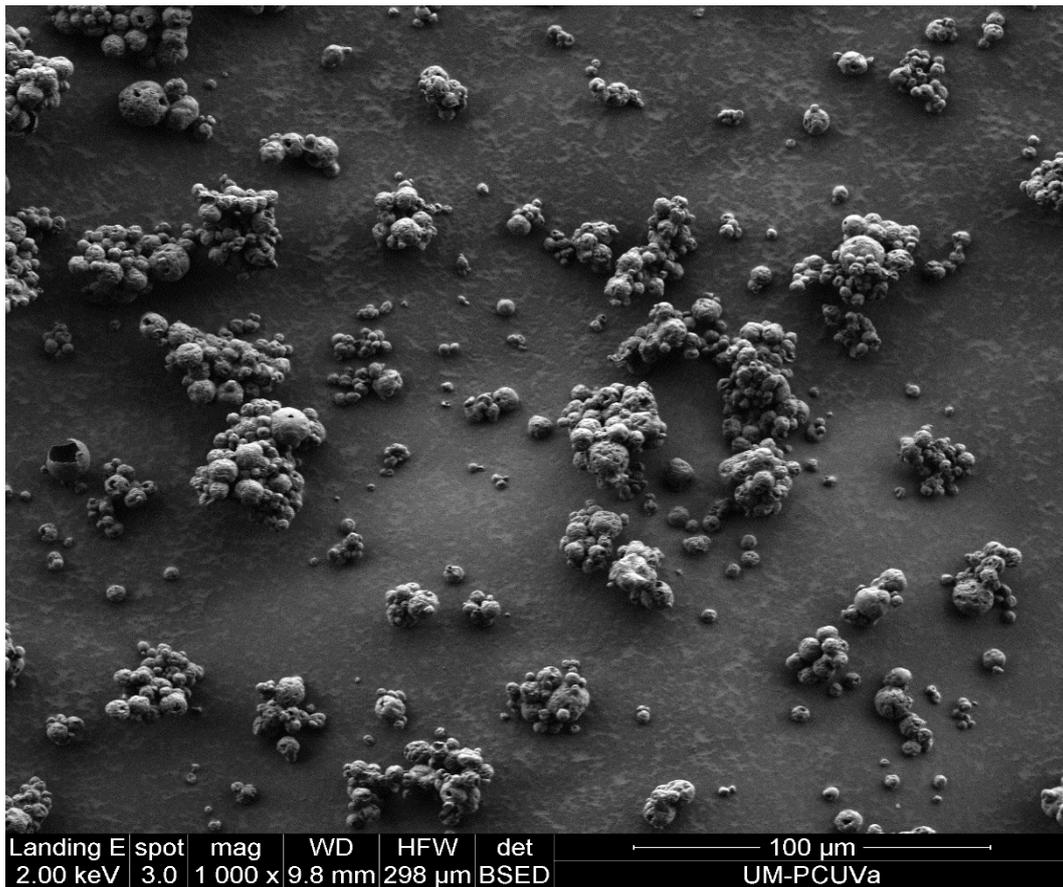
**Figura 10:** Distribución del tamaño de partícula.

**Tabla 4:** Percentiles de tamaño de partícula

	d ( $\mu\text{m}$ ) 10%	d ( $\mu\text{m}$ ) 50%	d ( $\mu\text{m}$ ) 90%
Vía seca	4,16	9,067	21,285
Vía húmeda	6,643	19,501	48,931

Se puede apreciar que, la muestra por vía seca (Figura 10), presenta una distribución binodal, donde la mayor parte de partículas se encuentran en la región de las 9 micras, y con un pico en la región de las 200 micras, posiblemente causado por partículas de mayor tamaño que no pudieron ser

desaglomeradas antes de ser medidas. Además se observa un aumento del tamaño de partícula medio en vía húmeda con respecto a vía seca (Tabla 4), pasando de 9 micras en vía seca a 19 en vía húmeda, para explicar esto es necesario recurrir a las imágenes tomadas por SEM, para conocer la topología de la superficie de la partícula, y observar cómo puede influir en la agrupación e interacciones de las partículas entre sí.



*Figura 11: SEM 1000 x de la muestra 1. Plano general.*

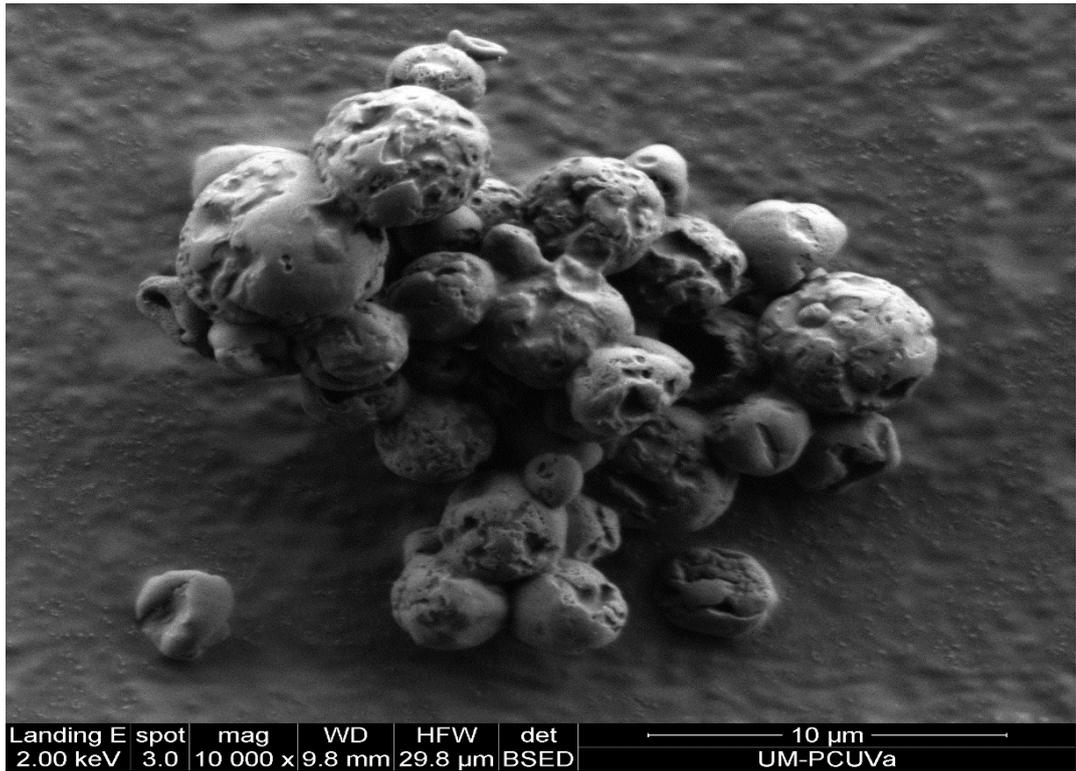


Figura 12: SEM 10000x de la muestra 1. Zoom de una aglomeración

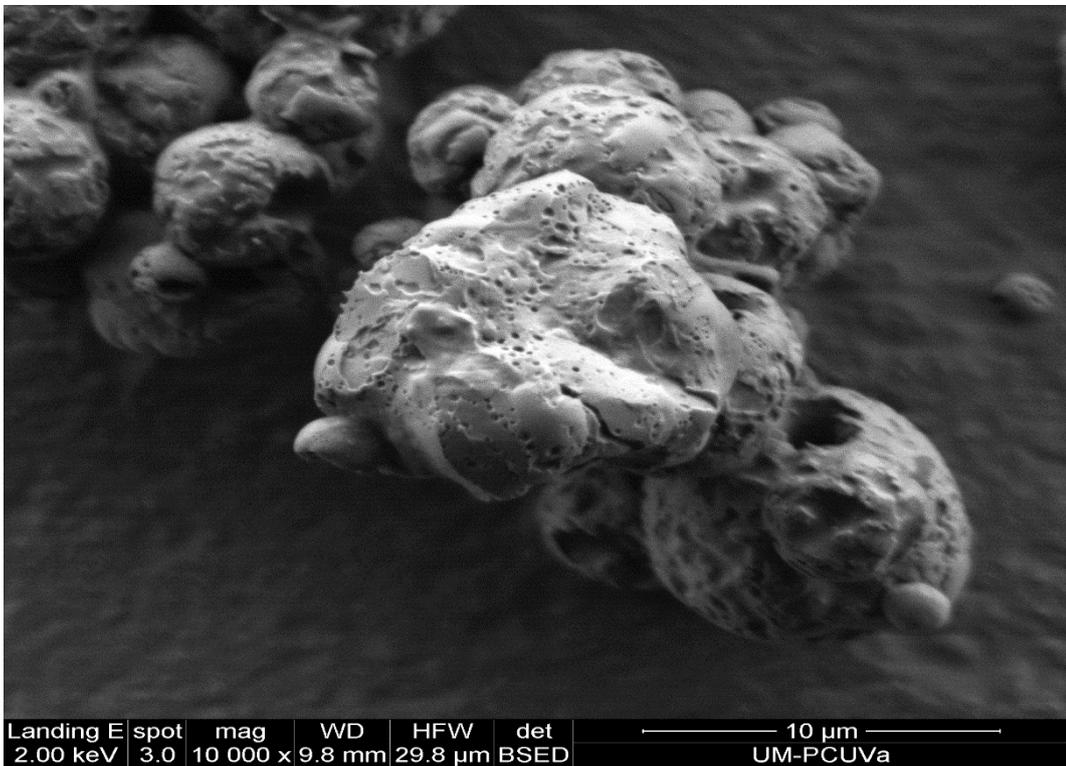


Figura 13: SEM 10000x de la muestra 1. Superficie porosa de partícula.

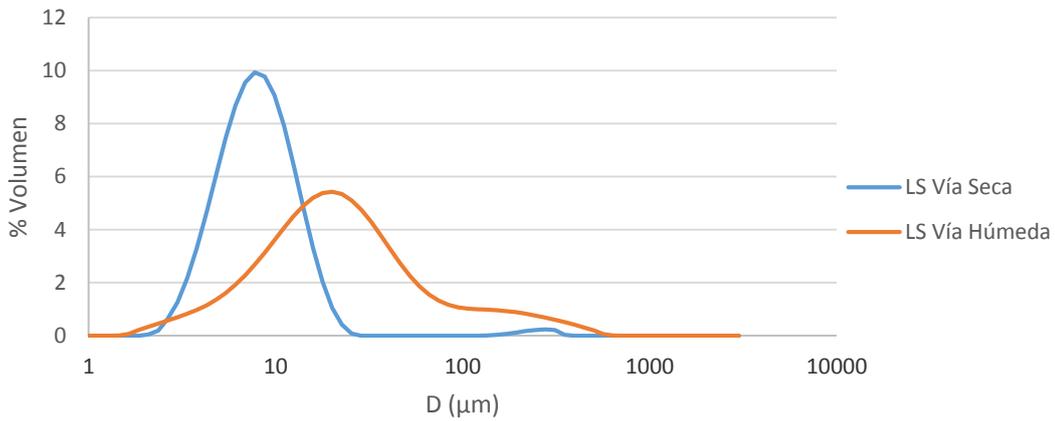
Recurriendo a las imágenes tomadas por SEM, se observa que las partículas presentan un tamaño promedio de 5,917 micras, frente a las 9,067 micras de tamaño medido por vía seca mediante Light Scattering, aunque hay que destacar que en función del lugar donde se tome el plano del SEM, los tamaños medios pueden variar. También se aprecia que están aglomeradas en un principio (Figura 1), aunque esto no supone motivo suficiente para justificar la diferencia de tamaño medio de partícula por ambas vías, ya que el hecho de que se encuentren de esa forma en sólido no significa que en líquido se comporten de la misma forma, lo que hay que destacar es la porosidad de la superficie de la partícula (Figura 12, Figura 13).

La porosidad puede estar debida a dos causas, la primera en función de la velocidad de secado, donde menores velocidades de secado dan lugar a partículas más densas (menos porosas), debido a que la concentración de surfactante se distribuye cerca de la superficie de la gota (droplet) [61], para lo cual es necesario comparar ésta muestra con otras con mayor velocidad de secado, y la segunda la cantidad de encapsulante utilizado. La emulsión antes de ser secada, se dispersa al 3% en volumen en la disolución secante, que contiene etanol, agua, y el material pared, al estar en tan baja proporción se podría admitir que la distribución por todo el volumen es buena, y por tanto se distribuye en pequeñas gotas, lo cual supone una gran superficie de partícula. Al tener una gran área el problema es, que la cantidad de material pared, puede no ser suficiente para recubrir completamente a todas las partículas, en éste caso, y que por lo tanto, se formen poros en la superficie de las mismas [62].

En otros experimentos se ha demostrado que existe una relación que muestra que, el ratio de aglomeración, se encuentra fuertemente influenciado por la energía superficial de las partículas [63]. Lo cual podría ser la causa de que, en suspensión, las partículas de alta energía superficial, se aglomeren con el fin de reducir dicha energía.

- Muestra 2:

Muestra con un contenido de extracto en fase oleosa del 30%, un 20% de fase oleosa en la emulsión, y un 1% de CAPSUL (Porcentajes en peso). Se obtienen los siguientes resultados:



**Figura 14:** Distribución del tamaño de partícula.

**Tabla 6:** Percentiles de tamaño de partícula.

	d (µm)10%	d (µm) 50%	d (µm) 90%
<b>Vía seca</b>	4,047	7,388	13,318
<b>Vía húmeda</b>	6,036	19,499	96,065

Al igual que en el caso anterior, el tamaño de partícula en suspensión, es mayor que el tamaño de partícula en sólido, la medida por vía seca presenta dos picos, posiblemente por aglomeraciones a la hora de medir, en contraste por vía húmeda se presenta sólo uno pero más ancho, posiblemente debido a las aglomeraciones de partícula en suspensión, que aumentan el tamaño medio obtenido lo cual podría ser justificado en caso de presentar porosidad la superficie, por lo que es necesario observar la superficie con SEM.

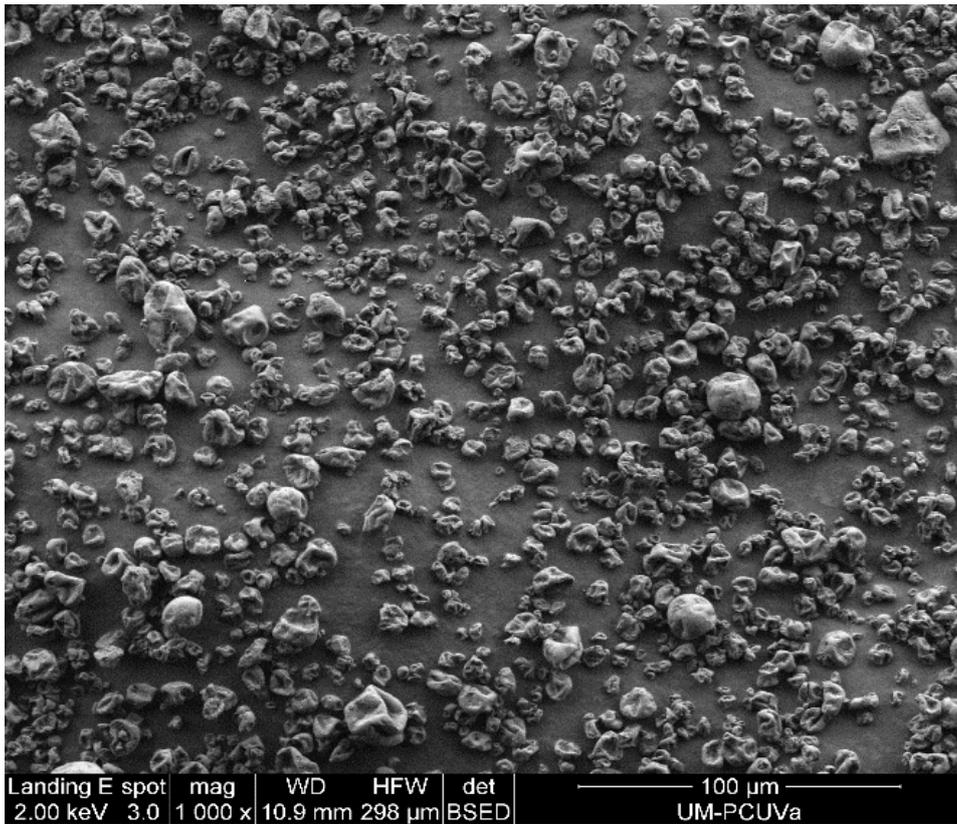


Figura 15: SEM 1000x de la muestra 2. Plano general.

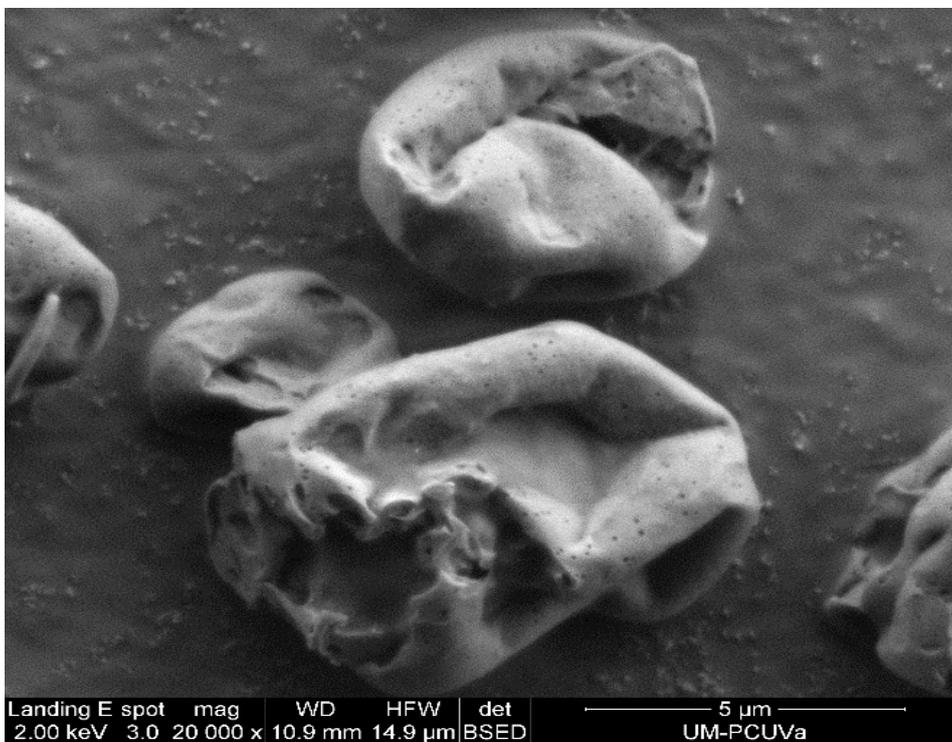


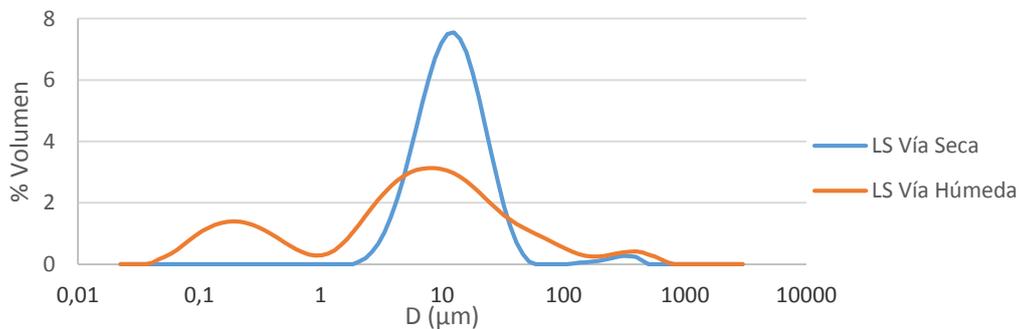
Figura 16: SEM 20000x de la muestra 2. Superficie porosa de la partícula.

En el plano general (Figura 15) no se aprecia una aglomeración de partículas, además las partículas presentan un tamaño promedio de 7,98 micras, valor muy similar a las 7,388 micras medidas mediante Light Scattering.

En el primer plano de la superficie de la partícula (Figura 16) se observan microporos que, como se ha dicho antes, podría motivar la aglomeración de partículas, con el fin de reducir la tensión superficial, y que explicaría que en vía húmeda, se tuviese un tamaño medio de partícula superior al tamaño medio en vía seca. Presenta un comportamiento similar al de la muestra 1, lo cual permite plantear la hipótesis de que la proporción de fase oleosa en la emulsión no tiene influencia en la estructura y tamaño final obtenido.

- Muestra 3:

Muestra con un contenido de extracto en fase oleosa del 30%, un 10% de fase oleosa en la emulsión, y un 10% de CAPSUL (Porcentajes en peso). Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

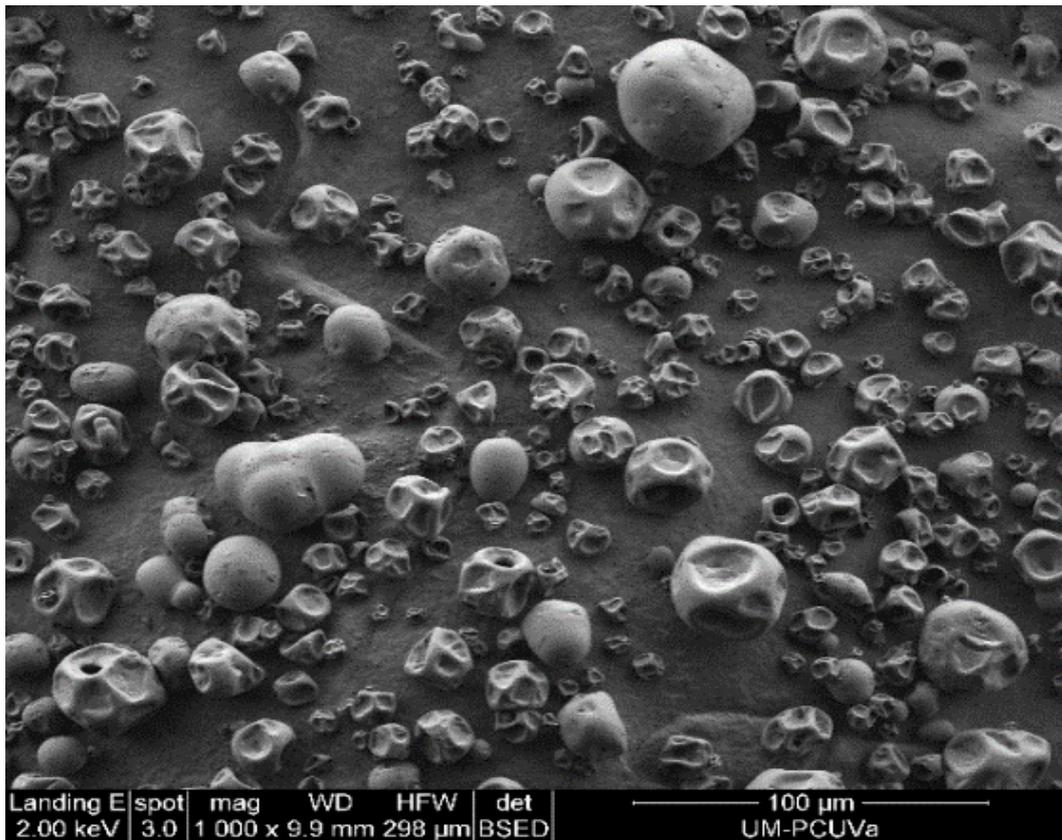


**Figura 17:** Distribución del tamaño de partícula.

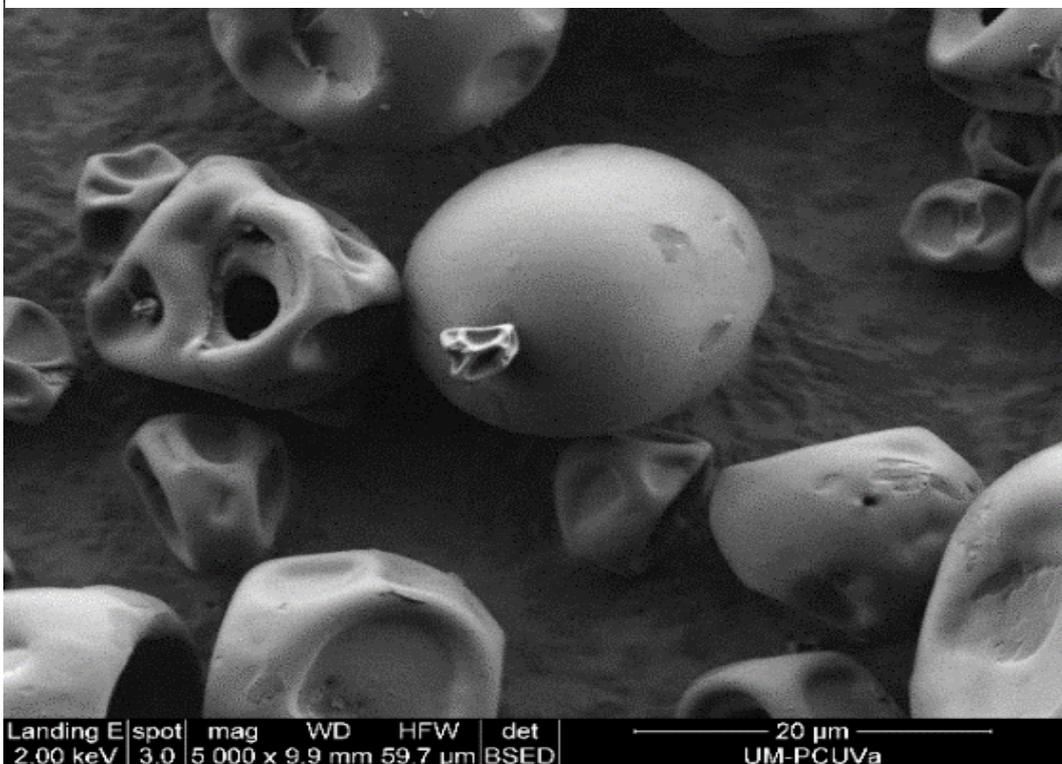
**Tabla 5:** Percentiles de tamaño de partícula.

	d (µm)10%	d (µm) 50%	d (µm) 90%
Vía seca	4,998	11,137	24,382
Vía húmeda	0,172	6,287	48,232

En éste caso, se observa que el tamaño de las partículas en suspensión, es menor que el de las partículas medidas en forma de sólido. Para explicar el motivo, al igual que en el primer caso, y recurriendo al uso de SEM, se estudia la topología de la superficie de las partículas con el fin de justificar este hecho.



*Figura 18: SEM 1000x de la muestra 3. Plano general.*



*Figura 19: SEM 5000x de la muestra 3. Superficie lisa de la partícula.*

En la imagen del plano general (Figura 18), no se aprecia aglomeración de partículas en la muestra en estado sólido, aunque como antes se ha dicho, esto no indica que se comporte de igual manera en estado sólido que en suspensión, presentan un tamaño promedio de 14,90 frente a las 11,137 micras de tamaño promedio medidas por Light Scattering de vía seca, aunque existen algunas de mayor tamaño, que son las que hacen que, en la distribución de tamaño de partícula por vía seca, se aprecien dos picos, uno en torno a las 10 micras y otro en el rango de las 100.

En lo respectivo a la superficie (Figura 19) no se aprecia la presencia de poros, por lo tanto, la tensión superficial va a ser baja, lo que podría propiciar que no se formen aglomeraciones.

Con respecto a la diferencia de tamaño (Figura 17), por vía seca un tamaño medio de 11 micras y por vía húmeda un tamaño medio de 6, cabe destacar que por vía húmeda se observa una distribución trinodal, el primer pico corresponde a partículas de 200 nanómetros, que podrían ser las que, en sólido estuviesen aglomeradas, y en líquido se disgreguen, un segundo pico en las 10 micras, aunque menor que el de vía seca ya que hay parte del volumen que se disgrega dando partículas de 200 nm, y el tercer pico en el rango de las 100 micras, correspondiente a partículas de gran tamaño, posiblemente aglomeraciones de algunas partículas porosas.

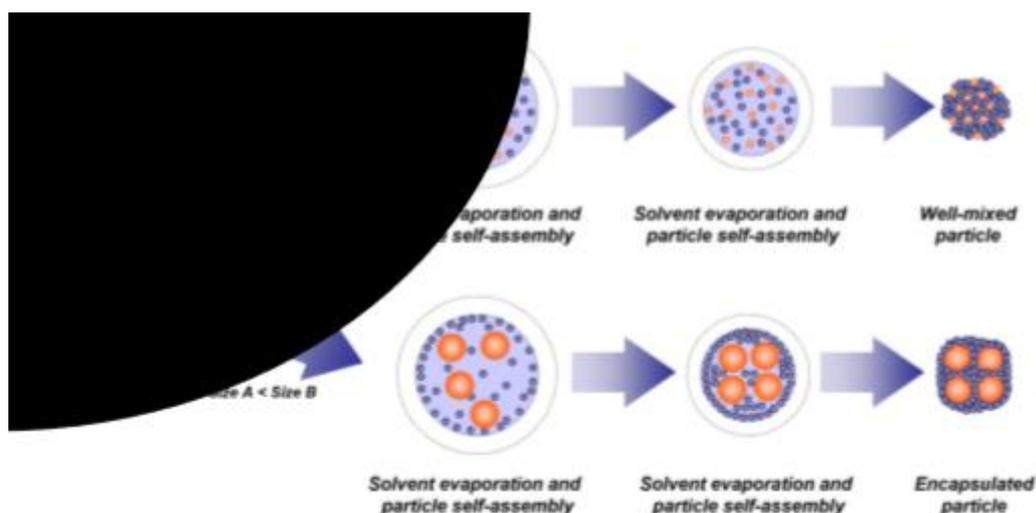
La diferencia de tamaño medio, se podría explicar en función de las características del medio utilizado para cada medida. En suspensión las partículas tienden a extenderse, lo habitual en las partículas en suspensión es que se separen, ocupando el máximo volumen posible, con el objetivo de reducir las interacciones entre ellas, de éste modo adquieren una estructuración dentro del disolvente, la cual varía dependiendo de las fuerzas de interacción existentes en las partículas, como pueden ser fuerzas repulsivas o atractivas por cargas electrostáticas [36], y por lo tanto, en el caso del sólido, es posible que la medida del tamaño de partícula sea resultado, no de partículas individuales sino de aglomeraciones, y en el caso del líquido, al estar las partículas más dispersas,

se haya podido medir el tamaño de partícula real, sin tener posibles aglomeraciones en la muestra.

Haciendo referencia a la morfología lisa o porosa de las partículas, anteriormente se ha mencionado la posibilidad de que sea la velocidad de secado, o la cantidad de agente encapsulante.

La diferencia existente entre la muestra 1 y la 3 es la cantidad de CAPSUL, al utilizarse más CAPSUL en la tercera muestra, se puede decir que la cantidad de disolvente que acompaña a cada partícula durante el proceso de secado, es menor que en la primera, y por lo tanto el proceso de secado se lleva a cabo más rápido en la tercera muestra.

Según lo planteado, a mayor velocidad de secado, más porosidad, al no ser ésta la situación, se podría descartar que la porosidad provenga como motivo de la velocidad de secado, y por lo tanto optar por la segunda alternativa, que sea por la cantidad de encapsulante, que no puede recubrir a todas las partículas de la emulsión presente en el medio secante, es un planteamiento lógico mirado desde el aspecto de que, la muestra 2, contiene mayor cantidad de CAPSUL y no presenta poros, y la muestra 1, tiene menor cantidad y sí los presenta, por tanto la cantidad de CAPSUL podría ser la causa de la presencia de los mismos.



*Figura 20: Mecanismo de preparación de partículas por spray drying [62]*

En la Figura 20 puede observarse el mecanismo de generación de las partículas mediante secado por spray. En un principio las partículas están distribuidas homogéneamente en el droplet, progresivamente la temperatura se incrementa, hasta que se alcanza una región llamada menisco, que marca el inicio de la evaporación del disolvente retenido en la gota, el disolvente se va evaporando y las partículas van perdiendo movilidad, hasta que finalmente quedan fijadas unas a otras, y por impedimentos estéricos no pueden moverse. Al secar partículas de similar tamaño, la movilidad de unas partículas en comparación con las otras es similar, el problema surge al secar partículas de tamaños distintos, las partículas más grandes tienen un movimiento más lento en comparación con las más pequeñas, y por lo tanto se forman heterogeneidades en las partículas, situándose las partículas más pequeñas en la superficie formando un recubrimiento [62].

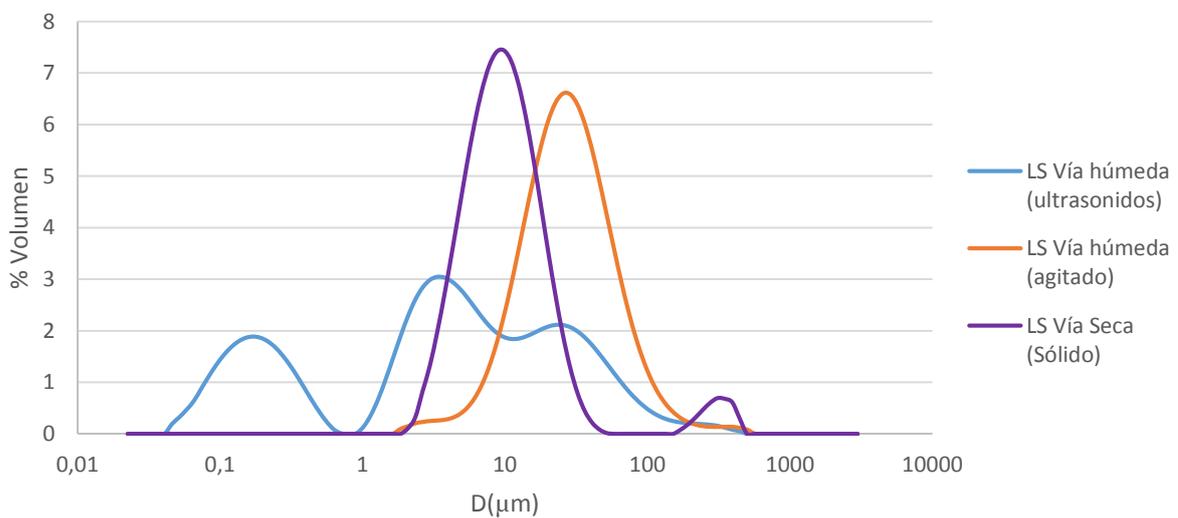
Las imágenes mostradas por SEM muestran partículas formadas por agregados de partículas más pequeñas, el problema de la escasez de agente pared, es que las partículas que van a formar los agregados finales, van a tener un mayor tamaño, con el fin de reducir la superficie a recubrir, y por lo tanto al juntarse unas con otras para formar la estructura observada, presentan una mayor irregularidad en su superficie, que si están formadas por partículas más pequeñas, que permitirían observar una distribución más homogénea, y por tanto una estructura menos porosa.

Observando éste suceso, se podría estudiar el efecto que tiene en la superficie de las partículas la cantidad de CAPSUL, y determinar una relación entre ambas para marcar una proporción, que permita prever qué tipo de superficie será obtenida, en función de la relación de emulsión-material pared tomada.

- Aglomeración y poros:

Anteriormente se ha planteado la hipótesis de la existencia de aglomeraciones de partículas porosas en suspensión, con el fin de comprobar la existencia de dichas aglomeraciones, se toma una de las muestras previamente analizada por SEM y de la que se conoce la superficie, en éste caso la de relación 30%

de extracto en la fase oleosa, 10% de fase oleosa en la emulsión, y un 1% de CAPSUL, todos en porcentaje en peso, y se disuelve en agua destilada. Para llevar a cabo la medida del tamaño de partícula, pero ésta vez preparando una mayor cantidad de muestra, tras lo cual la muestra se separa en dos, una mitad se lleva a agitación, y la otra a un baño de ultrasonidos, con el objetivo de romper las aglomeraciones. Tras haber mantenido cada una de las muestras 45 minutos, una en el baño de ultrasonidos, y la otra en agitación continua, se mide el tamaño de partícula de las suspensiones con un Light Scattering por vía húmeda. Los resultados obtenidos, junto con los del sólido, son los siguientes:



**Figura 21:** Distribución del tamaño de partícula.

**Tabla 7:** Percentiles de tamaño de partícula.

	d (µm) 10%	d (µm) 50%	d (µm) 90%
<b>Vía seca (Sólido)</b>	4,160	9,067	21,285
<b>Vía húmeda (Agitación)</b>	10,009	25,568	66,302
<b>Vía húmeda (Ultrasonidos)</b>	0,135	4,167	40,433

Comparando los resultados entre medidas de sólido, y medidas de líquido agitado (Figura 21), el diámetro medio de partícula es mayor, justificado por la aglomeración de las partículas. Observando ahora los resultados para el caso de ultrasonidos, se ve una clara reducción del tamaño medio de partícula, lo que es debido a la ruptura de las aglomeraciones gracias a la energía

---

proporcionada por el baño. Por tanto, queda demostrado que las partículas se aglomeran en suspensión, aunque no se pueda determinar con exactitud la causa de dicha aglomeración, y que la energía proporcionada por el baño de ultrasonidos, es suficiente para romper las fuerzas secundarias que atraen las unas a las otras.



---

## 7. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- La aplicación de nuevas formulaciones a extractos de salvado de trigo ha sido analizada en el presente estudio, aunque los resultados de conservación no han llegado a ser concluyentes debido a las interferencias presentes en la medida de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. Por lo tanto sería recomendable para futuros estudios, analizar el contenido en polifenoles totales presentes en las muestras de extracto encapsulado por otras técnicas como HPLC, contenido total en flavonoides, o actividad antioxidante total (ORAC).
- En lo referente a la morfología, las muestras con bajo contenido de material pared presentan una mayor porosidad, mientras que a elevado contenido las partículas son más compactas. Se podría plantear un futuro estudio centrado en determinar una proporción umbral de emulsión y agente pared, que separe las regiones de morfología porosa y compacta.
- En cuanto a tamaño, las partículas más porosas han presentado tendencia a aglomerarse en suspensión, presentando un mayor tamaño cuando son medidas por vía húmeda que cuando son medidas por vía seca.



---

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. Pico, J. Bernal y M. Gómez, «Wheat bread aroma compounds in crumb and crust: A review,» *Food Research International*, vol. 75, pp. 200-215, 2015.
  - [2] Ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente, 2013.
  - [3] N. Rosa-Sibakov, K. Poutanen y V. Micard, «How does wheat grain, bran and aleurone structure impact their nutritional and technological properties?,» *Trends in Food Science & Technology*, vol. 41, pp. 118-134, 2015.
  - [4] S. Hemdane, S. Leys, P. J. Jacobs, E. Dornez, J. A. Delcour y C. M. Courtin, «Wheat milling by-products and their impact on bread making,» *Food Chemistry*, vol. 187, pp. 280-289, 2015.
  - [5] S. Zilic, A. Serpen, G. Akillioglu, M. Jankovic y V. Gökmen, «Distributions of phenolic compounds, yellow pigments and oxidative enzymes in wheat grains and their relation to antioxidant capacity of bran and debranned flour,» *Journal of Cereal Science*, vol. 56, pp. 652-658, 2012.
  - [6] M. R. Moskowitz, Q. Bin, R. J. Elias y D. G. Peterson, «Influence of Endogenous Ferulic Acid in Whole Wheat Flour on Bread Crust Aroma,» *journal of agricultural and food chemistry*, nº 60, pp. 11245-11252, 2012.
  - [7] S. Jensen, H. Oestdal, L. H. Skibsted, E. Larsen y A. K. Thybo, «Chemical changes in wheat pan bread during storage and how it affects the sensory perception of aroma, flavour, and taste,» *Journal of Cereal Science*, vol. 53, pp. 259-268, 2011.
  - [8] R. Sharma, «Chapter 59 - Polyphenols in Health and Disease: Practice and Mechanisms of Benefits,» de *Polyphenols in Human Health and Disease*, Academic press, 2014, pp. 757-778.
  - [9] Y. liu, P. Wang, F. Chen, Y. Yuan, Y. Zhu, H. Yan y X. Hu, «Role of plant polyphenols in acrylamide formation and elimination,» *Food Chemistry*, vol. 186, pp. 46-53, 2015.
  - [10] D. M. Gutiérrez Avella, C. A. Ortiz García y A. Mendoza Cisneros, «Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentacion Animal,» de *Simpósio de Metrología*, Santiago de Querétaro, México., 2008.
-

- 
- [11] A. Al Maruf, H. Lip, H. Wong y P. J. O'Brien, «Protective effects of ferulic acid and related polyphenols against glyoxal- or methylglyoxal-induced cytotoxicity and oxidative stress in isolated rat hepatocytes,» *Chemico-Biological Interactions*, vol. 234, pp. 96-104, 2015.
- [12] V. Ivanova-Petropulos, I. Hermosín-Gutiérrez, B. Boros, M. Stefova, T. Stafilov, B. Vojnoski, Á. Dörnyei y F. Kilár, «Phenolic compounds and antioxidant activity of ;acedonian red wines,» *Journal of Food Composition and Analysis*, nº 41, pp. 1-14, 2015.
- [13] M. Karakova y E. Melinova, «Ferulic and Coumaric Acids, Total Phenolic Compounds and their Correlation in Selected Oat Genotypes,» *Czech J. Food Sci.*, vol. 25, nº 6, pp. 325-332, 2007.
- [14] A.-A. El-Sayed M. y I. Rabalski, «Effect of baking on free and bound phenolic acids in wholegrain bakery products,» *Journal of Cereal Science*, vol. 57, nº 3, pp. 312-318, 2013.
- [15] C. A. Rice-Evans, N. J. Miller y G. Paganga, «Antioxidant properties of phenolic compounds,» *Trends in plant science*, vol. 2, nº 4, pp. 152-159, 1997.
- [16] S. B. Ghatak y S. J. Panchal, «Accepted Manuscript - Ferulic Acid - An Insight Into Its Current Research and Future Prospects,» *Trends in Food Science & Technology*, 2010.
- [17] L. García Juárez, *Extracción de Ácido Ferúlico Presente en el Salvado de Trigo Mediante CO2 Supercrítico*, Proyecto Fin de Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos. Universidad de Valladolid, 2014.
- [18] B. Koh y P. Ng, «Effects of ferulic acid and transglutaminase on hard wheat flour dough and bread,» *Cereal Chemistry*, vol. 86, pp. 18-22, 2009.
- [19] K. ERic, L. V. Raymond, S. Abbas, S. Song, Y. Zhang, K. Masamba y X. Zhang, «Temperature and cysteine addition effect on formation of sunflower hydrolysate Maillard reaction products and corresponding influence on sensory characteristics assessed by partial least square regression,» *Food Research International*, vol. 57, pp. 242-258, 2014.
-

- 
- [20] J. M. Silván, S. H. Assar, C. Srey, M. D. del Castillo y J. M. Ambes, «Control of the Maillard reaction by ferulic acid,» *Food Chemistry*, vol. 128, pp. 208-213, 2011.
- [21] C. Yang, R. Wang y H. Song, «The mechanism of peptide bonds cleavage and volatile compounds generated from pentapeptide to heptapeptide via Maillard reaction,» *Food Chemistry*, vol. 133, pp. 373-382, 2012.
- [22] V. A. Yaylayan y A. Huyghues-Despointes, «Chemistry of Amadori Rearrangement Products: Analysis, Synthesis, Kinetics, Reactions, and Spectroscopic Properties,» *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 34, pp. 321-369, 1994.
- [23] G. Olga, C. Styliani y R. G. Ioannis, «Coencapsulation of Ferulic and Gallic acid in hp-b-cyclodextrin,» *Food Chemistry*, vol. 185, pp. 33-40, 2015.
- [24] M. Payen, «Elementary composition of the starch of various plants; of its most concrete portions, of those most easily desintegrated, of the products of its dissolution, and the atomic weight of starch and dextrine,» *Journal of the Franklin Institute*, vol. 23, pp. 123-124, 1839.
- [25] C. Anandharamakrishnan, Techniques for nanoencapsulation of food ingredients, springerBriefs in food, health, and nutrition, Chapter 1, Nanoencapsulation of Food Bioactive Compounds, 2014.
- [26] H. Rutherford, *Structural Investigations of Liposomes: Effect of Phospholipid Hydrocarbon Length and the Incorporation of Sphingomyelin*, Saskatchewan: University of Saskatchewan, 2011.
- [27] J. N. Isrelachvili, D. J. Mitchell y B. W. Ninham, «Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles,» *Biochimica et Biophysica Acta*, nº 470, pp. 185-201, 1977.
- [28] L. Tarpani y L. Latterini , «Driving the interactions between organic nanoparticles and phospholipidic membranes by an easy treatment of the surface stabilizer,» *Langmuir*.
- [29] D. Verma, S. Verma, G. Blume y A. Fahr, «Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin,» *International Journal of Pharmaceutics*, nº 258, pp. 141-151, 2003.
-

- [30] P. C. Hiemenz y R. Rajagopalan, *Principles of Colloid and Surface Chemistry*, Tercera ed., New York: Marcel Dekker, Inc., 1997.
- [31] M. Frenzel, E. Krolak, A. Wagner y A. Steffen-Heins, «Physicochemical properties of WPI coated liposomes serving as stable transporters in a real food matrix,» *LWT-Food Science and Technology*, vol. 63, nº 1, pp. 527-534, 2015.
- [32] Shuyu Xie, Luyan Zhu, Zhao Dong, Xiaofang Wang, Yan Wang, Xihe Li y WenZhong Zou, «Preparation, characterization and pharmacokinetics of enrofloxacin-loaded solid lipid nanoparticles: Influences of fatty acids,» *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 83, pp. 382-387, 14 December 2011.
- [33] S. Badui, *Química de los alimentos*, 4 ed., 2006.
- [34] Phakawat Tongnuanchan, Soottawat Benjakul y Thummanoon Prodpran, «Structural, morphological and thermal behaviour characterisations of fish gelatin film incorporated with basil and citronella essential oils as affected by surfactants,» *Food Hydrocolloids*, vol. 41, pp. 33-43, 2014.
- [35] E. Ruckenstein, «Microemulsions, Macroemulsions, and the Bancroft Rule,» *Langmuir*, vol. 12, pp. 6351-6353, 1996.
- [36] B. Akhmetov, Y. Novichenko y V. Chapurin, *Physical and colloid chemistry*, Moscow: Mir Publishers Moscow, 1989.
- [37] O. Skurtyx y J. Aguilera, «Formation of O/W macroemulsions with a circular microfluidic device using saponin and potato starch,» *Food Hydrocolloids*, vol. 23, pp. 1810-1817, 2009.
- [38] J. L. Atwood y J. W. Steed, *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*, Volumen 2, New York: Marcel Dekker, 2004.
- [39] Hielscher ultrasonics, «[www.hielscher.com](http://www.hielscher.com),» [En línea]. Available: [http://www.hielscher.com/homogenize\\_01.htm](http://www.hielscher.com/homogenize_01.htm). [Último acceso: 1 Marzo 2015].
- [40] B. Bhanvase, D. Pinjari, P. Gogate, S. Sonawane y A. Pandit, «Process intensification of encapsulation of functionalized CaCO<sub>3</sub> nanoparticles using ultrasound assisted

---

emulsion polymerization,» *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, vol. 50, pp. 1160-1168, 2011.

- [41] P. Eisenberg, «web.mit.edu,» Massachusetts Institute of Technology, [En línea]. Available: <http://web.mit.edu/hml/ncfmf/16CAV.pdf>. [Último acceso: 1 Marzo 2015].
- [42] S. Krishnan, R. Bhosale y R. S. Singhal, «Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials,» *Carbohydrate polymers*, vol. 61, pp. 95-102, 2005.
- [43] A. S. Prata, L. Garcia , R. V. Tonon y M. D. Hubinger, «Wall Material Selection for Encapsulation by Spray Drying,» *Journal of Colloid Science and Biotechnology*, vol. 2, pp. 1-7, 2013.
- [44] K. O. Adebowale, B. I. Olu-Owolabi, E. k. Olawumi y O. S. Lawal, «Functional properties of native, physically and chemically modified breadfruit (*Artocarpus artilis*) starch,» *Industrial Crops and Products*, vol. 21, pp. 343-351, 2005.
- [45] Aditivos alimentarios, «aditivos-alimentarios.com,» [En línea]. Available: <http://www.aditivos-alimentarios.com/2014/01/e1450-octenil-succinato-sodico-almidon.html>. [Último acceso: 3 Marzo 2015].
- [46] XinChang GuoBang Import and Export Co, Ltd., «xcgbie.com,» GuoBang Pharmachem group Co, [En línea]. Available: [http://www.xcgbie.com/pro\\_detail/id/42.html](http://www.xcgbie.com/pro_detail/id/42.html). [Último acceso: 3 Marzo 2015].
- [47] M. Dr. Gohel, «pharmainfo.net,» 28 Septiembre 2009. [En línea]. Available: <http://www.pharmainfo.net/reviews/spray-drying-review>. [Último acceso: 2 Marzo 2015].
- [48] BÜCHI Labortechnik AG, «Training Papers Spray Drying,» 2002.
- [49] M. S. Stankovic, «Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium Peregrinum* L. Extracts,» *Kragujevac J. Sci.*, nº 33, pp. 63-72, 2011.
-

- [50] C. Velázquez Vázquez, M. Guadalupe Villa Rojas, C. Alvarez Ramírez, J. L. Chávez-Servín, T. García-Gasca, R. A. Ferriz Martínez, O. P. García, J. L. Rosado, C. M. López-Sabater, A. I. Castellote, H. M. Andrade Montemayor y K. de la Torre Carbot, «Total phenolic compounds in milk from different species design of an extraction technique for quantification using the Folin-Ciocalteu method,» *Food Chemistry*, vol. 176, pp. 480-486, 2015.
- [51] L.-Y. Chen, C.-W. Cheng y J.-Y. Liang, «Effect of esterification condensation on the Folin-Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols,» *Food Chemistry*, vol. 170, pp. 10-15, 2015.
- [52] M. R. Rover y R. C. Brown, «Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin-Ciocalteu method,» *Journal of Analytical and applied Pyrolysis*, vol. 104, pp. 366-371, 2013.
- [53] G. Pérez, «Espectrometria.com,» [En línea]. Available: [http://www.espectrometria.com/espectrometra\\_ultravioleta-visible](http://www.espectrometria.com/espectrometra_ultravioleta-visible). [Último acceso: 5 Marzo 2015].
- [54] J. Renau-Piqueras y M. Faura, *Principios básicos del microscopio electrónico de barrido*, S. d. M. Electrónica, Ed., Valencia: Sección de Microscopía Electrónica, Centro de Investigación, Hospital "La Fé", 1994.
- [55] N. Ubero Pascal, «Técnicas de microscopía aplicadas a las ciencias forenses,» 2008.
- [56] S. Swapp, «Carleton.edu,» University of Wyoming, [En línea]. Available: [http://serc.carleton.edu/research\\_education/geochemsheets/techniques/SEM.html](http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/SEM.html). [Último acceso: 1 Julio 2015].
- [57] J. Rodríguez Blanco, *Encapsulación de reseratrol para su aplicación como fungicida*, Proyecto Fin de Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos, Universidad de Valladolid, 2014.
- [58] I. Ramirez-Sanchez, L. Maya, G. Ceballos y F. Villarreal, «Fluorescent detection of epicatechin in microsamples from cacao seeds and cocoa products: Comparison with Folin-Ciocalteu method,» *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 23, pp. 790-793, 2010.

- 
- [59] P. Wootton-Beard, A. Moran y L. Ryan, «Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu methods,» *Food Research International*, vol. 44, pp. 217-223, 2011.
- [60] A. H. Al-Saeedi y M. Amzad Hossain, «Total phenols, total flavonoids contents and free radical scavenging activity of seeds crude extracts of pigeon pea traditionally used in Oman for the treatment of several chronic diseases,» *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, vol. 5, pp. 316-321, 2015.
- [61] K. Okuyama, M. Abdullah, I. Lenggono y F. Iskandar, «Preparation of functional nanostructured particles by spray drying,» *Advanced Powder Technology*, vol. 17, nº 6, pp. 587-611, 2006.
- [62] A. Bayu, D. Nandiyanto y K. Okuyama, «Progress in developing spray-drying methods for the production of controlled morphology particles: From the nanometer to submicrometer size ranges,» *Advanced Powder Technology*, vol. 22, pp. 1-19, 2010.
- [63] M. Afkhami, A. Hassanpour, M. Fairweather y D. O.Njobuenwu, «Particle agglomeration and dispersion in fully-coupled turbulent channel flow using large eddy simulation and discrete element method,» *Procedia Engineerin*, vol. 102, pp. 780-789, 2015.
- [64] S. Badui Dergal, R. Pedroza Islas y N. Mendoza Reynoso, «<http://www.hablemosclaro.org/>,» [En línea]. Available: [http://www.hablemosclaro.org/ingrepedia/lecitina-de-soya.aspx#.VPM\\_Ryw2cSk](http://www.hablemosclaro.org/ingrepedia/lecitina-de-soya.aspx#.VPM_Ryw2cSk). [Último acceso: 1 Marzo 2015].
- [65] M. Hodnett, «[www.npl.co.uk](http://www.npl.co.uk),» 30 Marzo 2012. [En línea]. Available: <http://www.npl.co.uk/acoustics/ultrasonics/research/high-power-ultrasound-and-acoustic-cavitation-introduction>. [Último acceso: 1 Marzo 2015].
- [66] Lipomize, CPC, 2015. [En línea]. Available: <http://www.lipomize.com/es/lipomas-que-son>. [Último acceso: 30 Junio 2015].
- [67] Spray Process, «[Spraydrying.blogspot.com.es](http://spraydrying.blogspot.com.es),» Spray Process, 2015. [En línea]. Available: <http://spraydrying.blogspot.com.es/>. [Último acceso: 2 Marzo 2015].
-

[68] Wikipedia, «Wikipedia.org,» 18 Mayo 2015. [En línea]. Available:

<https://en.wikipedia.org/wiki/Bran>. [Último acceso: 15 Julio 2015].

[69] Agencia Iberoamericana para la difusión de la ciencia y la tecnología, «DCYT,» 24

Febrero 2010. [En línea]. Available:

<http://www.dicyt.com/viewItem.php?itemId=19641>. [Último acceso: 15 Julio 2015].