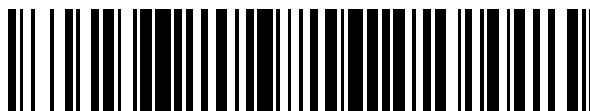


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 145**

51 Int. Cl.:

A23D 7/01	(2006.01) A23D 7/005	(2006.01)
A61K 8/06	(2006.01) A61K 47/36	(2006.01)
A61K 9/107	(2006.01) A23P 10/30	(2006.01)
A61K 9/12	(2006.01) A23P 10/35	(2006.01)
B01F 17/00	(2006.01) A23P 30/40	(2006.01)
A61K 8/362	(2006.01) A23L 29/10	(2006.01)
A61K 8/73	(2006.01) A23L 27/00	(2006.01)
A61Q 19/00	(2006.01) A23L 5/40	(2006.01)
A61K 47/26	(2006.01) A23L 33/115	(2006.01)
A61K 8/02	(2006.01) A23L 33/15	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2011** **PCT/SE2011/051522**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2012** **WO12082065**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2011** **E 11848676 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018** **EP 2651243**

54 Título: **Nuevas emulsiones y espumas estabilizadas con partículas**

30 Prioridad:

15.12.2010 SE 1051328

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

16.10.2018

73 Titular/es:

**SPEXIMO AB (100.0%)
Medicon Village
223 81 Lund, SE**

72 Inventor/es:

**DEJMEK, PETR;
TIMGREN, ANNA;
SJÖÖ, MALIN y
RAYNER, MARILYN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 686 145 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nuevas emulsiones y espumas estabilizadas con partículas

5 Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a una emulsión o una espuma estabilizadaa con partículas que comprende al menos dos fases y partículas sólidas, a una emulsión o una espuma estabilizadas con partículas secas que comprende al menos dos fases y partículas sólidas y al uso de dichas emulsión o espuma estabilizadas con partículas en diferentes aplicaciones.

Estado de la técnica

Las emulsiones son una mezcla de dos o más fases inmiscibles en las que una se dispersa en la otra en forma de pequeñas gotas. Las emulsiones pueden ser gotas de aceite en una fase acuosa continua o gotas de agua en una fase oleosa continua; en el caso de las espumas, una de las fases consiste en una fase gaseosa tal como el aire, pero en ambos casos las gotas o burbujas deben estabilizarse para impedir la su recoalescencia. Los tensioactivos adsorbidos en la interfase de las dos fases disminuyen la tensión interfacial y pueden aumentar el impedimento estérico o la repulsión electrostática, lo que aumenta la estabilidad de la emulsión. Las proteínas y los tensioactivos se usan generalmente como emulsionantes en emulsiones alimentarias. Sin embargo, también se han usado polisacáridos para estabilizar emulsiones, especialmente goma arábica y celulosas y almidones modificados. Cuando se usa como estabilizador de emulsión, el almidón generalmente se gelatiniza y/o se disuelve. Las emulsiones alimentarias generalmente se estabilizan mediante tensioactivos, proteínas e hidrocoloides; últimamente, sin embargo, el uso de partículas para estabilizar emulsiones ha atraído un interés sustancial en la investigación debido a sus características distintivas y potenciales aplicaciones tecnológicas.

Las gotas de aceite estabilizadas por partículas dispersas, conocidas como emulsiones de Pickering, fueron observadas originalmente de forma independiente por Ramsden (1903) y Pickering (1907). Las emulsiones estabilizadas por partículas sólidas suelen ser más estables contra la coalescencia y la maduración de Ostwald en comparación con los sistemas estabilizados por tensioactivos. Muestran una estabilidad extrema a largo plazo, incluso con gotas de gran tamaño, y sin la adición de tensioactivos. Las partículas son a menudo partículas inorgánicas tales como sílice, óxido de titanio o arcillas, látex, cristales de grasa, proteínas agregadas e hidrocoloides. El tamaño de las partículas utilizadas para las emulsiones de Pickering varía de tamaño nano a micras y el tamaño de las gotas disminuye con la disminución del tamaño de las partículas, pero solo mientras otras propiedades, tales como la humectabilidad, la forma, la superficie, etc., sean las mismas.

Existe una necesidad tecnológica reconocida de sistemas de suministro comestibles que encapsulen, protejan y liberen ingredientes bioactivos en, por ejemplo, alimentos y productos farmacéuticos y otras aplicaciones. Es deseable evitar el uso de tensioactivos en emulsiones debido a efectos tales como atrapamiento de aire, formación de espuma, irritación e interacciones biológicas. También existe la necesidad de nuevos sistemas tópicos, así como de otros productos técnicos, en los que son ventajosas emulsiones o espumas estabilizadas mejoradas.

El almidón es abundante, relativamente barato y se obtiene de fuentes botánicas. Existe una gran variación natural en cuanto a tamaño, forma y composición. El almidón tiene un valor nutricional intrínseco y es una fuente no alergénica, a diferencia de otros emulsionantes alimentarios comunes que se derivan del huevo o de la soja. Dependiendo del origen botánico, la distribución del tamaño y la forma de los gránulos de almidón pueden diferir sustancialmente, así como también la proporción entre los dos polímeros del almidón, la amilopectina y la amilosa. Los gránulos de almidón pueden existir en varias formas: superficie lisa, rugosa o afilada y la forma puede ser esférica, elipsoidal, plana como discos, poligonal o como varillas.

El documento WO2010/0112216 divulga una harina hecha de amaranto o quinua y el uso de la misma en productos alimenticios. La mencionada especificación de patente se refiere a una harina.

El documento WO96/04316 divulga almidón y harina granulares pregelatinizados térmicamente inhibidos. La mencionada especificación de patente se refiere a una harina.

El documento WO96/22073 divulga pretratamientos térmicos de almidón y define dichos pretratamientos térmicos como "inhibición térmica", que se caracteriza esencialmente por su efecto sobre el comportamiento de viscosidad del almidón cuando el almidón se somete a una secuencia estándar de calentamiento por encima de la temperatura de gelatinización y enfriamiento, según el ensayo Brabender. Si bien describe el uso del almidón "inhibido", e incluso del almidón inhibido modificado hidrofóticamente en emulsiones, los ejemplos de la descripción describen que la emulsión debe producirse a 80 °C. El pretratamiento térmico puede dañar el almidón para que no se gelatinice. El uso de almidón gelatinizado es la forma generalmente reconocida en los libros de texto de usar almidón hidrofobizado para la emulsificación. Los tratamientos térmicos de los gránulos de almidón tales como los descritos en el documento WO96/22073, y la hidrofobización de los gránulos de almidón descritos en la técnica anterior no constituyen una parte de la presente invención, como se aclarará a continuación. El documento US4587131 describe

el uso de gránulos de almidón nativos, que no se usan de acuerdo con la presente invención en vista del hecho de que el almidón nativo no proporciona los efectos deseados requeridos.

“*Synthesis and partial characterization of octenylsuccinic acid starch from Phaseolus lunatus*”, M. Segura-Campos *et al*, Food Hydrocolloids 22 (2008) 1467-1474, divulgan la evaluación del efecto de la concentración de OSA, pH y tiempo de reacción sobre la sustitución del almidón de Phaseolus lunatus para su optimización. La divulgación describe emulsiones estabilizadas con almidón de Phaseolus lunatus, que son emulsiones estabilizadas molecularmente.

“*Production of octenyl succinic anhydride-modified waxy corn starch and its characterization*” Zhiqiang Liu *et al*, J. Agric. Food Chem. 2008, 56, 11499-11506, divulgan una investigación de los efectos de las condiciones de reacción sobre la síntesis de almidón modificado con anhídrido octenil succínico (OSA, por sus siglas en inglés) a partir de almidón de maíz ceroso. La divulgación describe emulsiones estabilizadas con almidón de maíz, que son emulsiones estabilizadas molecularmente.

El documento US 7 829 600 describe emulsiones estabilizadas molecularmente.

“*Nutritional evaluation and functional properties of quinoa (Chenopodium quinoa) flour*” H N Ogungbenle *et al*, International Journal of Food Sciences and Nutrition 2003 54, 153-158, divulgan el valor nutricional y las propiedades de la harina de quinua, no de las partículas de quinua.

“*Oil binding ability of chlorinated and heated wheat starch granules and their use in breadmaking and pancake baking*”, Masaharu Seguchi, Starch/Stärke 53 (2001), 408-413, divulga la cloración y el tratamiento térmico de la harina de trigo.

Todavía existe la necesidad de sistemas de suministro comestibles que encapsulen, protejan y liberen ingredientes bioactivos en, por ejemplo, alimentos y productos farmacéuticos y otras aplicaciones. También sigue existiendo la necesidad de formulaciones tópicas con una alta estabilidad sin el uso de tensioactivos que usen partículas poco alergénicas y biodegradables, por ejemplo, en productos cosméticos, productos farmacéuticos para administración tópica y otras aplicaciones similares. La presente invención tiene como objetivo satisfacer las necesidades mencionadas anteriormente.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere, en un aspecto, a una emulsión o espuma estabilizada con partículas que comprende al menos dos fases y partículas sólidas, en la que dichas partículas sólidas son gránulos de almidón y dichos gránulos de almidón o una parte de los mismos están situados en la interfase entre las dos fases, en la que los gránulos de almidón tienen un tamaño granular pequeño en el rango de 0,2-4 (D_{32}) micras, y en la que la cantidad de gránulos de almidón añadidos cubre más del 10 % de la superficie de una gota de emulsión, generando la emulsión o espuma estabilizada con partículas. En la figura 0-1 se muestra que un almidón de aceite (teñido de rojo) y una fase acuosa pueden formar una emulsión después de una cizalla a alta velocidad. Son los gránulos de almidón en la interfase de las dos fases lo que causa el efecto estabilizador y no las moléculas de almidón o un efecto abombado primario de los gránulos de almidón en la fase continua, como ha sido el caso de las técnicas del estado de la técnica. En la figura 0-2 se proporciona una ilustración esquemática que explica la diferencia entre una emulsión estabilizada con partículas, una emulsión estabilizada con una molécula de almidón y una emulsión estabilizada con tensioactivos. Una ventaja de la presente invención es la flexibilidad del sistema. Los gránulos de almidón agregados podrían estar presentes en la interfase a una concentración pequeña o grande, siempre que el efecto estabilizador esté presente. Por lo tanto, la interfase se estabiliza mediante los gránulos de almidón agregados y no mediante ningún otro componente que pueda estar presente en la emulsión o espuma. La figura 0-3 es una micrografía que muestra cómo los gránulos de almidón intactos estabilizan eficazmente las gotas de aceite creando emulsiones de tipo Pickering cubriendo la superficie de las gotas de la emulsión. Su hidrofobicidad les permite ser adsorbidas en la interfase aceite-agua, lo que evita la re-coalescencia y por lo tanto la estabilidad de las gotas. El almidón es uno de los ingredientes alimenticios más frecuentes, que ha demostrado tener propiedades emulsionantes novedosas y útiles.

La presente invención se refiere, en otro aspecto, a una emulsión o una espuma estabilizadas con partículas secas, en la que una emulsión o espuma estabilizada con partículas de acuerdo con la presente invención se ha sometido a eliminación de agua tal como mediante secado, por ejemplo, liofilización, secado por pulverización y/o secado al vacío.

La presente invención se refiere, en otro aspecto, a una emulsión o una espuma estabilizadas con partículas, en la que dicha emulsión estabilizada con partículas se ha sometido a un tratamiento térmico para mejorar o ajustar las propiedades de barrera y/o reológicas de la emulsión estabilizada con partículas. Realizando este tratamiento térmico, se puede prolongar o ajustar la vida útil y, en algunas aplicaciones, se permite la liberación controlada o el suministro dirigido.

La presente invención se refiere, en otro aspecto, al uso de una emulsión estabilizada con partículas para reemplazar la grasa en productos alimenticios.

La presente invención se refiere, en otro aspecto, al uso de una emulsión estabilizada con partículas para la encapsulación de sustancias elegidas entre productos biofarmacéuticos, proteínas, probióticos, células vivas, enzimas, anticuerpos, ingredientes alimenticios sensibles, vitaminas y lípidos.

La presente invención se refiere, en otro aspecto, al uso de una emulsión estabilizada con partículas en productos alimenticios, productos cosméticos, cremas para la piel, lociones y formulaciones farmacéuticas tales como formulaciones tópicas, cápsulas, supositorios, formulaciones inhalatorias, suspensiones orales, soluciones perorales, inyectables intramusculares y subcutáneos, y productos de consumo tales como pintura.

La presente invención se refiere en otro aspecto a una formulación que comprende una emulsión estabilizada con partículas secas de acuerdo con la presente invención y una sustancia elegida entre productos biofarmacéuticos, proteínas, probióticos, células vivas, enzimas, anticuerpos, ingredientes alimenticios sensibles, vitaminas y lípidos. La emulsión estabilizada con partículas secas también es adecuada para productos alimenticios, productos cosméticos, cremas para la piel, lociones y productos de consumo. La formulación puede ser una formulación farmacéutica.

Por lo tanto, se han realizado descubrimientos sorprendentes de acuerdo con la presente invención, es decir, que los gránulos de almidón hidrofobizado no gelatinizado son adecuados para la emulsificación a temperaturas por debajo de la temperatura de gelatinización. Esto no se conoce a partir del estado de la técnica.

TEXTO DE LAS FIGURAS

Figura 0-1 Fotografías de muestras con 33,3 % (v/v) de aceite en tampón y 100 mg de almidón/ml de aceite, emulsificación a 11000 rpm. Izquierda: muestra no emulsionada que incluye (de arriba a abajo) fase oleosa, fase acuosa, almidón; Derecha: emulsión con almidón de quinua modificado con OSA obtenido por homogenización de alta cizalla. Se añadió 1 mg de colorante soluble en aceite (Solvent Red 26) a las muestras.

Figura 0-2. En las emulsiones de almidón Pickering se encuentran gránulos de almidón en la interfase aceite/agua que estabilizan la emulsión. Puede haber casos en los que los gránulos de almidón coexisten con otros emulsionantes o tensioactivos en otros productos basados en emulsiones, sin embargo, no son responsables de la estabilización de las gotas. Por ejemplo, en las emulsiones estabilizadas con moléculas de almidón o tensioactivos, los gránulos se podrían agregar en la fase continua (acuosa) libre, pero no se unen a la interfase de agua con aceite ni actúan como partículas estabilizantes en emulsiones tipo Pickering. En este caso, los gránulos de almidón pueden conferir otras propiedades al producto, pero están fuera del alcance de la presente invención.

Figura 0-3. Los gránulos de almidón intactos estabilizan eficazmente las gotas de aceite creando emulsiones tipo Pickering mediante el recubrimiento de la superficie de las gotas de la emulsión.

Figura 0-4A: Emulsión estabilizada con tensioactivo convencional (izquierda); aquí pequeños tensioactivos estabilizan la interfase de agua con aceite. Para aumentar el espesor de la emulsión, se agregan modificadores de viscosidad. Emulsión estabilizada con partículas (derecha); aquí los gránulos de almidón estabilizan la interfase de agua con aceite y se encuentran en un estado de agregación débil. Esto construye la microestructura que proporciona un comportamiento viscoelástico incluso a bajos contenidos de fase oleosa.

Figura 0-4B. Imagen microscópica de la emulsión estabilizada con gránulos de almidón de quinua, 286 mg de almidón/ml de aceite (barra de escala = 100 micras). La microestructura general y la medición reológica indican la agregación entre gotas formando una red similar a un gel.

La figura 0-5A muestra una importante propiedad fisicoquímica del almidón, a saber, su capacidad de gelatinizarse en presencia de agua y calor. Primero, se forma una emulsión que consiste en gotas de aceite cubiertas de almidón, luego, mediante la adición cuidadosa de calor, se induce una gelatinización parcial de los gránulos para formar una capa de almidón cohesiva anclada en la interfase aceite-agua. Esta barrera mejorada puede ser útil de muchas maneras. Esta técnica también se ha aplicado para permitir mantener juntas las gotas de aceite durante el secado, produciendo de ese modo polvo de cápsulas de almidón llenas de aceite.

Figura 0-5B Principio de encapsulación de sustancias solubles en agua mediante emulsiones dobles (A) y encapsulación de aceite con otras sustancias dispersas en él (B). El tratamiento térmico también se puede aplicar para aumentar las propiedades de barrera de la capa de almidón y mejorar aún más la capacidad de encapsulación (C y D). Al usar emulsiones Pickering de almidón, las gotas son lo suficientemente grandes como para contener las gotas o cristales interiores y la capa de almidón es lo suficientemente cohesiva como para mantener la estabilidad de la gota.

Figura 0-6 Izquierda: emulsión común, Derecha: emulsión doble. Se pueden preparar emulsiones dobles con alta estabilidad para proteger los ingredientes sensibles solubles en agua. Las emulsiones dobles son atractivas para proteger los ingredientes sensibles solubles en agua dentro de una fase oleosa.

Figura 1-1: distribuciones del tamaño de partícula de los gránulos de almidón de quinua (D_{43} 3,45 μm) después de una mezcla de alta cizalla en un Ystral D-79282 a 22000 rpm durante 30 s (línea continua). Gotas de emulsión estabilizadas con quinua resultantes (D_{43} 50,6 μm) 6,65 ml de fase continua, 0,35 ml de aceite disperso y 100 mg de OSA al 2,9 % de almidón/ml después de la mezcla de alta cizalla en las mismas condiciones (línea discontinua). Imagen microscópica de una emulsión estabilizada con almidón (inserto).

Figura 1-2: tamaño de gota (D_{43}) y volumen ocluido relativo en función de la cantidad de almidón agregado por ml de aceite medido después de 1 y 7 días. Las concentraciones identificadas como a-j corresponden a imágenes de emulsiones de la Figura 1-3. La línea discontinua vertical indica el corte de tamaño de gota teórico para las gotas de flotabilidad neutra.

Figura 1-3: Imágenes de emulsión cremosa/sedimentada después de 1 día (arriba) y después de 7 días (parte inferior), almidón cero en el extremo izquierdo y 5 % de aceite, aceite cero en el extremo derecho y 1250 mg de almidón. Las letras corresponden a las concentraciones identificadas que se muestran en la gráfica de la figura 1-2.

Figura 2-1: Tamaño de gota en función de la cantidad de almidón agregado para 4 variedades de almidón: quinua, arroz, maíz y cebada cerosa, todas ellas modificadas con OSA y en tampón fosfato de 0,2M NaCl. La cantidad de almidón agregado corresponde a 1,1, 2,2 y 3,9 % de volumen del sistema total.

Figura 2-2: área de superficie específica medida de emulsiones estabilizadas con almidón frente al área de superficie estimada que podría estabilizarse para un tamaño y una concentración de gránulos de almidón determinados. La línea continua representa el supuesto en el que lo medido es igual a lo previsto.

Figura 3-1. Las emulsiones se realizaron usando diferentes técnicas de procesamiento, con el propósito de demostrar que las emulsiones estabilizadas con gránulos de almidón se pueden preparar usando varios métodos. Imágenes (de arriba a abajo) de emulsiones realizadas mediante: nivel de sorvall 2 de 300 s, nivel de sorvall 8 de 300 s, homogeneizador de alta presión a escala de laboratorio, circulando mediante bomba peristáltica. Las imágenes de la izquierda son micrografías de emulsiones (100 x aumentos). Las imágenes de la derecha características generales de la emulsión.

Figura 4-1. Emulsiones preparadas con 214 mg de almidón/ml de aceite con cantidades variables de fracción volumétrica de aceite. Efecto del tiempo de almacenamiento, y la concentración de aceite sobre la apariencia visual e (izquierda) y el índice de emulsión (derecha).

Figura 4-2. Módulo elástico en función de la tensión de cizalla compleja en cuatro concentraciones de aceite.

Figura 5-1. Penetración cutánea in vitro de salicilato de metilo a través de la piel de cerdo a 32 °C, de 55 % de emulsiones de Pickering de almidón de aceite; aceite de parafina (círculos), Miglyol (cuadrados) y aceite de karité (triángulos).

Figura 6-1. Módulo elástico (G' , Pa) en función de la deformación compleja para emulsiones estabilizadas con almidón a diversas proporciones de almidón a aceite con un 40 % de fases dispersas totales (aceite y almidón).

Figura 7-1. Micrografías de una emulsión no tratada con 7 % de aceite de Miglyol estabilizado con 214 mg de almidón por ml de aceite (arriba a la izquierda), emulsión correspondiente congelada con congelador rápido y descongelada (arriba a la derecha), emulsión correspondiente congelada con nitrógeno líquido y descongelada (abajo a la izquierda) y la emulsión correspondiente tratada térmicamente durante 1 minuto a 70 °C (abajo a la derecha).

Figura 7-2. Micrografías de una emulsión doble antes (izquierda) y después (derecha) de la congelación y la descongelación. Para la congelación se utilizó nitrógeno líquido.

Figura 7-3. Distribución del tamaño de partícula de las emulsiones dobles no tratadas y tratadas térmicamente antes y después de la congelación y la descongelación.

Figura 8-1. Micrografía SEM de gotas de emulsión liofilizadas que contienen aceite de Miglyol y capa de almidón gelatinizado. Las emulsiones fueron tratadas térmicamente antes de la liofilización. Se obtuvieron gotas intactas y gotas parcialmente colapsadas que dejaron bolsas vacías de la capa de almidón.

Figura 8-2. Micrografía SEM de gotas de emulsión liofilizadas que contienen manteca de karité. Las emulsiones no fueron tratadas térmicamente antes de la liofilización. Se obtuvieron gotas agregadas y no agregadas intactas y las imágenes muestran la presencia de aceite libre.

Figura 8-3. Micrografía SEM de gotas de emulsión liofilizadas que contienen manteca de karité y capa de almidón gelatinizado. Las emulsiones fueron tratadas térmicamente antes de la liofilización. Se obtuvieron gotas agregadas y no agregadas intactas.

Figura 8-4. Micrografía SEM de gotas de emulsión secadas por pulverización que contienen manteca de karité y gránulos de almidón. Las esferas cubiertas con almidón llenas de aceite permanecen intactas después del secado por pulverización.

Figura 8-5. Distribución del tamaño de partícula (D_{43}) de emulsiones antes (izquierda) y después (centro) de la liofilización, y de una emulsión doble liofilizada (derecha). Las emulsiones secas se rehidrataron antes de la medición. El mayor tamaño de partícula de las emulsiones calentadas después del secado fue causado por la agregación.

Figura 9-1. Micrografías con luz polarizada de (imagen superior) gotas de emulsión no calentadas e (imagen inferior) gotas de emulsión calentadas. Las partes cristalinas de los gránulos de almidón son birrefringentes como se ve por el color más brillante en toda la superficie en (imagen superior) y cerca de la superficie del aceite en (imagen inferior). El área difusa fuera de las gotas en (imagen inferior) muestra almidón parcialmente gelatinizado.

Figura 9-2. La actividad de la lipasa en función de la temperatura de tratamiento térmico después de la emulsificación.

Figura 10-1. Micrografías de una emulsión recién preparada con 10 % de aceite de pescado estabilizado con 500 mg de almidón por ml de aceite (izquierda), correspondiente después de 1 semana de almacenamiento (centro), o tratada térmicamente y almacenada durante 1 semana (derecha).

Figura 11-1. Espuma estabilizada con gránulos de almidón de estructura rígida.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

En una realización de la invención, los gránulos de almidón utilizados en la emulsión o espuma estabilizada con partículas son nativos o se han sometido a modificación física y/o modificación química para aumentar la hidrofobicidad de los gránulos de almidón. El almidón puede modificarse químicamente mediante el tratamiento con diferentes anhídridos de alquénil succínico, por ejemplo, anhídrido octenil succínico (OSA), que está aprobado para aplicaciones alimentarias en una cantidad agregada de hasta el 3 % basada en el peso seco del almidón. También se puede usar anhídrido propenil succínico. El grupo octenilo hidrofóbico y el grupo carboxilo o carboxilato de sodio aumentaron la capacidad de los almidones para estabilizar las emulsiones. También es posible hacer que los gránulos de almidón sean más hidrofóbicos mediante injertos con otros productos químicos con una cadena lateral hidrofóbica, por ejemplo, mediante esterificación con ácidos dicarboxílicos. Las partículas de almidón modificadas tienen una superficie bastante uniforme, al menos en lo que respecta a la hidrofobicidad, por lo que las gotas cubiertas de gránulos de almidón tienen propiedades superficiales similares a las de los gránulos de almidón individuales. Cuando las propiedades de la superficie del gránulo permiten una fuerte adsorción en la interfase aceite-agua (un ángulo de contacto no muy lejos de 90°), las partículas dispersas en la fase acuosa también están en un estado de agregación débil. En este caso, la barrera basada en partículas estéricas consiste en más que en una simple capa densamente compacta de gránulos de almidón en la superficie de la gota, sino que también se extiende como una capa desordenada/red de gránulos entre las gotas (algunas de las cuales se pueden ver en la figura 0-4B), que tiene toda la estructura agregada unida por fuerzas atractivas entre partículas, creando así la estructura débil de tipo gel observada.

En el presente contexto, se entiende por “emulsión estabilizada con partículas” una emulsión que tiene al menos dos fases, en la que los gránulos de almidón o una parte de los mismos están dispuestos en la interfase entre al menos las dos fases, por ejemplo, en la interfase entre una fase oleosa y una fase basada en agua, y estabilizando así la emulsión.

En una realización de la invención, los gránulos de almidón de la emulsión o espuma estabilizada con partículas se han hecho más hidrofóbicos mediante modificación física, por ejemplo, mediante calentamiento en seco o por otros medios, tales como un cambio en el pH, tratamiento a alta presión, irradiación o enzimas. El calentamiento en seco hace que las proteínas de la superficie del gránulo de almidón cambien su carácter de hidrofílico a hidrofóbico. Una ventaja de la modificación térmica es que no se requiere un etiquetado específico cuando se utiliza en aplicaciones alimentarias. Además, la alteración hidrofóbica se produce explícitamente en la superficie del gránulo.

De acuerdo con la invención, los gránulos de almidón de la emulsión o espuma estabilizada con partículas tienen preferiblemente un tamaño granular pequeño en el intervalo de preferiblemente 0,2-4 micras, incluso más preferiblemente 0,2-1 micras.

En otra realización de la invención, los gránulos de almidón de la emulsión o espuma estabilizada con partículas se obtienen a partir de cualquier fuente botánica. Se ha demostrado que los gránulos de almidón estabilizan las emulsiones de aceite en agua. A diferencia de las partículas utilizadas comúnmente para las emulsiones Pickering, el almidón (incluyendo el almidón modificado hidrofóticamente) es un ingrediente alimenticio aceptado. Los gránulos de almidón son abundantes, relativamente baratos, y se obtienen de muchas fuentes botánicas. Hay una gran variación natural en cuanto a tamaño, forma y composición. El almidón tiene un valor nutricional intrínseco y es una fuente no alergénica, a diferencia de otros emulsionantes alimentarios comunes derivados del huevo o la soja. Los gránulos de almidón de la emulsión o espuma estabilizada con partículas se obtienen, por ejemplo, de quinua, arroz, maíz, amaranto, cebada, maíz dulce inmaduro, centeno, triticale, trigo, trigo sarraceno, totora, apio, durián, eragrostis tef, avena, chirivía, mijo pequeño, arroz silvestre, alpiste, hierba de vaca, malanga, bledo y taro, incluidas las variedades cerosas y con alto contenido de amilosa de los anteriores.

Se eligen al menos dos fases de la emulsión o espuma estabilizada con partículas de la fase oleosa/fase acuosa y de la fase gaseosa/fase acuosa. En una realización de la invención, la emulsión es una emulsión de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite o una espuma.

En una realización de la invención, la cantidad de gránulos de almidón agregados a la emulsión o espuma estabilizada con partículas se corresponde aproximadamente con un 0,005-70 % en volumen de la emulsión total. La cantidad de gránulos de almidón agregados se determina preferiblemente por la cobertura de la gota y la cobertura debe ser superior al 10 %.

De acuerdo con la presente invención, la posibilidad de preparar emulsiones de un tamaño de gota determinado depende fundamentalmente de la disponibilidad de una cantidad suficiente de gránulos de almidón para estabilizar la superficie resultante. La cantidad suficiente se puede describir en términos del área que los gránulos de almidón pueden cubrir cuando se extienden en una sola capa en relación con el área superficial de la emulsión a una densidad de empaquetamiento determinada. Específicamente, si la emulsión contiene un volumen de aceite (V_o) y contiene gotas de diámetro medio (D_{32}) de D_o , entonces la superficie interfacial total de las gotas de aceite (S_o) viene dada por:

$$S_o = \frac{6 V_o}{D_o}$$

Para estabilizar esta interfase de área S_o , se requiere una capa de almidón S_s que ocupe la misma área.

- 5 El área ocupada por un gránulo de almidón que se supone que es esférico, de diámetro D_s y está unido a la interfase aceite-agua en un ángulo de contacto de 90° con una fracción de empaquetamiento interfacial ϕ .

$$a_s = \frac{\pi D_s^2}{4\phi}$$

- 10 El número de gránulos de almidón (suponiendo que sean de diámetro D_s) para un peso determinado de almidón, W_s , y densidad de almidón, ρ_s .

$$n_s = \frac{W_s}{\frac{\pi}{6} \rho_s D_s^3}$$

- 15 El área total que ocupan $S_s = n_s \cdot a_s$, o igual a:

$$S_s = \frac{6 W_s}{\rho_s \phi 4 D_s}$$

- 20 La fracción de empaquetamiento interfacial ϕ es la inversa de la cantidad de espacio entre las partículas, y alcanza un límite teórico de $\phi \approx 0,907$, es decir, empaquetamiento hexagonal compacto. Sin embargo, hay muchos casos en los que es ligeramente superior (1,2) o incluso significativamente inferior (0,10) y para sistemas extremadamente puros tan solo (0,002) e incluso dependiendo del sistema (Gautier *et al.*, 2007; Tcholakova *et al.* 2008). A efectos prácticos, el intervalo se situaría entre 0,10 y 1,2.

- 25 Por lo tanto, para cubrir un área de aceite S_o , se necesita un área de almidón S_s . Ajustando $S_o = S_s$ y reordenando se obtiene lo siguiente:

$$\frac{W_s}{V_o} = \frac{4\phi\rho_s D_s}{D_o}$$

- 30 Esto tiene las unidades de mg/ml (o kg/m³).

Ejemplo: Crema tónica

- 35 Se debe hacer una emulsión con un tamaño de gota medio (D_{32}) de D_o 49 μm y se usan gránulos de almidón de quinua para estabilizarla, con un diámetro medio $D_s = 2,27 \mu\text{m}$ y densidad sólida $\rho_s = 1550 \text{ kg/m}^3$ con una densidad de empaquetamiento interfacial $\phi = 0,73$. La cantidad de almidón requerido por volumen de aceite es:

$$\frac{W_s}{V_o} = \frac{4\phi\rho_s D_s}{D_o} = \frac{4 \cdot 0,73 \cdot 1550 \cdot 2,27E - 6}{49E - 6} = 214 \text{ mg/ml}$$

- 40 En una realización de la invención, la emulsión o espuma estabilizada con partículas se ha sometido a un tratamiento térmico para alterar las propiedades de barrera de la emulsión estabilizada con partículas. Existe la necesidad de que los sistemas de suministro encapsulen, protejan y liberen ingredientes bioactivos en productos alimenticios y farmacéuticos. Muchos de los ingredientes o compuestos utilizados en tales aplicaciones son lipófilos o se desea que estén contenidos o dispersos dentro de la fase lipídica. Se ha demostrado que los gránulos de almidón que se han usado en la emulsión de la invención estabilizan la interfase contra la coalescencia. Sin embargo, en algunas situaciones, es necesario mejorar aún más las propiedades de barrera. Esto se ha realizado también y se han proporcionado propiedades de barrera mejoradas de las emulsiones o espumas estabilizadas con la aplicación de calor, dando lugar a una emulsión con capas de almidón parcialmente gelatinizado. Una figura esquemática de este concepto se muestra en la figura 0-5A. En general, estos sistemas de suministro podrían alcanzar una serie de funciones diferentes, por ejemplo, un alimento basado en emulsión que retrasa la digestión de los lípidos e induce saciedad o quizás una liberación dirigida y controlada de componentes bioactivos dentro del tracto gastrointestinal. Para cuantificar la impenetrabilidad de la capa de almidón parcialmente gelatinizado se ha medido la disminución de la velocidad de lipólisis, bajo la premisa de que las superficies fuertemente cubiertas con gránulos de almidón que son difíciles de desalojar de la interfase reducirán la capacidad de la lipasa para digerir los lípidos presentes en el aceite emulsionado.

En otra realización de la invención, la emulsión o espuma estabilizada con partículas se ha sometido a secado, liofilización, secado por pulverización y/o secado al vacío, por lo que se obtiene una emulsión o espuma estabilizada con partículas secas. Las emulsiones secas se pueden agregar a alimentos, cremas y productos farmacéuticos como ingrediente y se pueden usar para formulaciones de pulverización en polvo, tales como inhaladores. El sistema de emulsión se puede diluir sin perder ni desalojar el almidón. Esto significa que la emulsión o espuma estabilizada con partículas secas se puede agregar a otros procesos en pequeñas cantidades, en el punto deseado del proceso. Esto mejora la funcionalidad de los ingredientes sensibles. En otra realización de la invención, la emulsión estabilizada con partículas se usa para controlar la densidad de las gotas de emulsión. Los parámetros que influyen en lo anterior son la densidad del aceite, la densidad del líquido, la concentración del almidón y el tamaño de los gránulos de almidón. Las propiedades reológicas de la emulsión pueden variar variando la proporción de almidón a aceite. La emulsión resultante cambiará las propiedades de flujo de una crema de baja viscosidad a un gel de partículas llenas de gotas fácilmente dispersables y fracturadas que exhibe una tensión de fluencia a bajas concentraciones. Es posible formar un gel de aceite/partículas de relleno a una concentración de bajo volumen de 0,5 % de almidón y 5 % de aceite. A mayores volúmenes de fase dispersa (más aceite y gránulos almidón) la emulsión se vuelve más rígida y más sólida. Esta es una propiedad útil en vista de la cual se pueden fabricar productos con una gama de texturas sin el uso de modificadores de viscosidad adicionales (tales como polímeros) ya que las partículas actúan tanto como emulsionantes como un espesante (ilustrado en la figura 0-4A).

En una realización de la invención, las emulsiones estabilizadas con partículas se usan para reemplazar la grasa en los productos alimenticios. Debido al alto contenido calórico de la grasa, se sabe que la sustitución de grasa por las emulsiones de la invención es beneficiosa para la industria alimentaria. En una realización de la invención, la espuma estabilizada con partículas puede reemplazar los cristales de grasa en la nata montada.

En otra realización de la invención, las emulsiones estabilizadas con partículas se usan para la encapsulación de sustancias elegidas entre probióticos, células vivas, productos biofarmacéuticos, proteínas, enzimas, anticuerpos, ingredientes alimenticios sensibles, vitaminas y lípidos. Las emulsiones estabilizadas con partículas también son beneficiosas para enmascarar el sabor de sustancias de sabor u olor desagradable tales como el aceite de pescado y los antibióticos. En otra realización, la emulsión estabilizada con partículas se usa como una emulsión doble. Las emulsiones dobles se caracterizan por tener una emulsión primaria dispersa en forma de gotas de una emulsión secundaria. Por ejemplo, gotas de agua dentro de gotas de aceite dispersas en una segunda fase de agua (véase la figura 0-6). Una emulsión doble de buena estabilidad tiene una eficacia de encapsulación inicial del 95 % y después de 4 semanas de almacenamiento todavía tiene un 70-80 %. Mediante el uso de emulsiones Pickering de almidón las gotas son lo suficientemente grandes como para contener las gotitas y la capa de almidón es lo suficientemente cohesiva como para mantener la estabilidad de las gotas. Las pruebas de la presente invención han demostrado una eficacia de encapsulación inicial >98,5 % y después de 4 semanas de almacenamiento todavía tiene >90 %. Incluso después de un ciclo de congelación y descongelación, solo se pierde <1 % de la fase interna.

En otra realización, la emulsión estabilizada con partículas se usa para encapsular sustancias poco solubles en la fase oleosa. En algunas aplicaciones médicas que usan emulsiones convencionales con una sustancia activa poco soluble en el aceite, la sustancia cristaliza. Estos cristales son demasiado grandes para las pequeñas gotas que causan inestabilidad. Al usar emulsiones Pickering de almidón, las gotas son lo suficientemente grandes como para contener los cristales y la capa de almidón es lo suficientemente cohesiva como para mantener la estabilidad de las gotas (véase la figura 5B-derecha).

En otra realización de la invención, las emulsiones estabilizadas con partículas se usan en productos alimenticios, productos cosméticos, cremas para la piel, lociones y formulaciones farmacéuticas. La emulsión estabilizada con partículas de acuerdo con la presente invención es un emulsionante no alergénico que se puede usar en cosméticos y cremas para la piel tales como humectantes o protección solar.

En una realización de la invención, se desea aumentar las propiedades de barrera para mejores perfiles de liberación en la piel o evitar la desestabilización del ingrediente activo/las emulsiones. La etapa de calentamiento se usa para gelatinizar parcialmente el almidón y crear así una película más compacta. Para ciertas aplicaciones, se lleva a cabo la etapa de calentamiento mencionada anteriormente.

La presente invención se ejemplificará mediante varios experimentos no limitantes que se presentan a continuación.

Descripción de los experimentosExperimento 1

- 5 En el experimento 1, se ha estudiado la capacidad de los gránulos de almidón para estabilizar emulsiones de aceite en agua.
 El almidón se aisló de la quinua (Biofood, Suecia) mediante un proceso de molienda en húmedo y el OSA se modificó al 2,9 %. Se eligió la quinua por su distribución granulométrica bastante pequeña y unimodal. La fase continua de las emulsiones fue un tampón de fosfato con pH 7 con 0,2 M NaCl, densidad 1009,6 kg/m³, a 20 °C. La
 10 fase dispersa fue el aceite de triglicéridos de cadena media Miglyol 812, densidad 945 kg/m³ a 20 °C (Sasol, Alemania).

Métodos15 Aislamiento del almidón de quinua

- Las semillas de quinua se molieron con agua en un mezclador (Philips HR7625, Países Bajos) y se filtraron a través de un paño de tamiz. El almidón se dejó sedimentar y el sobrenadante se eliminó. Se añadió agua fresca al almidón, que después de la sedimentación y eliminación del agua se secó en un secador de vacío a 20 °C durante 4 días. Las
 20 proteínas del almidón seco se eliminaron lavando el almidón dos veces con solución de NaOH al 3 %, una vez con agua y una vez con ácido cítrico (pH 4,5) antes de que el almidón se secase al aire a temperatura ambiente y se disgregara con mortero.

Modificación con OSA

- 25 El almidón se suspendió completamente en la parte doble por peso de agua usando una hélice de acero inoxidable y el pH se ajustó a 7,8. Se añadieron cuatro cantidades iguales de OSA (totalmente 4 % basado en el peso de almidón) con un intervalo de 15 minutos y el pH se mantuvo en 7,4-7,9 añadiendo solución de NaOH 1M gota a gota. Cuando el pH se mantuvo estable durante al menos 15 minutos, la solución de almidón se centrifugó a 3000xg
 30 durante 10 min, se lavó dos veces con agua y una vez con ácido cítrico (pH 4,5) antes de que el almidón se secase al aire a temperatura ambiente durante al menos 48 horas.

- La sustitución de OSA se determinó mediante un método de titulación. Brevemente, se dispersaron 5 g (peso seco) de almidón en 50 ml de HCl 0,1 M y se agitó durante 30 minutos. La suspensión se centrifugó a 3000xg durante 10
 35 min, se lavó una vez con 50 ml de etanol (90 %) y dos veces con agua antes de suspender el almidón en 300 ml de agua, cocer en un baño de agua hirviendo durante 10 min y enfriar a 25 °C. La solución de almidón se tituló con NaOH 0,1 M a pH 8,3. Simultáneamente, se tituló un blanco con almidón nativo del mismo origen que el almidón de OSA como muestra. El porcentaje de grupos carboxilo de OSA en los gránulos de almidón se calculó mediante:

$$40 \quad \%OSA = \frac{(V_{muestra} - V_{blanco}) \times M \times 210}{W} \times 100$$

donde V es el volumen (ml) de NaOH requerido para la muestra y la titulación en blanco, M es la molaridad de NaOH (0,1M), W es el peso seco (mg) del almidón y 210 es el peso molecular del grupo octenil succínico.

45 Emulsificación

- Las emulsiones se prepararon en tubos de ensayo de vidrio, combinando 6,65 ml de fase continua, 0,35 ml de fase dispersa y almidón en cantidades variables (12,5 mg -1250 mg) y se emulsionaron mediante mezcla de alta cizalla en un Ystrol (D-79282, Ballrechten-Dottingen, Alemania) a 22000 rpm durante 30 s. Las muestras emulsionadas se
 50 sometieron al tratamiento vortex luego fueron fotografiadas 1 día y 1 semana después de la emulsificación y las imágenes de las muestras se analizaron en ImageJ para determinar el volumen de la capa cremosa/sedimentada. La capacidad emulsionante del almidón y la estabilidad de las emulsiones se expresaron como el volumen ocluido relativo, ROV.

$$ROV = \frac{V_{emuls}}{V_{oil} + V_{starch}}$$

- 55 donde V_{emuls} es el volumen de la emulsión observada (es decir, la fracción no clara), V_{oil} es el volumen de la fase oleosa y V_{starch} es el volumen ocupado por el almidón añadido. En un sistema completamente separado por fases, ROV=es igual a 1, es decir, no hay aumento en la capa de emulsión más allá de la de sus fases constituyentes.

60 Medición del tamaño de las partículas de gránulos y emulsiones de almidón

Las distribuciones del tamaño de partícula se midieron un día y una semana después de la emulsificación usando

difracción láser con modo óptico Mie (Coulter LS 130, Coulter Electronics Ltd, Luton Beds, Inglaterra) para emulsiones de almidón y emulsiones cubiertas de almidón, se usó el índice de refracción de 1,54. Se añadió un pequeño volumen de muestra al sistema de flujo y se bombeó a través de la cámara óptica para las mediciones.

5 Microscopía

Las emulsiones se diluyeron 5 veces con la fase continua y luego las muestras se colocaron en un canal cuadrado VitroCom de 100 micras (CMS Ltd., Ilkley, Reino Unido). Se obtuvieron imágenes microscópicas de las emulsiones usando una cámara Olympus BX50 (Tokio, Japón) y una cámara digital (DFK 41AF02, Imaging source, Alemania).

10

Resultados

Los gránulos de almidón se adsorben a la interfase aceite-agua y la estabilizan.

15 Se observó que los gránulos de almidón de quinua (diámetro medio de 1,34 μm) estabilizan la interfase aceite-agua en una capa muy compacta (véase el inserto en la Figura 1-1) en lo que parecen ser emulsiones de tipo Pickering. La distribución de tamaño de (diámetro medio volumétrico D_{43}) se representa gráficamente en la figura 1-1 tanto para los gránulos de almidón (línea continua) como para las emulsiones estabilizadas de almidón (líneas discontinuas). La distribución medida del tamaño de partícula de los gránulos de almidón indicó cierta agregación
20 con tamaños comprendidos entre 4 y 10 μm . Se infiere que se agregan, ya que las imágenes SEM no muestran una gama tan amplia de tamaños de gránulos individuales. En la emulsión resultante se observaron algunos agregados de almidón en el microscopio y también se percibieron en la distribución del tamaño de partícula de la emulsión (línea discontinua en la figura 1-1) como un hombro más pequeño en el pico principal.

25 El tamaño de las gotas puede controlarse mediante la cantidad de almidón añadido

El tamaño final de las gotas de la emulsión disminuyó a medida que aumentaba la cantidad de almidón por ml de aceite. Se observaron emulsiones con tamaños de gotas que oscilaban desde 64 μm (con 36 mg de almidón
30 añadido/ml de aceite) hasta 9,9 μm (3600 mg de almidón añadido/ml de aceite). El efecto de la concentración sobre el tamaño tiene un efecto decreciente sobre las concentraciones más altas (véase la figura 1-2, obsérvese la escala logarítmica).

Para estimar el grado de repetibilidad, se realizaron dos condiciones de emulsificación por triplicado y una por duplicado. Las condiciones con 71 mg de almidón por ml de aceite tenían un diámetro medio volumétrico $D_{43} \pm$ error
35 estándar de la media igual a $58,4 \pm 1,13$, $n=3$, las condiciones con 571 mg de almidón por ml de aceite tenían $D_{43} \pm$ error estándar de la media igual a $26,9 \pm 3,26$, $n=3$, y las condiciones con 1714 mg de almidón por ml de aceite tenían $D_{43} \pm$ error estándar de la media igual a $12,3 \pm 0,014$, $n=2$.

El tamaño de gota se midió después de 1 día y después de 7 días y se comprobó que tenía pocos cambios (en
40 algunos casos el tamaño de gota incluso disminuye, pero a un nivel dentro de la variabilidad entre repeticiones), con la excepción de una tendencia a tamaños de gota ligeramente más grandes después de 7 días en las dos concentraciones de almidón más bajas. (Véase la figura 1-2). Cabría esperar esto, ya que puede no haber suficiente almidón para estabilizar completamente la interfase a una concentración más baja, lo que permite una coalescencia más fácil. Posteriormente se ha observado que permanecen sin cambios incluso después de varios meses de
45 almacenamiento a temperatura ambiente.

No hubo ningún cambio significativo en el tamaño de gota medido conforme se incrementó la fracción de aceite (a una proporción constante de almidón a aceite). Con un 12,5 % de aceite, D_{43} era de $36,6 \pm 1,98$ μm , con un 16,6 % de
50 aceite D_{43} era de $36,9 \pm 0,240$ μm , con un 25,0 % de aceite D_{43} era de $35,9 \pm 0,156$ μm , y con un 33,3 % de aceite D_{43} era de $36,4 \pm 2,16$ μm . Esto concuerda con las observaciones anteriores de que el tamaño de gota está determinado por la cantidad de almidón añadido.

La densidad de las gotas puede ser controlada mediante la cantidad de almidón añadido

Debido a las diferencias de densidad entre el aceite de almidón y el agua, la emulsión cubierta con partículas de
55 almidón no cremará a una velocidad tan alta, ya que los efectos de flotación se reducen significativamente. A partir del análisis geométrico, y las densidades de fase conocidas (pstarch 1550 kg/m^3 , poil 945 kg/m^3) y volúmenes (Vstarch, Voil, Vdroplets) suponiendo un embalaje compacto de almidón en la interfase agua-aceite y que el almidón es pequeño en comparación con el diámetro de la gota, podemos calcular a qué tamaño de gota deben flotar o
60 hundirse las emulsiones cubiertas de gránulos de almidón.

$$\rho_{drop} = \frac{V_{starch} \cdot \rho_{starch} + V_{oil} \cdot \rho_{oil}}{V_{drop}}$$

A medida que aumenta la concentración de almidón, el tamaño de gota disminuye y la densidad efectiva de las gotas cubiertas de almidón aumenta hasta que finalmente se vuelven más densas que la fase continua y comienzan

a hundirse. Este nivel se muestra como la línea vertical en la figura 1-2 y corresponde a nuestras observaciones y fotografías en la figura 1-3, donde las gotas de la emulsión se hunden principalmente a concentraciones superiores a 200 mg/ml de aceite. A medida que se aumenta la cantidad de almidón añadido (expresado como mg de almidón por ml de aceite) el tamaño de gota disminuye, la densidad aumenta porque hay un volumen relativo más pequeño de aceite en la capa de almidón que lo cubre. Las emulsiones de flotabilidad neutra no están sujetas a la formación de crema o sedimentación y, por lo tanto, tienen una mayor estabilidad.

Propiedades de la fase de emulsión

Las propiedades de la emulsión varían según la proporción de almidón a aceite, desde una crema de baja viscosidad hasta un gel de partículas débiles lleno de gotas (posiblemente con puente de aceite) fácilmente dispersables y fracturadas que presenta un límite de fluencia. El volumen ocluido relativo de la fase de emulsión pasa a un máximo de casi 9 a proporciones intermedias de almidón a aceite, es decir, es posible formar un gel de aceite/partículas de relleno a una concentración volumétrica de 1,7 % de almidón y 5,5 % de aceite

Propiedades de almacenamiento

No se observaron cambios durante el almacenamiento refrigerado de emulsiones durante 1 año.

Conclusiones del Experimento 1

El Experimento 1 ha demostrado que los gránulos de almidón intactos estabilizan eficazmente las gotas de aceite creando emulsiones tipo Pickering. Se comprobó que el tamaño de las gotas dependía de la concentración de almidón añadido, con cambios marginales más bajos a concentraciones de almidón más altas. En este punto otros factores como el nivel de tratamiento mecánico podrían ser determinantes. Aunque muchas de las emulsiones preparadas fueron sometidas a cremación o sedimentación, son estables frente a la coalescencia, mostrando pocos cambios en la apariencia y en la altura de la capa de emulsión después de la cremación o sedimentación inicial. Se ha observado que permanecen inalterados incluso después de varios meses de almacenamiento a temperatura ambiente. Este tipo de sistema de emulsión tipo Pickering de gránulos de almidón puede tener aplicaciones más allá de las de los alimentos, por ejemplo, en la cosmética, y para formulaciones farmacéuticas donde el almidón es un excipiente aprobado.

Experimento 2

En el experimento 2 se ilustra el efecto del tipo de tratamiento hidrofóbico y el grado de hidrofobicidad sobre las propiedades de la emulsión resultante.

Materiales

En este experimento se utilizó almidón aislado de granos de quinua (Biofood AB, Suecia, densidad 1500 kg/m³). Los gránulos aislados de almidón fueron tratados térmicamente o modificados con OSA con n-anhídrido octenil succínico (CAS: 26680-54-6 Ziyun Chemicals Co., Ltd, China). En los estudios de emulsión, la fase dispersa fue el aceite de triglicéridos de cadena media Miglyol 812 (Sasol, Alemania, densidad 945 kg/m³) y la fase continua fue un tampón de fosfato 5 mM con pH 7 0,2M NaCl (densidad 1009,6 kg/m³). Los otros químicos utilizados en el estudio fueron de grado analítico.

Se aisló almidón granular pequeño de granos de quinua como se describió en el experimento 1. Antes de su uso, los gránulos de almidón se disgregaron en polvo fino mediante molienda con mortero.

Modificación del almidón con OSA

El contenido de agua del polvo de almidón se determinó utilizando una balanza IR a 135 °C, a partir de la cual se midió la masa de polvo de almidón equivalente a 50 g de peso seco. El almidón se suspendió completamente en la parte doble por peso de agua utilizando una hélice de acero inoxidable y el pH se ajustó a 7,6. OSA se añadió al 3 % (o 6 %, 10 %) basándose en el peso seco del almidón, y se añadió en cuatro porciones con un retraso de 15 minutos entre adiciones. El pH se ajustó con 25 % HCl y/o 1M NaOH. Luego, se utilizó un equipo de titulación automática con medidor de pH y 1M NaOH para mantener el pH en 7,6. El proceso se interrumpió cuando el pH se mantuvo estable durante al menos 15 minutos, es decir, no fue necesario realizar más ajustes de pH para mantenerlo en 7,6. La solución de almidón-agua-OSA se centrifugó a 3000 g durante 10 minutos y se vertió el agua. El almidón se mezcló con agua destilada y se centrifugó dos veces. El almidón se mezcló con ácido cítrico de pH 4,5 a 5 antes de ser centrifugado y enjuagado. El almidón se extendió sobre bandejas de acero inoxidable y se secó a temperatura ambiente durante al menos 48 horas.

La determinación del grado de sustitución del almidón modificado con OSA se realizó mediante un método de titulación tal como se describe en el experimento 1. La determinación se realizó por duplicado para el almidón modificado con OSA y el almidón de control, que era del mismo lote de origen que el almidón modificado con OSA.

El peso seco del almidón se determinó mediante una balanza IR a 135 °C. Para ello, se usó una cantidad de muestra de aproximadamente 1 g por duplicado. Luego, se pesaron 2,5 g de almidón basado en materia seca y se añadieron a un vaso de precipitados de 50 ml. El almidón se humedeció con unas gotas de etanol antes de añadir 25 ml de HCl 0,1M y luego se agitó con un agitador magnético durante 30 minutos. La suspensión se centrifugó a 3000 g durante 10 minutos y el sobrenadante se descartó. El almidón se mezcló con 25 ml de etanol antes de la centrifugación para lavar el almidón. Luego se descartó el sobrenadante. El almidón se lavó como anteriormente, pero dos veces con agua destilada. El almidón se añadió a un vaso de precipitados de 500 ml y se mezcló con 150 ml de agua destilada. La mezcla se calentó en un baño de agua hirviendo a 95 °C durante 10 minutos antes de enfriarse a 25 °C. La mezcla se tituló con NaOH 0,1 M hasta que el pH fue de 8,3. Se observó el volumen de NaOH utilizado. El porcentaje de grupos carboxilo de OSA (véase la tabla 1-1) en los gránulos se calculó mediante:

$$\%OSA = \frac{(V_{muestra} - V_{control}) \cdot M \cdot 210}{W} \cdot 100\%$$

Donde V es el volumen (ml) de NaOH requerido para la muestra y la titulación de control, M es la molaridad de NaOH (0,1M), W es el peso seco (mg) del almidón y 210 es el peso molecular del grupo octenil succínico.

TABLA 1-1: Verificación del grado de modificación con OSA expresado en %

% OSA añadido	V (ml)	% de grupos carboxilo de OSA en los gránulos, es decir, el grado de modificación expresado en %
0	0,325	0
3	2,64	1,95
6	4,15	3,21
10	5,87	4,66

Modificación térmica del almidón

Se colocó almidón seco (10 g) en una placa de Petri abierta en una capa de 1-2 mm de espesor. Las muestras se calentaron a 120 °C durante diferentes duraciones en un horno (30, 60, 90, 120 y 150 minutos). Las muestras tratadas térmicamente se dejaron a temperatura ambiente durante varias horas antes de usarlas. Este tratamiento se realizó con el fin de modificar hidrofóticamente la superficie de los gránulos de almidón y de ese modo lograr una mayor afinidad con la interfase de agua con aceite.

Emulsificación

Se prepararon emulsiones con un volumen total de 6 ml en tubos de ensayo de vidrio. Todas las emulsiones se hicieron por triplicado. Las emulsiones contenían 7 % de Miglyol (es decir, 0,4 g) en fase dispersa, una cantidad de almidón de 214 mg/ml de aceite (es decir, 0,089 g) y solución de tampón de fosfato 5 mM en fase continua pH 7 con 0,2 M NaCl (es decir, 5,63 g). Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente sin ningún control de temperatura. El almidón, el aceite y la solución tampón se pesaron y se colocaron en tubos de ensayo y se agitaron con un mezclador vortex (VM20, Chiltern Scientific Instrumentation Ltd, Reino Unido) durante 5 segundos antes de mezclarse a 22 000 rpm durante 30 segundos con un Ystral (D- 79282, Ballrechten-Dottingen, Alemania).

Caracterización de emulsiones por dispersión de luz

Se usó un analizador de tamaño de partícula por difracción láser (Mastersizer 2000 Ver.5.60, Malvern, Reino Unido) para determinar la distribución del tamaño de partícula de las gotas de aceite. La emulsión se añadió al sistema de flujo que contenía agua miliQ y se bombeó a través de la cámara óptica. Para reducir la cantidad de gotas agregadas, la velocidad de la bomba fue de 2000 rpm. El índice de refracción (IR) de la partícula se ajustó a 1,54, que corresponde al almidón que cubre las gotas. El índice de refracción de la fase continua se estableció en 1,33, que es el IR del agua. La muestra se añadió hasta que el oscurecimiento fue de entre el 10 y el 20 %. Se determinaron los tamaños medios de gota $D_{4,3}$ y $D_{3,2}$ así como el modo de las distribuciones de tamaño de gota de la emulsión.

Conclusiones en vista del Experimento 2

Todos los tratamientos permitieron la producción de emulsiones estabilizadas con gránulos de almidón y aunque las gotas variaban en tamaño y había algunos gránulos de almidón libres; una vez formados, las observaciones visuales indicaron que permanecieron como gotas. Sin embargo, los gránulos no tratados tenían una capacidad emulsionante significativamente menor y presentaban la mayor dispersión en la distribución del tamaño de gota con un pico (modo) a 127 µm. La Tabla 1-2 enumera los tamaños de gota medidos. Parece haber un nivel óptimo de modificación con OSA en torno al 3 % o un tratamiento térmico de 30 a 90 minutos a 120 °C. Un nivel de modificación demasiado bajo puede no dar a los gránulos la suficiente afinidad para adsorberse en la interfase aceite-agua, donde un nivel demasiado alto de hidrofobicidad puede dar como resultado gotas agregadas. La

modificación hidrofóbica de los gránulos de almidón intactos los hace funcionar bien ya que las partículas para estabilizar las emulsiones de tipo Pickering con muchas propiedades útiles que se ilustran adicionalmente en los siguientes ejemplos.

5 TABLA 1-2 Mediciones del tamaño de partícula de la emulsión hecha con gránulos de almidón con diferentes modificaciones hidrofóbicas usando 214 mg de gránulos de almidón/ml de aceite.

	D _{3,2} - Diámetro medio ponderado de área (µm) ± desviación estándar	D _{4,3} - Diámetro medio ponderado de volumen (µm) ± desviación estándar	Modo (pico) (µm)
Almidón nativo	3,71 ±0,486	59,6±9,50	127
1,95 % OSA	9,96±0,335	43,3± 1,79	50,9
3,21 % OSA	13,5±0,991	42,0±3,92	42,7
4,66 % OSA	19,4± 1,97	54,6± 1,79	54,9
30 min calor (120 °C)	2,95±0,560	28,3±22,7	43,4
60 min calor (120 °C)	3,58± 1,08	46,1 ±26,7	43,4
90 min calor (120 °C)	3,41 ±0,425	41,5±9,45	40,3
120 min calor (120 °C)	5,11 ±3,01	65,8±35,7	88,4
150 min calor (120 °C)	4,42± 1,24	62,4±31,1	91,8

Experimento 3

- 10 En el experimento 3 se estudió la capacidad estabilizadora de 7 diferentes gránulos de almidón intactos para generar emulsiones de aceite en agua.

En este estudio de evaluación se han investigado los siguientes almidones comerciales: arroz, arroz ceroso, maíz, maíz ceroso, maíz con alto contenido de amilosa (HylonVII) y cebada cerosa (todos de Lyckeby-Culinar AB, Suecia). El almidón aislado de granos de quinua (Biofood, Suecia) mediante molienda en húmedo como en el experimento 1 también se incluyó en el estudio. Los almidones fueron estudiados en su forma nativa, tratados térmicamente y modificados con OSA. La modificación con OSA se realizó como en el experimento 1. La fase continua fue un tampón de fosfato 5 mM con pH 7 con y sin 0,2 M NaCl, la fase dispersa fue el aceite de triglicéridos de cadena media Miglyol 812 (Sasol, Alemania).

- 15 El almidón aislado de granos de quinua (Biofood, Suecia) mediante molienda en húmedo como en el experimento 1 también se incluyó en el estudio. Los almidones fueron estudiados en su forma nativa, tratados térmicamente y modificados con OSA. La modificación con OSA se realizó como en el experimento 1. La fase continua fue un tampón de fosfato 5 mM con pH 7 con y sin 0,2 M NaCl, la fase dispersa fue el aceite de triglicéridos de cadena media Miglyol 812 (Sasol, Alemania).
- 20 Tratamiento térmico del almidón
- El almidón seco se colocó en placas de vidrio y se trató térmicamente en un horno a 120 °C durante 150 min para modificar hidrofóticamente las proteínas de superficie de los gránulos de almidón y así lograr una mayor capacidad de unión al aceite.

Mediciones del tamaño de partícula de los gránulos de almidón

- 30 Las distribuciones de tamaño de partícula del almidón se midieron mediante difracción láser (Coulter LS130, Beckman Coulter, Reino Unido) en una celda de flujo continuo (como se describe en el experimento 1).

Emulsificación

- 35 Las emulsiones se prepararon en tubos de ensayo de vidrio con 4 ml de la fase continua, 2 ml de la fase oleosa y 100-400 mg de almidón mezclándolos con un Ystrol (D-79282, Ballrechten-Dottingen, Alemania) a 11000 rpm durante 30 s.

Prueba de estabilidad del colorante

- 40 Aproximadamente 1 mg del colorante soluble en aceite Solvent Red 26 se añadió a la parte superior de las emulsiones después de 24 h y los tubos de ensayo se giraron suavemente 3 veces. Después de otras 2 horas, las emulsiones se agitaron con un mezclador vortex durante 5 s y se almacenaron a temperatura ambiente durante 6 días. El cambio de color indica que se observó la emulsión. El color después del vortex es una medida de la estabilidad de las gotas formadas. Las gotas estables no se intercambian con el colorante lipofílico, por lo que la fase de emulsión permanece blanca. Una mayor fase de emulsión de color rojo indica que las gotas estaban menos estabilizadas por los gránulos de almidón adsorbentes o que hay una fase de aceite libre en el sistema. Véase la tabla 2-1.

Microscopía

Para la microscopía de las emulsiones se utilizó un microscopio Olympus BX50 (Japón) y una cámara digital. Las imágenes fueron procesadas ImageJ (versión 1,42m).

Análisis

La separación de fases de la capa continua y de la emulsión se controló de la siguiente manera: las emulsiones se almacenaron a temperatura ambiente durante 6 días. Los tubos de ensayo con las muestras emulsionadas se fotografiaron 6 días después del vortex y las imágenes de las muestras se analizaron en ImageJ. La capacidad emulsionante de los almidones y la estabilidad de las emulsiones se expresaron como el volumen de la capa de emulsión cremosa con respecto al volumen total de la muestra. La fracción volumétrica de la emulsión (E) se calculó de la siguiente manera:

$$E = \frac{\text{Volumen de la emulsión}}{\text{Volumen total de la muestra}} \cdot 100 \%$$

También se calculó la cantidad de material, generalmente almidón restante, en el fondo del tubo de ensayo. Véase la tabla 2-1.

La distribución del tamaño de gota de las emulsiones se determinó a partir de imágenes microscópicas. El diámetro de al menos 250 gotas se midió con ImageJ en las muestras que contenían gotas con un diámetro inferior a 1,4 mm. El diámetro medio de la gota de la superficie (D_{32}) y el diámetro medio volumétrico (D_{43}) se calcularon usando las siguientes ecuaciones:

$$D_{32} = \frac{\sum_{i=1}^n D^3}{\sum_{i=1}^n D^2} D_{43} = \frac{\sum_{i=1}^n D^4}{\sum_{i=1}^n D^3}$$

en las que D es el diámetro de una gota medido y n el número total contado. El coeficiente de variación (CV) en porcentaje y la desviación estándar se han calculado de acuerdo con las ecuaciones siguientes para llegar a la distribución de las gotas de emulsión en cada muestra.

$$CV = \frac{\sigma}{D_{32}} \times 100 \quad \text{donde} \quad \sigma = \left[\sum_{i=1}^n \frac{(D_i - D_{32})^2}{n-1} \right]^{1/2}$$

Discusión en vista del Experimento 3Almidones

Los almidones seleccionados para este estudio tenían diferentes tamaños de gránulos, con la quinua con el tamaño más pequeño, seguida del arroz, el maíz y la cebada, y estos gránulos también tenían diferentes formas. Los gránulos de almidón de cebada eran esferas de forma suave y esferoides oblatos con un D_{32} medio de 17 μm , mientras que la quinua, el arroz y el maíz tenían formas poligonales más irregulares. Los gránulos de quinua tenían un D_{32} de aproximadamente 2 μm y tenían bordes lisos, mientras que el arroz tenía gránulos de bordes afilados con un D_{32} de 4,5 y 5,4 μm para el arroz ceroso y el normal, respectivamente. Los gránulos del maíz ceroso y el normal tenían tanto bordes lisos como afilados, mientras que el maíz con alto contenido de amilosa era más liso y también tenía algunos gránulos en forma de varilla. El tamaño medio de los gránulos de maíz era de 9,3 μm para el maíz con alto contenido de amilosa y de 15 μm para las otras dos variedades de maíz. La forma de los gránulos era similar para los tres gránulos de quinua; nativo, tratado con térmicamente y modificado con OSA. Sin embargo, el tamaño se incrementó para los gránulos que se habían sometido a tratamiento térmico o modificación con OSA, lo que en parte se debió a un mayor grado de agregación causado por el aumento de la hidrofobicidad. Los gránulos individuales de almidón de quinua tenían un tamaño entre 0,7 y 2,2 μm .

El almidón tiene una variación natural en la composición de amilosa/amilopectina y las variedades normales tienen un contenido de amilosa de aproximadamente 20-30 %. Los almidones cerosos tienen un contenido muy bajo de amilosa y en el presente estudio se usaron variedades cerosas de arroz, cebada y maíz. También se utilizó una variedad de maíz con un alto contenido de amilosa (HylonVII) con un 70 % de amilosa para ver el comportamiento de la emulsión en un espectro más amplio del contenido de amilosa. Se ha demostrado que la unión a OSA no es uniforme a escala molecular y se ve afectada por las diferencias en la ramificación de las moléculas de almidón.

La Tabla 2-1 resume las condiciones de prueba usadas y los resultados principales. El color después del vortex es una medida de la estabilidad de las gotas formadas desde que el colorante se añadió encima de las muestras después de la emulsión y antes de que las muestras se mezclaran en un vortex. Las gotas estables no tenían intercambio con ningún aceite teñido; de ahí que la fase de emulsión permaneciera blanca. El aumento de la fase de emulsión de color rojo indicó que las gotas estaban menos estabilizadas por los gránulos de almidón adsorbentes.

El tamaño de las gotas se correlacionó con el color y la estabilidad de la emulsión. Los gránulos de almidón que fueron capaces de estabilizar las gotas pequeñas también crearon las gotas más estables. Esto dependía principalmente del tamaño de los gránulos estabilizadores, pero también la forma de los gránulos tuvo un impacto. La quinua, que tiene el tamaño de gránulo más pequeño, tenía la mejor capacidad preeminente para estabilizar una emulsión en las circunstancias utilizadas en este estudio. Las emulsiones se produjeron independientemente del tratamiento y la concentración del almidón de quinua o el sistema utilizado (muestras no 1-10 en la tabla 2-1).

La capacidad emulsionante de la quinua fue definitivamente mejor, seguida por el arroz, que solo tenía un tamaño de gránulo ligeramente mayor, pero los gránulos tenían una forma más irregular con bordes afilados. La capacidad emulsionante fue similar para las dos variedades de arroz (muestras números 11-13 y 17-18, 20 en la tabla 2-1). También el maíz ceroso y normal tenía gránulos de forma irregular, lo que puede ser una de las razones de la capacidad estabilizadora ligeramente menor del maíz en comparación con la cebada, que tenía un tamaño de gránulo más grande pero una forma más lisa. Un menor contacto superficial de las partículas debido a la rugosidad de la superficie o los bordes afilados tiene un impacto negativo sobre el poder emulsionante ya que el potencial interfacial disminuye. Otra razón fue probablemente la distribución bimodal del tamaño de la cebada, donde los gránulos más pequeños aumentaban potencialmente la estabilidad de la gota y disminuían el tamaño de la gota. Se produjeron cuatro muestras dos veces; número 9 (quinua), 20 (arroz), 31 (maíz) y 42 (cebada cerosa) según el etiquetado de la tabla 2-1. Todos con 200 mg de almidón OSA y tampón con sal como fase continua. La quinua y cebada cerosa, que produjeron emulsiones estables, mostraron buena reproducibilidad con respecto al tamaño de gota, la fracción sedimentaria y la fracción volumétrica de la emulsión, mientras que la reproducibilidad de los resultados para el arroz y el maíz fue escasa.

La capacidad estabilizadora del maíz ceroso y normal fue similar (muestras números 22-24 y 28-29, 31 en la tabla 2-1), pero el maíz con un alto contenido de amilosa (HylonVII) mostró un patrón diferente. Las tres muestras (números 33-35 en la tabla 2-1) presentaban solo pequeñas disparidades en la fracción de emulsión y el tamaño de gota, independientemente del tratamiento de los gránulos de almidón. Los gránulos en forma de varilla parecían tener un gran impacto en la capacidad de estabilidad y han demostrado que las partículas largas con una relación de aspecto por encima de 4 son emulsionantes más efectivos que las partículas menos alargadas de humectabilidad similar.

Tratamientos

Todos los almidones de este estudio fueron usados en su forma nativa, tratados térmicamente y modificados con OSA, respectivamente. Se supone que los gránulos de almidón nativo son ineficaces como estabilizadores de gotas de aceite debido a su baja hidrofobicidad, sin embargo, la quinua nativa (y hasta cierto punto HylonVII) fueron capaces de estabilizar las gotas formadas. Todos los gránulos de almidón tienen proteínas unidas a la superficie y, para los gránulos pequeños de quinua, la gran superficie total de todos los gránulos puede proporcionar suficiente hidrofobicidad como para estabilizar las gotas, aunque las gotas estabilizadas por el almidón de quinua nativo fueron mayores que cuando se usaron los almidones modificados.

Los almidones tratados térmicamente fueron estabilizadores algo mejores que los almidones nativos, ya que la hidrofobicidad de las proteínas de la superficie había aumentado. Especialmente las gotas estabilizadas por la quinua, el arroz y la cebada cerosa tenían un tamaño de gota reducido. La hidrofobicidad de los gránulos de almidón aparentemente había aumentado, pero no lo suficiente como para que los gránulos pudieran actuar como estabilizadores a menos que el tamaño del gránulo fuera tan pequeño como el de la quinua.

Los almidones modificados con OSA fueron todos capaces de estabilizar las gotas de aceite, pero la utilización de los gránulos no fue completa ya que el almidón en cierta medida se había sedimentado. El contenido de OSA fue de entre 2,6 y 3,6 % para todos los almidones y la quinua también se modificó a un grado menor de 1,8 %. No se observaron diferencias entre las muestras de quinua con los dos grados de OSA con respecto al tamaño de gota, la fracción volumétrica de la emulsión o la estabilidad, lo que indicaba que la unión a OSA de 1,8 % proporcionaba suficiente hidrofobicidad de la superficie de los gránulos para estabilizar una emulsión. El almidón modificado con un 3 % de OSA está disponible comercialmente y está aprobado como aditivo alimentario.

Fase continua

Se usaron dos tampones de fosfato diferentes, con y sin 0,2 M NaCl, como fase continua y el pH fue de 7 en ambos tampones. La diferencia en el patrón de formación de gotas fue considerable entre los tampones con o sin sal. La diferencia fue evidente tanto en los niveles macro como microscópico para los gránulos de almidón modificados hidrofóticamente, pero no para los gránulos nativos.

Quando se usó una fase continua sin sal, las emulsiones tenían distintas formas cónicas formadas por la punta de los tubos de ensayo, lo que indicaba una capa de emulsión reticulada con un límite elástico, sin embargo, esta forma era menos obvia en presencia de sal. Además, la fracción volumétrica de la emulsión era más grande y el sedimento de almidón era menor en los sistemas sin sal. La distribución del tamaño de gota también tenía un carácter diferente, teniendo las emulsiones sin sal distribuciones de tamaño de gota bimodales con un CV grande (74-85 %) y las gotas en las emulsiones que contenían sal tenían una distribución más unimodal con un CV de aproximadamente 40 %. Estas observaciones pueden explicarse en gran medida por el comportamiento de la formación de gotas. En ausencia de sal, las gotas de emulsión formaban una red abierta más rígida de gotas y grupos de gránulos. Mientras que, en los sistemas con sal, las gotas se estabilizaron de manera menos eficaz y se combinaron para darles un tamaño uniforme y mayor sin una agregación significativa. Las emulsiones estabilizadas con almidón nativo no se vieron afectadas por la presencia de sal.

Concentración de almidón

Se estudió el efecto de la concentración de almidón sobre la emulsificación en cuatro variedades de almidón: quinua, arroz, maíz y cebada cerosa, todas ellas modificadas con OSA y en tampón de fosfato de 0,2M NaCl. Estas condiciones se utilizaron ya que tenían el mejor resultado de emulsificación en los estudios de evaluación iniciales, y las emulsiones con sal tenían distribuciones más uniformes del tamaño de gota y no estaban gelatinizadas. La masa de almidón añadido fue de 100, 200 y 400 mg, lo que corresponde a aproximadamente 3,2, 6,2 y 11,8 % de volumen del aceite (o 1,1, 2,2 y 3,9 % de volumen del sistema total), respectivamente. El tamaño de gota disminuyó y la fracción volumétrica de la fase de emulsión se incrementó a medida que aumentaba la concentración de los gránulos de almidón, como puede verse en las muestras números 8-10 (quinua), 19-21 (arroz), 30-32 (maíz) y 41-43 (cebada cerosa) en la tabla 2-1.

Se ha demostrado previamente que el tamaño medio de gota de las emulsiones estabilizadas por partículas sólidas disminuye al aumentar la concentración de partículas a medida que están disponibles más partículas para estabilizar gotas más pequeñas. Sin embargo, cada sistema tiene probablemente un tamaño de gota limitante, que depende de las propiedades físicas y mecánicas del sistema (es decir, el tamaño de las partículas y el método de emulsificación) y cuando se alcanza este tamaño de gota cualquier exceso de partículas estará en la fase continua. En el presente estudio, las muestras con la mayor cantidad de almidón produjeron emulsiones con una densidad superior a la fase continua. El tamaño de gota disminuyó y la cantidad de almidón unido a la superficie de las gotas aumentó a medida que aumentaba la concentración de almidón, lo que dio como resultado una emulsión más estable. Otro efecto de la alta concentración de almidón fue que aumentó la cantidad de gránulos de almidón entre las gotas. Esto dio como resultado un aumento de la densidad total de las gotas y de la fase de emulsión.

Es interesante observar que incluso a bajas concentraciones de almidón (100 mg) había sedimentos de gránulos en el fondo de los tubos de ensayo. De hecho, la fracción sedimentaria de almidón disminuyó cuando la cantidad de almidón aumentó de 100 a 200 mg. Las gotas formadas a una menor concentración de gránulos de almidón estaban menos cubiertas por los gránulos y más sujetas a la coalescencia, lo que desabsorbió los gránulos de la superficie de las gotas más grandes. Sin embargo, se ha demostrado que las emulsiones Pickering se estabilizan considerablemente incluso cuando las partículas de sílice (0,5-0,8 µm) o esporas (~25 µm) se distribuyen de forma muy desigual en la superficie de las gotas. La emulsión también era menos densa a una baja concentración de gránulo de almidón, lo que significa que la movilidad de las gotas y los gránulos promovió la sedimentación de los gránulos no absorbidos en la fase continua.

Tamaño de gránulo de almidón

Para cuantificar los efectos de la cantidad de almidón y tamaño de gránulo añadidos, se estimó la máxima cobertura de superficie posible para la concentración de almidón con un tamaño de partícula determinado. Las suposiciones hechas fueron que todas las gotas serán del mismo tamaño y todas las partículas de almidón son idénticas, esféricas, y están unidas en la interfase aceite-agua en un ángulo de contacto de 90° con una fracción de empaquetamiento interfacial $\phi \approx 0,907$, es decir empaquetamiento hexagonal compacto. La cobertura máxima teórica, Γ_M , se estima utilizando la siguiente ecuación:

$$\Gamma_M = \rho_{sg} \frac{2}{3} d_{sg} \phi \cdot 10^6$$

en la que d_{sg} es el diámetro medio de la superficie del gránulo de almidón, ρ_{sg} es la densidad del almidón (1550 kg/m³) y ϕ es la densidad de empaquetamiento. Las estimaciones de la cobertura máxima de la superficie, así como los tamaños medios de los gránulos de almidón para los diversos almidones figuran en la Tabla 2-2. Dado que la cobertura de la superficie (mg/m²) aumenta con el tamaño del gránulo de almidón, no es sorprendente que el diámetro de gota generado en la figura 2-1 disminuya al disminuir el tamaño del gránulo a medida que se cubre más área por unidad de masa con gránulos más pequeños.

El área de superficie específica de una emulsión, por volumen de fase dispersa se define por:

$$S \equiv \frac{6}{d_{32}}$$

- 5 y donde el diámetro medio de la superficie d_{32} se mide por dispersión de la luz. En función de la cantidad de almidón añadido, C_{sg} (en mg por ml) y la cobertura máxima teórica, Γ_M , del tamaño dado de los gránulos de almidón, se puede calcular un área de superficie teórica que podría generarse por volumen de persecución dispersa, es decir:

$$S \equiv \frac{6}{d_{32}} \approx \frac{C_{sg}}{\Gamma_M}$$

- 10 En la figura 2-2 se muestra una comparación de las áreas de superficie de gotas medidas y calculadas, que ilustra una buena concordancia entre estas estimaciones y las gotas estabilizadas de almidón medidas, a pesar de las suposiciones más bien toscas de los cálculos. Los almidones que se encuentran por encima de la línea en la figura 2-2 tienen un área de gota mayor a la prevista y los que están debajo de la línea tienen un área más pequeña. Una explicación física de las áreas de gota más grandes es que la suposición del empaquetamiento hexagonal compacto
15 sobreestima la cantidad de almidón en la superficie y que es posible tener menos almidón por unidad de área y aun así lograr la estabilización de las gotas.
- Mediante análisis geométricos podría argumentarse que a medida que aumenta la proporción de tamaño de gránulo de almidón a tamaño de la gota en formación, la cobertura superficial mínima requerida para estabilizar las gotas disminuye, ya que son posibles espacios mayores entre los gránulos en la superficie, al tiempo que se mantienen
20 suficientes impedimentos estéricos para evitar la coalescencia. Por esta razón, los gránulos de almidón más grandes, tales como la cebada y el maíz, tienen un área de superficie mayor que la prevista y la tendencia aumenta al aumentar el área (es decir, con tamaños de gota más pequeños). Las observaciones del microscopio lo confirman, mostrando espacios y huecos más grandes en la superficie de las gotas entre el almidón adsorbido. En el caso del arroz, el área generada es menor de lo previsto (los puntos de datos se encuentran por debajo de la línea en la
25 figura 2-2). En las imágenes microscópicas de las emulsiones de arroz aparecieron más gránulos de almidón libre en la fase continua y un notable aumento en la cantidad de sedimento.

Conclusiones en vista del Experimento 3

- 30 Este experimento de evaluación, sobre la capacidad emulsionante de un amplio espectro de almidones en su forma granular, reveló que los gránulos de almidón intactos pueden estabilizar eficazmente las gotas de aceite en una emulsión. Entre los diferentes almidones que se han examinado, el almidón de la quinoa tenía la mejor capacidad preeminente para actuar como estabilizador, probablemente debido al tamaño pequeño de los gránulos. El almidón de quinoa fue capaz de estabilizar las gotas incluso en su estado nativo, aunque el tratamiento térmico y, sobre todo,
35 los gránulos modificados con OSA fueron más eficientes, lo que se demostró por el menor tamaño de gota y la mayor estabilidad de la gota. Todos los almidones modificados con OSA utilizados en este estudio pudieron estabilizar las gotas y el diámetro de la gota disminuyó con el tamaño de los gránulos. El tamaño de la gota también disminuyó al aumentar la concentración de los gránulos de almidón. Se ha estudiado el impacto de la concentración de sal sobre la capacidad emulsionante para simular las condiciones de diferentes sistemas alimentarios y otros
40 productos basados en emulsiones. Los sistemas sin sal produjeron emulsiones rígidas muy estables con gotas agregadas con una distribución de tamaño de gota bimodal.

- Aunque el tamaño de las gotas de emulsión estabilizadas con gránulos de almidón era relativamente grande, las gotas pueden ser adecuadas para la encapsulación de ingredientes valiosos en alimentos y productos
45 farmacéuticos.

Tabla 2-1. Resumen de las condiciones y resultados experimentales

Número de muestra	Origen del almidón	Tratamiento del almidón	Concentración de sal en la fase continua	Almidón añadido (mg)	Color después del vortex (0-4) ^a	Fracción volumétrica después del vortex	Sedimento (mm ³ /mg) ^b	Tamaño de gota 6 días después del vortex	D ₍₃₂₎ (µm)	D ₍₄₃₎ (µm)	CV (%)
1	Quinua	Nativa	Sin sal	200	1	0,67	0,46	140	150	45	
2	Quinua	Calentada	Sin sal	200	1	0,82	0,075	100	120	85	
3	Quinua	OSA 1,8 %	Sin sal	200	0	0,87	0	74	81	74	
4	Quinua	OSA 2,9 %	Sin sal	200	0	0,94	0	74	87	77	
5	Quinua	Nativa	0,2 M NaCl	200	1	0,60	0,35	320	370	46	
6	Quinua	Calentada	0,2 M NaCl	200	1	0,68	0,31	160	170	41	
7	Quinua	OSA 1,8 %	0,2 M NaCl	200	0	0,78	0,015	76	79	40	
8	Quinua	OSA 2,9 %	0,2 M NaCl	100	1	0,58	0,32	270	290	32	
9	Quinua	OSA 2,9 %	0,2 M NaCl	200	1	0,77/0,74 ^c	0,03/0,02 ^c	100/110 ^c	110/120 ^c	37/37 ^c	
10	Quinua	OSA 2,9 %	0,2 M NaCl	400	0	1,00	n.v.	52	55	42	
11	Arroz ceroso	Nativo	0,2 M NaCl	200	4	0,40	2,3	>1 mm	>1 mm	-	
12	Arroz ceroso	Calentado	0,2 M NaCl	200	4	0,44	2,0	>1 mm	>1 mm	-	
13	Arroz ceroso	OSA 3,8 %	0,2 M NaCl	200	2	0,59	0,55	440	500	42	
14	Arroz	Nativo	Sin sal	200	4	0,45	2,1	>1 mm	>1 mm	-	
15	Arroz	Calentado	Sin sal	200	2	0,50	1,2	150	200	79	
16	Arroz	OSA 2,8 %	Sin sal	200	1	0,75	0,12	100	170	70	
17	Arroz	Nativo	0,2 M NaCl	200	4	0,42	1,7	>1 mm	>1 mm	-	
18	Arroz	Calentado	0,2 M NaCl	200	3	0,46	1,7	530	590	71	
19	Arroz	OSA 2,8 %	0,2 M NaCl	100	3	0,55	1,3	550	630	41	
20	Arroz	OSA 2,8 %	0,2 M NaCl	200	2	0,55/0,62 ^c	0,70/0,33 ^c	530/350 ^c	560/440 ^c	75/63 ^c	
21	Arroz	OSA 2,8 %	0,2 M NaCl	400	2	0,85	n.v.	200	310	71	
22	Maiz ceroso	Nativo	0,2 M NaCl	200	4	0,38	1,5	Sin gotas	Sin gotas	-	
23	Maiz ceroso	Calentado	0,2 M NaCl	200	4	0,39	1,9	Sin gotas	Sin gotas	-	
24	Maiz ceroso	OSA 3,3 %	0,2 M NaCl	200	3	0,64	0,15	500	540	38	
25	Maiz	Nativo	Sin sal	200	4	0,34	1,5	Sin gotas	Sin gotas	-	
26	Maiz	Calentado	Sin sal	200	4	0,29	3,7	Sin gotas	Sin gotas	-	
27	Maiz	OSA 2,6 %	Sin sal	200	2	0,69	1,0	420	470	57	
28	Maiz	Nativo	0,2 M NaCl	200	4	0,38	1,2	Sin gotas	Sin gotas	-	
29	Maiz	Calentado	0,2 M NaCl	200	4	0,38	1,5	Sin gotas	Sin gotas	-	
30	Maiz	OSA 2,6 %	0,2 M NaCl	100	3	0,53	0,27	1300	1400	26	
31	Maiz	OSA 2,6 %	0,2 M NaCl	200	3	0,50/0,59 ^c	0,65/0,14 ^c	1300/720 ^c	1400/750 ^c	30/29 ^c	
32	Maiz	OSA 2,6 %	0,2 M NaCl	400	2	0,81	n.v.	290	300	34	
33	Maiz alto cont. amilosa	Nativo	0,2 M NaCl	200	3	0,48	1,2	980	>1 mm	51	
34	Maiz alto cont. amilosa	Calentado	0,2 M NaCl	200	3	0,52	1,1	830	880	40	
35	Maiz alto cont. amilosa	OSA 3,1 %	0,2 M NaCl	200	3	0,54	0,90	710	750	27	
36	Cebada cerosa	Nativa	Sin sal	200	4	0,42	1,3	>1 mm	>1 mm	-	
37	Cebada cerosa	Calentada	Sin sal	200	3	0,51	1,2	>1 mm	>1 mm	-	

38	Cebada cerosa	OSA 3,6 %	Sin sal	200	2	0,76	0,040	370	460	65
39	Cebada cerosa	Nativa	0,2 M NaCl	200	4	0,38	1,3	>1 mm	>1 mm	-
40	Cebada cerosa	Calentada	0,2 M NaCl	200	3	0,50	0,90	890	930	41
41	Cebada cerosa	OSA 3,6 %	0,2 M NaCl	100	3	0,54	0,65	1200	1400	32
42	Cebada cerosa	OSA 3,6 %	0,2 M NaCl	200	3	0,58/0,60 °	0,27/0,22 °	690/670 °	720/700 °	27/27 °
43	Cebada cerosa	OSA 3,6 %	0,2 M NaCl	400	2	0,80	n.v.	270	300	34

^a 0 = fase de emulsión blanca que no fue coloreada por Solvent Red, 4 = emulsión roja o fase oleosa completamente coloreada por Solvent Red, 1 a 3 = grado creciente de fase de emulsión de color rojo. ^b Proporción de volumen sedimentario añadido al almidón. ^c Reproducción de los resultados de dos muestras diferentes.
n.v. No visible. La fase de emulsión cubre el fondo del tubo de ensayo y cualquier sedimento remanente en el fondo no es visible.
Las muestras 11-43 se divulgan como ejemplos comparativos.

Tabla 2-2. Tamaño de las partículas y cobertura máxima de la superficie de los gránulos de almidón.

Almidón	D ₁₀ [μm]	D ₃₂ [μm]	D ₄₃ [μm]	Γ _M [mg m ⁻²] ^a
Quinua nativa	1,14	1,7	2,51	1590
Quinua calentada	1,33	2,23	3,38	2090
Quinua OSA	1,34	2,27	3,45	2130
Arroz OSA	3,45	4,46	5,25	4180
Arroz ceroso OSA	3,57	5,38	7,46	5040
Hylon VII OSA	7,07	9,32	11,1	8740
Maíz ceroso OSA	9,54	14,7	18,0	13800
Maíz OSA	11,3	14,9	17,1	14000
Cebada cerosa OSA	7,49	17,5	24,2	16400

El arroz, el maíz, el hylon y la cebada se divulgan como ejemplos comparativos.

Experimento 4

- 5 En el experimento 4 se han preparado emulsiones usando varios aceites y grasas, ya que las propiedades físicas de la fase dispersa varían dependiendo del tipo de aceite. Los aceites que se han utilizado como fase dispersa incluyen: Miglyol 812, aceite de soja (natural y purificado con Al₂O₃), aceite de colza, aceite de parafina, manteca de karité (sólida a temperatura ambiente), aceite de karité, Bassol C, tributirato de glicerilo y hexadecano. El almidón granular pequeño modificado con OSA como se describe en el experimento 1 se ha usado como partículas estabilizadoras de gotas. Las emulsiones se prepararon como se describe en el experimento 1 con la excepción de las grasas sólidas que se fundieron antes de la homogeneización de alta cizalla.

Efecto de la fase dispersa

- 15 Las emulsiones se crearon con éxito con todos los diferentes aceites usados. Sin embargo, la superficie de las gotas de aceite de tributirato estaba escasamente ocupada por los gránulos de almidón. Esto probablemente se deba a la mayor solubilidad del tributirato en agua.

Conclusiones en vista del Experimento 4

- 20 La estabilización de gotas de aceite con gránulos de almidón es efectiva en una amplia gama de aceites. Esto tiene un impacto práctico, ya que indica un sistema robusto que no es particularmente sensible al tipo de aceite utilizado, por lo que es aplicable en una amplia gama de productos alimenticios, cosméticos, farmacéuticos y técnicos.

Experimento 5

En el experimento 5, se prepararon emulsiones usando diferentes técnicas de procesamiento, con el propósito de demostrar que las emulsiones estabilizadas con gránulos de almidón se pueden preparar usando diversos métodos.

- 30 La fase oleosa en este experimento fue Bassol C (AAK, Suecia), los gránulos de almidón se aislaron de la quinua y se hicieron más hidrofóbicos mediante la modificación con OSA al 2,9 % (como se describe en el experimento 2), y la fase continua fue tampón de fosfato 5 mM con pH 7 y 0,2 M NaCl. Se pesaron cuatro muestras de la siguiente manera: se añadieron 3,50 g de gránulos de almidón a 59,5 g de tampón fosfato y luego se añadieron 7,00 g de Bassol C y se agitaron antes de la homogeneización. Cada muestra se hizo mediante un método de homogeneización diferente. La muestra 1 se preparó usando un mezclador Sorvall Omni Mixer 3 200 rpm (nivel 2) durante 5 minutos. La muestra 2 se preparó usando un mezclador Sorvall Omni 12 800 rpm (nivel 8) durante 5 minutos. La muestra 3 se preparó en un homogeneizador de alta presión (HPH) a escala de laboratorio de 40 bar y el volumen completo se pasó a través del HPH 10 veces. La muestra 4 se realizó en una bomba peristáltica Masterflex que funcionaba a 350 ml/min y el volumen completo pasó a través de la bomba en el circuito de circulación un total de 300 veces.

- 45 Las emulsiones se diluyeron aproximadamente 5 veces con la misma solución tampón que en la fase continua antes de ser analizadas. Las distribuciones de tamaño de gota de las emulsiones se determinaron usando un analizador de partículas de difracción láser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments). La dispersión se diluyó en el instrumento hasta alcanzar un oscurecimiento del 8-12 %. La distribución del tamaño se calculó a partir de la teoría de Mie usando un índice de refracción de almidón de 1,54. También se investigaron las emulsiones usando un microscopio óptico (Olympus BX50, Japón) equipado con una cámara de video digital.

Resultados del Experimento 5

- 50 Las emulsiones podrían crearse usando los cuatro métodos de emulsificación. Basándose en la cantidad de almidón añadido (500 mg/mg de aceite), se esperaba un intervalo de tamaño de gota de 26-33 μm (D₄₃). Esto se observó en todas las muestras mezcladas por sorvall y la preparada en la bomba peristáltica. La muestra preparada en el homogeneizador de alta presión se sometió a un tratamiento mecánico mucho más elevado y, por esta razón, las gotas fueron mucho más pequeñas, pero también se floclaron en estructuras de aproximadamente 100 μm de

tamaño. Esto puede deberse a que no había suficiente almidón para cubrir la elevada superficie de aceite generada en el homogeneizador y las partículas de almidón compartían gotas de aceite que generaban la microestructura observada. En la tabla 3-1 se encuentran los tamaños de gota promedio medidos, las micrografías de gotas y las imágenes de la apariencia general de la emulsión.

5

La tabla 3-1 resume las condiciones para la figura 3-1.

<p>La Figura 3-1 más alta 10 % Bassol C 500 mg/g OSA Q 2,9 % 300 s sorvall nivel 2 (100X aumento) D32 = 7,873 μm D43= 26,07 μm Modo= 19,27 μm Emulsión de relleno lisa</p>	<p>La segunda Figura 3-1 más alta 10 % Bassol C 500 mg/g OSA Q 2,9 % 300 s sorvall nivel 8 (100X aumento) D32 = 10,08 mm D43= 27,18 mm Modo= 26,58 mm Debido a las rpms más altas, se engulló más aire, por lo tanto, la emulsión flotó. Tamaño de gota medido similar al nivel 2.</p>
<p>La segunda Figura 3-1 más baja 10 % Bassol C 500 mg/g OSA Q 2,9 % HPH (100X aumento) D32 = 79.08 mm D43= 102.8 mm Modo= 96.15 mm La mayor intensidad de HPH crea gotas más pequeñas que existen como flóculos vistos en la imagen a la derecha, que mide aproximadamente 100 μm de tamaño en la dispersión de la luz.</p>	<p>La Figura 3-1 más baja 10 % Bassol C 500 mg/g OSA Q 2,9 % Pump (100X aumento) D32 = 5.959 mm D43= 31.104 mm Modo= 53.93 mm Una intensidad más baja da gotas más grandes pero una apariencia más suave. También se observó más almidón libre.</p>

Conclusiones en vista del Experimento 5

- 10 Este experimento mostró que es posible usar varios métodos de emulsificación mecánica para generar emulsiones estabilizadas de gránulos de almidón. Esto indica un sistema robusto que podría aplicarse en varios procesos y productos diferentes en varias aplicaciones (Figura 3).

Experimento 6

- 15 Los alimentos y otros sistemas de emulsión presentan grandes variedades en pH y concentración de sal. Por lo tanto, se ha estudiado la emulsificación con fases continuas con pH de 4-7 y concentraciones de sales de 0,1-2 M NaCl y 0,2M CaCl₂.
- 20 La fase dispersa fue Miglyol 812, se usaron gránulos de almidón granular pequeño como se describe en el experimento 1 como partículas estabilizadoras de gotas y la fase continua fue tampón de fosfato 5 mM o agua milliQ a pH variable y cantidades de sales añadidas. Las emulsiones se prepararon como en el experimento 1.

Efecto de la fase continua

- 25 La concentración de sal se varió en pH 7 y el pH se varió a una concentración de sal de 0,1M NaCl. En otra muestra, se utilizó 0,1 M CaCl₂ en agua MilliQ como fase continua. Ni el pH ni la concentración de sal tuvieron ningún efecto significativo sobre la fracción volumétrica o el tamaño medio de gota de la emulsión. Sin embargo, los resultados del experimento 3 mostraron que hay una diferencia en la red de emulsiones entre sistemas con y sin sal.

30

Conclusiones en vista del Experimento 6

- 35 La estabilización de gotas de aceite con gránulos de almidón es eficiente independientemente del pH y la concentración de sal de la fase continua. Esto indica un sistema muy robusto que tendrá aplicaciones en una amplia variedad de productos.

Experimento 7

- 40 En este experimento, se prepararon emulsiones con diferentes contenidos de fase oleosa para probar su estabilidad durante el almacenamiento y las propiedades reológicas, dos propiedades que son importantes en varias aplicaciones de emulsión. Para determinar la estabilidad de las emulsiones, se prepararon emulsiones neutras de flotabilidad, es decir, las gotas de aceite cubiertas de almidón tenían aproximadamente la misma densidad que la fase continua. Las fracciones de volumen de aceite fueron 12,5, 16,6, 25,0 y 33,3 %, la relación de almidón a aceite fue constante a 214 mg de almidón/ml de aceite y el volumen total de las muestras fue de 7 ml. Se aisló almidón
- 45 granular pequeño y se modificó la OSA al 1,8 % como se describe en el experimento 2.

La fase continua de las emulsiones fue un tampón de fosfato 5 mM con pH 7 y 0,2 M NaCl (densidad 1009,6 kg/m³ a 20 °C), la fase dispersa fue Miglyol 812 (densidad 945 kg/m³ a 20 °C, Sasol GmbH, Alemania). Las emulsiones se realizaron por mezcla de alta cizalla en un mezclador Ystral X10 con una herramienta de dispersión de 6 mm (Ystral GmbH, Alemania) a 22000 rpm durante 30 s.

Estabilidad de almacenamiento

Las muestras se almacenaron en tubos de ensayo sellados a 5 °C durante 1 día, 1, 2, 4 y 8 semanas antes de las mediciones del tamaño de gota (usando difracción láser Coulter LS 130, descrita en el experimento de método 2) y determinación de fracciones de volumen de fotografías (experimento metodológico 2).

Mediciones reológicas

El módulo de elasticidad y el ángulo de fase de las muestras almacenadas durante 8 semanas se midieron usando un barrido de tensión oscilante de 20 s en cada amplitud (Kinexus, Malvern, Reino Unido). La frecuencia era de 1 Hz. Se utilizó un sistema de cono y placa con un diámetro de 40 mm y un ángulo de cono de 4 grados.

Resultados de estabilidad de almacenamiento

Se determinó el tamaño de gota y se calculó el índice de emulsión a intervalos de tiempo de 5 entre 1 día y 8 semanas de almacenamiento. El tamaño de gota no mostró diferencias significativas, ni por la concentración de aceite ni por el tiempo de almacenamiento. El tamaño de gota (D43) estaba entre 34 y 39 µm para todas las muestras. Por lo tanto, las gotas se mantuvieron estables a lo largo del tiempo y no fueron susceptibles de coalescencia, floculación irreversible o maduración de Ostwald; siendo esta última seguramente improbable en este sistema debido a los tamaños de gota relativamente grandes y la escasa solubilidad de Miglyol en agua.

El índice de emulsión (IE, como se define en el experimento 2) aumentó como se esperaba con la concentración de aceite (figura 4-1). El IE estaba cerca de 1 para las muestras con un 33,3 % de aceite, es decir, la fase de emulsión ocupaba casi toda la muestra. El IE tenía una tendencia a aumentar con el tiempo de almacenamiento, al menos durante las primeras cuatro semanas, debido a las densidades coincidentes de las gotas y la fase continua. Durante las 8 semanas de almacenamiento, las gotas de la emulsión fueron estables a la coalescencia y el volumen ocluido por la fase de emulsión no se vio afectado o incluso aumentó. No hubo una diferencia significativa en el diámetro medio de gota a lo largo del tiempo o entre las concentraciones incluso después de 8 semanas de almacenamiento a 5 °C.

Resultados reológicos

Las mediciones reológicas confirmaron las diferencias observadas en la estructura de las emulsiones debido a la variación de las fracciones de volumen de fase dispersa. En la Figura 4-2, el módulo elástico se representa en función de la tensión de cizalla compleja. Hay una región elástica lineal corta seguida de una disminución rápida en tensiones de ~ 1 Pa o menos, lo que indica que las muestras tienen una estructura de gel débil. El módulo elástico G' es una medida de la cantidad de energía de la tensión de cizalla oscilante que puede almacenarse en la estructura de las muestras, y es una función de la resistencia y el número de interacciones entre los componentes de las emulsiones. Como era de esperar, cuanto mayor sea la concentración de aceite, mayor será el módulo elástico ya que hay más material que interactúa.

A medida que aumentaba la tensión de cizalla, la estructura finalmente se rompió, lo que se demostró por el cambio en el ángulo de fase. A bajas tensiones de cizalla, las muestras tenían ángulos de fase inferiores a 45°, es decir, las muestras presentaban un comportamiento más elástico. A medida que la tensión de cizalla se incrementó hasta el punto en que los geles débiles comenzaron a fluir, el ángulo de fase aumentó a más de 45°, lo que indica un comportamiento más líquido en las muestras. La Tabla 4-2 muestra que cuanto mayor es la concentración de aceite, mayor es la tensión de cizalla que puede aumentar antes de que la estructura del gel en las emulsiones se reduzca a un comportamiento similar al líquido.

Conclusiones en vista del Experimento 7

Se descubrió que las emulsiones resultantes son estables durante el almacenamiento (al menos 8 semanas) a pesar de su gran tamaño de gota. Las mediciones reológicas muestran una estructura de gel débil. Esto es importante en muchas aplicaciones en las que se desea poder elegir una consistencia final basada en la receta de la emulsión. Además, debido a la doble humectabilidad parcial de partículas adecuadas para estabilizar emulsiones, las gotas estabilizadas con partículas y los gránulos de almidón libre tienden a formar agregados débiles que les confieren una consistencia más similar a un gel. Esto es importante en muchas aplicaciones donde los productos más espesos, como las cremas, son deseables; y en nuestro caso no se requiere un modificador de viscosidad adicional para lograr una consistencia similar a la del gel.

Tabla 4-1: Diámetro medio de gota de las emulsiones estabilizadas con gránulos de almidón antes y después del

almacenamiento.

Contenido de aceite	Diámetro medio de gota D_{43} [μm]	
	1 día	8 semanas de almacenamiento 5 °C
12,5 %	36,6 \pm 1,98	37,2 \pm 0,735
16,6 %	36,9 \pm 0,240	37,1 \pm 0,219
25,0 %	35,9 \pm 0,156	34,6 \pm 0,014
33,3 %	36,4 \pm 2,16	35,2 \pm 0,502

Tabla 4-2. Los valores de la tensión de cizalla en la fase cambian de gel a líquido (ángulo de fase de 45°).

Concentración de aceite	Tensión de cizalla a 45deg (Pa)
12,5 %	0,287
16,6 %	0,334
25,0 %	0,480
33,3 %	1,10

5 Experimento 8

El objetivo fue estudiar la inversión de fase de las emulsiones estabilizadas con gránulos de almidón e identificar las condiciones relevantes para la formulación de cremas tópicas.

10 Métodos

Las emulsiones se produjeron usando Miglyol 812, tampón fosfato 5 mM pH 7 y 0,2 M NaCl, quinua, OSA 1,8 %. Las muestras se mezclaron a 22000 rpm durante 60 s. El volumen total fue de 7 ml y cada experimento se realizó por triplicado. La concentración de aceite y las concentraciones de almidón se variaron como se describe en la tabla 6-1. También se centrifugó la muestra L-M para evaluar la estabilidad y simular 8 semanas de almacenamiento. La centrifugación se realizó a 1000 g durante 81 minutos a temperatura ambiente (21 °C).

Además de estos experimentos, se usaron otros dos aceites, el de parafina y el aceite de karité, para producir emulsiones en condiciones correspondientes a la muestra M. En una prueba de clasificación sensorial ciega, 9 voluntarios evaluaron la consistencia y los parámetros de aplicabilidad de estas emulsiones y de dos productos comerciales (Vaselina y una loción para la piel).

Inversión de fase

Las muestras que contenían un 70 % de aceite eran emulsiones de agua en aceite en todas las concentraciones de almidón, mientras que, a concentraciones más bajas de aceite, se formaron emulsiones de aceite en agua (tabla 5-1).

Condiciones relevantes para la formulación de cremas

A concentraciones de aceite de 56 % o 41 %, la consistencia en términos de espesor y homogeneidad del sistema fue muy adecuada para aplicaciones tópicas de crema. Después de la centrifugación, las muestras M y N tenían una separación de fases insignificante, mientras que la muestra L estaba ligeramente separada. El tamaño de gota de la emulsión aumentó de 52,0 a 62,2 μm para la muestra L y de 33,0 a 37,3 μm para la muestra N, y no se vio afectada por la muestra M (40,8 antes y 40,5 μm después de la centrifugación). Cuando se probaron diferentes aceites, el aceite de karité que tenía propiedades similares a las de los sólidos a temperatura ambiente produjo una emulsión con una consistencia bastante espesa, mientras que el Miglyol y la parafina produjeron emulsiones más resbaladizas y ligeramente acuosas. La emulsión que contiene parafina (clasificación más alta por 1 persona de prueba) fue mejor aceptada que la emulsión de Miglyol, y la emulsión de aceite de karité fue clasificada como la mejor por 2 voluntarios. Los productos comerciales se clasificaron mejor por 2 (vaselina) y 4 (loción para la piel) voluntarios respectivamente. Esto, por supuesto, no es sorprendente, ya que contienen otros ingredientes agradables, como el perfume.

Conclusiones en vista del Experimento 8

Las muestras que contenían un 70 % de aceite o más eran emulsiones de agua en aceite en todas las concentraciones de almidón, mientras que, a concentraciones más bajas de aceite, se formaron emulsiones de aceite en agua (tabla 5-1). A las concentraciones de aceite del 56 %, la consistencia en términos de espesor y homogeneidad del sistema se consideró adecuada para aplicaciones de crema tópica. En estas condiciones, la estabilidad de las condiciones de almacenamiento forzado y cizalla durante la centrifugación fue insignificante. Entre los aceites usados al 56 % y la concentración de almidón de 214 mg/ml de aceite, todos produjeron cremas bastante bien aceptadas. Las emulsiones que contenían Miglyol o parafina eran bastante similares, aunque la parafina fue mejor aceptada que el Miglyol como fase oleosa. La emulsión de aceite de karité era más parecida a un sólido y tenía una clasificación más alta que los productos comerciales por parte de algunas personas de prueba.

Tabla 5-1. Composiciones de las muestras y tamaño de las gotas de emulsión

Muestra	Almidón [mg]	Aceite [mg]	Tampón [mg]	Aceite [%]	Almidón [mg/ml aceite]	Fase continua	Tamaño de gota D ₄₃ [µm]
A	400	1890	4710	27	200,0	Agua	35,7
B	400	2890	3710	41	130,8	Agua	51,7
C	400	3890	2710	56	97,2	Agua	61,1
D	400	4890	1710	70	77,3	Aceite	64,1
E	400	5890	710	84	64,2	Aceite	54,5*
F	200	2890	3910	41	65,4	Agua	64,6
G	200	3890	2910	56	48,6	Agua	73,9
H	200	4890	1910	70	38,7	Aceite	55,5
I	600	2890	3510	41	196,2	Agua	31,7
J	600	3890	2510	56	145,8	Agua	43,5
K	600	4890	1510	70	116,0	Aceite	58,9
L	400	3890	2710	56	97,2	Agua	52,0
M	856	3890	2254	56	214	Agua	40,8
N	642	2890	3468	41	214	Agua	33,0

* Medido a partir de micrografías (todas las demás muestras medidas con Coulter LS130)

Experimento 9

5 En el experimento 9 se estudió la mejora de la permeabilidad de una sustancia química lipofílica en la piel mediante el uso de emulsiones estabilizadas con gránulos de almidón.

Métodos

10 Las emulsiones se produjeron usando tampón de fosfato 5 mM pH 7 y 0,2 M NaCl, quinua, OSA 1,8 % y Miglyol 812, parafina o aceite de karité. Las muestras se mezclaron a 22000 rpm durante 60 s. Las emulsiones contenían un 56 % de aceite y 214 mg de almidón/ml de aceite (correspondiente a la muestra M en el experimento 8). El volumen total fue de 7 ml y cada experimento se realizó por triplicado. El salicilato de metilo, disuelto en la fase oleosa, se usó como sustancia de control para estudiar la permeabilidad en la piel.

20 La medición de la difusión cutánea se realizó en una celda de flujo controlando el transporte de salicilato de metilo desde las tres formulaciones tópicas diferentes a través de la membrana de piel de cerdo y la membrana de silicona bajo un flujo de tampón de fosfato con pH 6,8. Los experimentos de difusión se realizaron en células de difusión de siete cámaras a 32 °C y la fase donadora y receptora se separó por una membrana con un área de difusión de 0,64 cm² (9 mm Ø). Aproximadamente 1 g de las emulsiones (fase donante) se extendieron uniformemente sobre las membranas. Las células se cubrieron con parafilm para evitar la evaporación. El tampón fluyó a través de la bomba (IsmatecIPN-16, L852) con un flujo de 2 ml/h. Las muestras se recogieron cada dos horas durante 12 horas y se analizaron usando un espectrofotómetro (Varian Carry 50Bio) a la longitud de onda de detección del salicilato de metilo (302 nm).

Penetración cutánea in vitro

30 Durante la penetración cutánea in vitro, el flujo en estado estacionario fue de alrededor de 8 µg / (cm² * h) para las tres formulaciones. Este flujo es casi el doble de lo que se había observado previamente en una configuración experimental similar usando soluciones tampón de la misma concentración de salicilato de metilo. Esto indica que fue la presencia del sistema de emulsión lo que aumentó la penetración sobre la piel. Inicialmente, el flujo de penetración disminuyó con el tiempo (figura 5-1), lo que podría deberse al agotamiento de las gotas de aceite más cercanas a la piel. En sistemas de alta viscosidad como el nuestro, la difusión de las gotas de aceite se ve obstaculizada y, por lo tanto, habrá un gradiente de concentración y se formará una región de estado estacionario.

Conclusiones en vista del Experimento 9

40 No hubo diferencias en la penetración cutánea in vitro entre los tres aceites usados, lo que indica que el sistema como tal proporcionó una penetración bastante alta de 8 µg/(cm²*h). Por lo tanto, las similitudes en términos, por ejemplo, del tamaño de gota de aceite y las partículas utilizadas para la estabilización eran más importantes que las propiedades reológicas y las propiedades individuales de estos aceites bastante diferentes (ver experimento 8) para el uso de emulsiones Pickering de almidón como sistema tópico de administración de fármacos.

Experimento 10

45 En el experimento 10, se muestra el control de las propiedades de reología y de flujo de las emulsiones estabilizadas con gránulos de almidón cambiando la proporción de almidón a aceite. El almidón se aisló de Quinoa (Biofood,

Suecia) mediante un proceso de molienda en húmedo y se modificó con OSA al 2,9 % (como se describe en el experimento 1). La fase continua de las emulsiones fue un tampón de fosfato 5 mM con pH 7 con 0,2 M NaCl, y la fase dispersa fue Miglyol 812. Las emulsiones se prepararon usando un mezclador de alta cizalla Ystral a 22000 rpm durante 30 s. Las distribuciones del tamaño de la gota se determinaron usando difracción láser como se describe en el experimento 1 y se muestran en la tabla 6-1 como media de superficie D_{32} y modo de la distribución.

Las muestras de emulsión para la caracterización reológica se prepararon para contener la misma cantidad total de fases dispersas (el aceite y el almidón juntos representan el 40 % de la emulsión) a tres relaciones de almidón a aceite: 143 mg/ml de aceite (366 mg de almidón y 2,56 ml de aceite), 214 mg/ml de aceite (526 mg de almidón y 2,46 ml de aceite) y 1143 mg/ml de aceite (1841 mg de almidón y 1,61 ml de aceite), toda la emulsión tenía 4,2 ml de tampón que producía 7 ml en total. Esta cantidad fue elegida para rellenar completamente el espacio. Todas las muestras se prepararon y midieron por duplicado.

Mediciones reológicas

Las mediciones reológicas se realizaron en un reómetro (Malvern Kinexus, Inglaterra) 24 h después de la preparación. Las características de las emulsiones se analizaron a la temperatura de $25 \pm 0,1$ °C usando una geometría de placa de placa dentada (placa superior de 40 mm de diámetro, placa inferior de 65 mm de diámetro, altura de ranura 1,0 mm). Todos los experimentos se realizaron en muestras duplicadas. Se realizaron mediciones oscilatorias para determinar la región viscoelástica lineal de la muestra (barrido de amplitud). Se investigaron los ángulos de fase, la viscosidad de cizalla (η , Pa s) y los módulos de almacenamiento (G' , Pa) y de pérdida (G'' , Pa). La prueba oscilatoria se realizó en el intervalo de tensión de cizalla de 0,001-1000 Pa a una frecuencia de 1 Hz.

Resultados reológicos

Las tres muestras exhibieron un comportamiento viscoelástico, con una región elástica lineal corta en un rango de deformación de 0,0001 a 0,002 seguido de una disminución rápida a medida que la estructura se descomponía. La dependencia de cizalla del módulo elástico de las tres emulsiones ensayadas se muestra en la figura 6-1. Estas relaciones particulares de almidón a aceite se eligieron ya que están por debajo, a, y muy por encima de la concentración de almidón neutro de flotación de 214 mg/ml de aceite (como se discutió en el experimento 1). Se midieron las propiedades reológicas en la región lineal y la tensión de cizalla en el ángulo de fase de 45° (el punto en el que la estructura se rompe) y se muestra en la tabla 6-1 para las 3 condiciones ensayadas. El módulo elástico G' es una medida de la cantidad de energía de la tensión de cizalla oscilante que puede almacenarse en la estructura de las muestras, y es una función de la resistencia y el número de interacciones entre los componentes de las emulsiones. Como era de esperar, la emulsión con la relación más alta de almidón a aceite también tiene el módulo de elasticidad más grande, ya que había más superficie de interacción en la emulsión puesto que hay tanto un tamaño de gota pequeño como un exceso de almidón. Sin embargo, puede haber varias contribuciones al módulo más alto de la emulsión de gota más pequeña. Con el aumento de la superficie total de la fase dispersa, las interacciones atractivas observadas en la agregación de los gránulos de almidón serían más prominentes. La mayor presión de Laplace de gotas más pequeñas conduce a una menor deformabilidad de las gotas y, por lo tanto, a un módulo más alto. Además, a medida que se comparan los módulos a la suma constante de los volúmenes de fase dispersa de aceite y almidón, el sistema se vuelve más rígido con la parte creciente de los gránulos de almidón completamente indeformables.

Conclusiones en vista del Experimento 10

Las emulsiones producidas por homogeneización de alta cizalla tenían tamaños de gota de 9 a 70 μm dependiendo de la proporción de almidón a aceite. La caracterización reológica indicó una estructura de gel con un módulo elástico en el rango de 200 a 2000 Pa dependiendo del tamaño de la gota. Esta es una característica útil que permite el ajuste de las propiedades de flujo sin la adición de modificadores de la viscosidad.

Tabla 6-1: Propiedades reológicas de las emulsiones estabilizadas con almidón en diversas proporciones de almidón a aceite

	143 mg almidón/ml aceite	214 mg almidón/ml aceite	1143 mg almidón/ml aceite
G'_0 (Pa) en región lineal	223 ± 58.6	423 ± 12.7	2570 ± 69.4
G''_0 (Pa) en región lineal	9.81 ± 3.24	20.4 ± 1.92	352 ± 38.6
η_0 (Pa s) en región lineal	35.6 ± 9.32	67.4 ± 2.04	415 ± 14.5
Y^* (deformación) en ángulo de fase 45°	4.47 ± 1.01	2.55 ± 0.0667	0.761 ± 0.0263
G' (Pa) at phase angle 45°	26.5 ± 0.756	81.1 ± 4.40	220 ± 26.7
d_{32} (mm)	13.8 ± 0.831	10.2 ± 0.591	5.73 ± 0.919
Modo (mm)	33.7	25.9	9.65
media \pm desviación estándar, $n=2$.			

Experimento 11

En el experimento 11 se ha estudiado la capacidad de los gránulos de almidón para estabilizar la fase externa de las

emulsiones dobles (W/O/W), y se ha demostrado la eficacia de encapsulación de dichas emulsiones dobles.

Se produjo una emulsión interna continua de aceite Ei emulsionando una fase acuosa consistente en 1,4 ml de solución de 0,1M NaCl con 1,4 µL de colorante rojo alimentario de uso doméstico (Ekströms/Procordia, Eslöv, Suecia) en una fase oleosa consistente en 5,6 ml de Miglyol y 0,28 g de tensioactivo de polirricinoleato de poliglicerol (Grindstedt PGPR90, Danisco, Copenhagen, Dinamarca) utilizando el mezclador Ystral X10 con una herramienta de dispersión de 6 mm a 24000 rpm durante 10 min. La emulsión Ei resultante tenía un tamaño de gota de $1,17 \pm 0,13$ µm (desviación estándar $D_{43} \pm$), medida por el Malvern Mastersizer 2000S.

Se prepararon emulsiones de Pickering dobles con 20 % de la emulsión interna Ei y 80 % de una fase continua (tampón de fosfato 5mM con pH 7,0 0,2 M NaCl) que contenía 214 mg/ml de aceite de 1,8 % de almidón de quinua modificado con OSA en el mezclador Ystral X10 a 22000 rpm durante 30 s.

La emulsión doble resultante tenía un tamaño de gota de 48 ± 10 µm ($D_{43} \pm$ desviación estándar).

La estabilidad de encapsulación de la emulsión doble durante el almacenamiento se evaluó espectrofotométricamente a 520 nm desde la filtración del colorante a la fase acuosa externa después de diferentes tiempos, como se muestra en la Tabla 7-1.

Tabla 7-1: Filtración del colorante en la fase acuosa externa (5) después de diferentes tiempos de almacenamiento. (% de filtración y desviación estándar)

Tiempo de almacenamiento (días)	Filtración (%)	Desviación Estándar
0	0,14	0,20
7	0,21	0,19
14	0,37	0,16
21	0,49	0,17
30	1,00	0,23

Conclusiones en vista del experimento 11

Se demostró el uso satisfactorio de gránulos de almidón para estabilizar emulsiones dobles. Se estudió la eficacia de encapsulación de las emulsiones y se mantuvo excelente durante el almacenamiento. Tales emulsiones dobles podrían ser adecuadas para la encapsulación de sustancias solubles en agua en alimentos y formulaciones farmacéuticas.

Experimento 12

En el experimento 12 se estudió la excelente estabilidad de las emulsiones estabilizadas con almidón y emulsiones dobles a la congelación y descongelación.

Experimental

Se usó almidón granular pequeño modificado con OSA preparado como en el experimento 1. La fase continua fue un tampón de fosfato 5 mM con pH 7 con 0,2 M NaCl, las fases dispersas fueron el aceite de triglicéridos de cadena media Miglyol 812 (Sasol, Alemania) o manteca de karité (sólida a temperatura ambiente). Las emulsiones se prepararon en tubos de vidrio con un volumen total de 6 ml basándose en 2 recetas diferentes (7 % y 33 % de aceite) y 214 mg de almidón por ml de aceite. Después de la adición de almidón a los tubos, se añadió tampón y se mezcló durante aproximadamente 5 segundos usando el mezclador vortex (VM20, Chiltern Scientific Instrumentation Ltd, Reino Unido). A continuación, se añadió el aceite y se mezcló con el mezclador Ystrol (D-79282, Ballrechten-Dottingen, Alemania) a 11000 rpm durante 30 segundos. La manteca de karité se derritió en un baño de agua antes de la emulsificación. Algunas de las emulsiones se trataron térmicamente a 70 °C durante 1 minuto en un baño de agua. Las emulsiones se almacenaron a temperatura ambiente durante 24 h antes de experimentos adicionales.

Las muestras de emulsión se congelaron en bandejas de aluminio sumergiendo las bandejas en nitrógeno líquido antes del almacenamiento en el congelador. Las muestras se produjeron por duplicado para estudiar la reproducibilidad. Las muestras se descongelaron al día siguiente para realizar análisis adicionales de tamaño de partícula y análisis de forma (microscopía) como se describe en el experimento 1. Para emulsiones no calentadas con 7 % de muestras de Miglyol, se evaluó un segundo método de congelación utilizando un congelador de laboratorio (Frigoscandia, Suecia).

La distribución del tamaño de partícula de las emulsiones antes de la congelación y después de la descongelación se analizó como se describe en el experimento 2 y mediante el uso de imágenes de microestructura como se describe en el experimento 1.

Se prepararon emulsiones dobles como se describe en el experimento 11 con la diferencia de que el aceite de Miglyol se reemplazó por manteca de karité. La estabilidad a la congelación y descongelación de las emulsiones dobles se analizó como se describió anteriormente usando el método de congelación con nitrógeno líquido.

Resultados

Las emulsiones fueron estables a la congelación y descongelación, D_{43} antes de congelar las emulsiones estabilizadas con almidón con un 7 % de Miglyol era de 50,5 μm , después de la congelación y descongelación a chorro D_{43} fue de 49,8 y después de la congelación en nitrógeno líquido y descongelación de 56,9 μm . La forma de gota conservada se vio claramente bajo el microscopio (véase la Figura 7-1). El tratamiento térmico causó un ligero aumento en el tamaño de gota debido al hinchamiento del almidón y la gelatinización parcial y también aumentó la agregación de gotas. Las emulsiones dobles no tratadas térmicamente también mostraron una estabilidad excelente a la congelación y descongelación (Figura 7-2), aunque la agregación de gotas se incrementó como se ve a partir de las curvas de distribución del tamaño de partícula (Figura 7-3). Para las emulsiones dobles tratadas térmicamente, la distribución del tamaño de gota no se vio afectada por la congelación y descongelación, aunque esto indicaba un colapso de las gotas más grandes (Figura 7-3). La estabilidad de congelación y descongelación es importante para la calidad del producto donde los productos están expuestos a un intervalo de temperaturas, etc.

Conclusiones en vista del Experimento 12

Las emulsiones estabilizadas con almidón y las emulsiones dobles se pudieron congelar y descongelar conservando una estructura de gotas de emulsión. El uso de diferentes fases oleosas, emulsiones tratadas térmicamente o no calentadas, o diferentes métodos de congelación, produjeron emulsiones con una estabilidad de congelación y descongelación altamente aceptable.

Experimento 13

En el experimento 13, las emulsiones se secaron produciendo un polvo lleno de aceite.

Experimental

Liofilización: Se prepararon emulsiones y se congelaron como se describe en el experimento 12. Las bandejas de muestra se cubrieron con papel de aluminio perforado. Las emulsiones utilizadas contenían aceite Miglyol o manteca de karité en forma de fase dispersa a concentraciones del 7 % (no tratadas térmicamente o tratadas térmicamente) o del 33 % sin tratamiento térmico. Las muestras congeladas se transfirieron a un liofilizador de laboratorio (Labconco Freeze Drier, Ninolab USA). El liofilizador se enfrió previamente a menos 50 °C y las muestras se secaron durante 52 h.

Secado por pulverización: Las emulsiones se prepararon mezclando almidón granular pequeño y tampón como en el experimento 1 con manteca de karité templada usando un mezclador Sorval Mixer a 1800 rpm durante 5 minutos. Las proporciones utilizadas fueron 7 % de aceite y 600 mg de almidón/g de aceite. Las emulsiones se trataron con calor a 70 °C durante 1 minuto. La temperatura de entrada del secador por pulverización era de 130 °C y la velocidad de la bomba estaba establecida en 50.

La distribución del tamaño de partícula de las emulsiones antes de la congelación y después del secado se analizó como se describe en el experimento 2 y mediante el uso de imágenes de microestructura como se describe en el experimento 1. El polvo seco se analizó después de la rehidratación en tampón. Los polvos secos se recubrieron por pulverización con oro y las imágenes se registraron en un microscopio electrónico de barrido (SEM, FegSEM, JEOL modelo JSM-6700F, Japón) operado a 5 kV y una distancia de trabajo de 127 a 8 mm.

Resultados

Se obtuvieron emulsiones secas, es decir, polvos, por liofilización y secado por pulverización. El tratamiento térmico antes del secado dio como resultado la formación de una capa cohesiva altamente estable de almidón parcialmente gelatinizado, que aumentó la estabilidad de las gotas durante el almacenamiento y el procesamiento. Esta capa era más importante en el caso de la fase dispersa líquida ya que el estado físico de la fase dispersa (líquido/sólido) afectaba a la estabilidad de las emulsiones a través del secado. Las gotas de emulsión más pequeñas se conservaron mejor después del secado y la rehidratación, mientras que las gotas más grandes fueron generalmente más susceptibles a la desestabilización. Las gotas de emulsión seca mostraron un aumento en la distribución del tamaño total debido a la agregación parcial.

Se obtuvieron gotas intactas de emulsiones tratadas térmicamente que contenían aceite líquido (Miglyol) después del secado (véase la Figura 8-1). Se obtuvo una capa cohesiva de almidón mediante el tratamiento térmico que protegía las gotas de aceite durante la liofilización. Las gotas parcialmente colapsadas dejaron bolsas vacías de la capa de almidón. Hubo una gran variación de tamaño de gota y cierta agregación. Las emulsiones no tratadas térmicamente que contenían aceite líquido colapsaron durante el secado. Se obtuvieron gotas intactas de emulsiones tratadas térmicamente que contenían aceite sólido (manteca de karité), como se ve en la Figura 8-2 (emulsión no calentada) y la Figura 8-3 (tratada térmicamente antes del secado). Después del liofilizado de las emulsiones no tratadas térmicamente, se obtuvieron gotas secas, así como también aceite libre. Se observaron gránulos de almidón en la superficie de las gotas. El tratamiento térmico antes de la liofilización dio como resultado gotas más intactas después del secado. También se obtuvieron gotas intactas mediante secado por pulverización, como se ve en la Figura 8-4. Las esferas cubiertas de almidón llenas de aceite permanecieron intactas después del secado por pulverización, aunque también había almidón libre presente ya que se añadió almidón en exceso a 600

mg/g de aceite.

La agregación de gotas, especialmente después de la rehidratación de emulsiones secas tratadas térmicamente antes del secado, se confirmó mediante las curvas de distribución del tamaño de partícula (véase la Figura 8-5). Las curvas de distribución del tamaño de partícula mostraron resultados similares para las emulsiones liofilizadas y las emulsiones dobles liofilizadas (Figura 8-5) con manteca de karité como fase oleosa (las emulsiones fueron tratadas térmicamente antes del secado).

Experimental

Conclusiones en vista del Experimento 13

Las emulsiones estabilizadas con almidón se podrían secar tanto por liofilización como por secado por pulverización. Las emulsiones fueron más estables al secado cuando se trataron térmicamente después de la emulsificación, causando una gelatinización parcial del almidón. Esto fue especialmente importante al secar el aceite líquido. Los polvos resultantes llenos de aceite tenían muchas propiedades atractivas, incluida la capacidad de frotarse fácilmente en la piel, dando una sensación de suavidad sin residuos visibles. Este aspecto puede ser útil en muchos productos, como los cosméticos y los sistemas de administración tópica.

Experimento 14

En este experimento, la barrera de almidón se varió por hinchamiento y gelatinización de gránulos de almidón después de la emulsificación. El método pH-stat se utilizó como una forma de controlar la velocidad de lipólisis con el fin de utilizarla como un medio para comparar las propiedades de barrera relativas entre las emulsiones estudiadas. La hinchazón y la gelatinización del almidón se producen durante el calentamiento en presencia de agua.

La digestión de lípidos es un proceso interfacial que implica la interacción de la enzima lipasa y sus cofactores con la superficie de las gotas, de forma que la enzima puede entrar en contacto cercano con su sustrato. Por esta razón, el área interfacial, es decir, el área de superficie específica de la emulsión es importante y viene dada por:

$$S = \frac{6\Phi}{D_{32}}$$

Donde S es el área superficial por unidad de volumen de emulsión (m^2), Φ es la fracción volumétrica de aceite, y D_{32} es el diámetro medio de Sauter. S se usa para escalar los resultados de la actividad general para tener en cuenta la diferente cantidad de área de superficie en las diversas muestras. El método pH-stat para monitorizar la liberación de ácidos grasos libres (AGL) para describir la velocidad de digestión es un método fisicoquímico in vitro bien conocido para evaluar los efectos de las composiciones y la estructura de los alimentos y los productos farmacéuticos sobre la velocidad y el grado de la digestión de lípidos. La generación de AGL se controla en el pH-stat midiendo el consumo de NaOH requerido para mantener un pH dado (en este caso 7,0), la velocidad de liberación (escalada por el área superficial del aceite) es la actividad de la enzima. La cuantificación de las propiedades de barrera de la capa de almidón, una interfase de aceite fácilmente accesible (sin barrera) se mide, estableciendo la actividad de la lipasa al 100 %. Luego se compara la disminución relativa de la actividad de las emulsiones estabilizadas con gránulos de almidón partiendo de la premisa de que el consumo de NaOH es proporcional a la velocidad de liberación de AGL si se escala por el área interfacial S de la emulsión ensayada. Cuanto menor es la velocidad de lipólisis, mejor protegido está el aceite por la capa de almidón parcialmente gelatinizado y mejores son las propiedades de barrera.

Métodos

Se aisló almidón granular pequeño y se modificó con OSA como se describe en el experimento 1. La fase continua fue un tampón de fosfato con pH 7 con 0,2 M NaCl, la fase dispersa fue el aceite de triglicéridos de cadena media Miglyol 812 (Sasol, Alemania).

El ensayo utilizado en la lipólisis fue un tampón con NaTDC 4 mM (sal biliar), Tris-Maleat 1 mM, CaCl_2 1 mM y NaCl 150 mM. La lipasa y la colipasa se usaron como enzimas para la digestión de la fase oleosa.

Emulsificación

Las emulsiones se prepararon en tubos de ensayo de vidrio con 2,7 ml de la fase continua, 0,3 ml de la fase oleosa y 22,5-180 mg de almidón mediante la mezcla con un Ystrol (D-79282, Ballrechten-Dottingen, Alemania) a 22000 rpm durante 30 s. Se preparó un segundo conjunto de emulsiones de la misma manera usando un 7 % de fase oleosa y 214 mg de almidón por ml de aceite para calentar a diferentes temperaturas.

Tratamientos térmicos de las emulsiones

El primer conjunto de emulsiones se trató térmicamente en un baño de agua a 73 °C. Las muestras se mantuvieron por encima de 70 °C durante 1 minuto y el tiempo total de calentamiento fue de aproximadamente 3 minutos. Después de que las muestras se habían enfriado a 40 °C, las emulsiones se agitaron en un mezclador vortex durante 5 s. El segundo conjunto de emulsiones se trató térmicamente como se describe a temperaturas que varían de 45 a 100 °C.

Mediciones del tamaño de las partículas

Se midieron las distribuciones de tamaño de partícula de las partículas de almidón y de las gotas de emulsión como se describe en el experimento 1 para concentraciones de almidón variadas y como en el experimento 2 para temperaturas variadas. El tamaño de la gota se midió antes y después de la lipólisis.

Métodos de pH-stat

La actividad de la lipasa y la colipasa se determinó por titulación pH-stat usando un Radiómetro modelo TIM854 (Analytical SAS, Cedex, Francia). La muestra, emulsión o control, se mezcló con 15 ml de tampón de ensayo y 3 µl de cada una de las soluciones que contenían lipasa (1 mg/ml) y colipasa (1 mg/ml). El pH se mantuvo a 7,0 mediante titulación de NaOH 0,1 M y el consumo (µmol/min) a los 18 min se tomó como actividad de lipasa y colipasa. La actividad de la lipasa se determinó como la cantidad de NaOH añadido para mantener el pH a 7 durante la lipólisis, ya que los AGL liberados por la lipasa reducían el pH. La liberación media de AGL por minuto entre 15 y 18 minutos después de la adición de las enzimas se utilizó como la velocidad de lipólisis.

Preparación de controles

La actividad del aceite sin la presencia de almidón se controló usando emulsiones estabilizadas por Tween 20. Se usó una cantidad apropiada de Tween 20 para producir gotas de aceite en el intervalo de tamaño de las gotas estabilizadas con almidón, es decir, 10-20 µm. El efecto del tratamiento térmico de las emulsiones se controló usando una emulsión no calentada con la misma composición que las correspondientes emulsiones calentadas. Además, se usó un control con tampón de fase continua y almidón, calentado como las emulsiones, para verificar la actividad del almidón.

Microscopía

La inspección y formación de imágenes de la microestructura de las emulsiones se realizó antes y después de la microscopía de tratamiento térmico descrita en el experimento 1, con la modificación de que la luz también se transmitió usando un filtro de polarización (U-ANT, Olympus) y que las muestras se colocaron en un portaobjetos microscópico y se estudiaron inmediatamente sin cubierta de vidrio. Las imágenes se procesaron utilizando el programa de procesamiento de imágenes Java ImageJ (versión 1.42m).

Resultados en vista del Experimento 14

El tamaño de gota disminuyó con una mayor cantidad de almidón añadido (véase la tabla 8-1) y el tamaño de gota no se vio afectado por la lipólisis después de 30 minutos.

Tabla 8-1. Tamaño de gota y actividad de la lipasa para emulsiones tratadas térmicamente

Almidón (mg/ml de aceite)	D ₃₂ (µm)	Área de superficie específica	Actividad (µmol/min)	Actividad/S	Actividad/S (% de máx.)
75	47,54	6,33E-03	5,31E-05	8,39E-03	68 %
150	39,00	7,69E-03	4,04E-05	5,25E-03	43 %
225	33,49	8,96E-03	4,65E-05	5,19E-03	42 %
300	28,15	1,07E-02	4,86E-05	4,56E-03	37 %
600	22,21	1,35E-02	5,73E-05	4,24E-03	34 %

La emulsión no calentada no tuvo ningún efecto sobre la lipólisis en comparación con la emulsión con Tween20 como emulsionante y estabilizador de gotas. La actividad de la lipasa disminuyó solo en las emulsiones calentadas debido a la gelatinización parcial de los gránulos de almidón, como se puede ver en la figura 9-1. Los gránulos gelatinizados crearon una capa más impermeable alrededor de las gotas que difiere de los distintos gránulos en la superficie de la gota en las emulsiones no calentadas. Sin embargo, los gránulos no se gelatinizaron completamente durante el tratamiento térmico, lo que se muestra por el patrón polarizado del almidón más cercano a la interfase de la gota en la figura 9-1 (imagen inferior). Aunque el límite entre los gránulos individuales se vuelve difuso, todavía queda un cierto grado de partículas intactas en la interfase oleosa. Esto podría dar como resultado un mecanismo de estabilización de partículas mantenido mientras que al mismo tiempo se consigue una capa externa cohesiva densa en la fase acuosa que da lugar a las propiedades de barrera mejoradas observadas en las emulsiones estabilizadas con almidón tratadas térmicamente. Esta mejora de la barrera aumentó con el rango de temperatura estudiado como

se ve por la disminución de la actividad de la lipasa (véase la Figura 9-2).

Conclusiones en vista del Experimento 14

La barrera de los gránulos de almidón en la interfase de gota se puede mejorar calentando la emulsión y gelatinizando así parcialmente los gránulos. Esta barrera mejorada obstruye la lipasa para alcanzar y digerir el aceite. La actividad de la lipasa disminuye al menos en un 60 % en comparación con la actividad en una emulsión no calentada, lo que indica que el calentamiento puede lograr una capa cohesiva de almidón que es útil para mejorar o ajustar las propiedades de barrera para aplicaciones de encapsulación.

Experimento 15

En el experimento 15, se demuestra la encapsulación de diferentes sustancias en emulsiones estabilizadas con almidón y emulsiones dobles.

Experimental

Se usó almidón granular pequeño modificado con OSA preparado como en el experimento 1. La fase continua fue un tampón de fosfato de 5 mM con pH 7 con 0,2 M NaCl. A continuación, se describen la fase oleosa y el método de emulsificación para cada sustancia encapsulada.

Salicilato de metilo (encapsulación en la fase oleosa)

El salicilato de metilo se usa en productos farmacéuticos como analgésico, pero también se usa en alimentos como un agente aromatizante ya que tiene olor y sabor a menta. Sin embargo, es bastante tóxico, LD₅₀=500 mg/kg para humanos adultos, y por lo tanto se usa en concentraciones muy bajas. La naturaleza aromática de la sustancia permite detectar mediante espectroscopía fotográfica a una longitud de onda de 302 nm.

Se disolvió salicilato de metilo (n.º de CAS 119-36-8) en manteca de karité durante la agitación a 50 °C usando la concentración 50 µL/g de aceite. El almidón (500 mg/g de aceite), el tampón y la manteca de karité fundida (33 %) con salicilato de metilo se emulsionaron luego en lotes de 50 g usando un mezclador Sorvall (nivel 8, 2 min) en un baño de agua a 40 °C. Las emulsiones adicionales se liofilizaron como se describe en el experimento 13. El salicilato de metilo también se encapsuló en la fase oleosa usando tres aceites diferentes y se emulsionó como se describe en el experimento 9. La sustancia encapsulada no alteró la distribución del tamaño de gota ni la apariencia visual de las gotas.

Sabor (encapsulación en la fase oleosa)

Se emulsionaron almidón (500 mg/g), tampón y manteca de karité (56 %) con unas pocas gotas de un agente aromatizante de almendra común para uso alimentario utilizando un mezclador Sorvall como se describió anteriormente. La emulsión resultante tenía propiedades de crema como se describe en el Ejemplo 8 y tenía un aroma de almendra que estaba más expuesto cuando la crema se aplicaba sobre la piel. Después de 1 semana de almacenamiento, el olor a almendra todavía era detectable, aunque con una intensidad reducida.

Penicilina (encapsulación en la fase acuosa interna de una emulsión doble)

El ingrediente activo de kávepenin, fenoximetilpenicilina (penicilina V), es una penicilina (fármaco antibacteriano) que evita que las bacterias construyan una pared celular normal. Se prepararon emulsiones dobles como se describe en el experimento 11 con la modificación de que la concentración de almidón era de 500 mg/ml de aceite, y que Kávepenin se añadió a la fase acuosa interna a una concentración de 62,5 mg/ml. Las emulsiones se centrifugaron luego a 1000 g durante 5 min (Beckman Coulter, Allegra® X-15R, L 284, Inglaterra), se eliminó la fase acuosa y la emulsión se lavó con 5 ml de tampón. Este procedimiento se repitió 5 veces. Como se demostró anteriormente en el experimento 11, es posible producir emulsiones dobles con un alto grado de eficacia de encapsulación y baja filtración. Por esta razón, las emulsiones de lavado son útiles para eliminar la pequeña cantidad de fase acuosa interna que puede haberse filtrado durante la etapa de emulsión inicial, causando sabores u olores desagradables. Esto es particularmente útil para los antibióticos orales de sabor amargo, especialmente en formulaciones líquidas para niños donde la observancia es un gran problema. Este aspecto se demuestra adicionalmente en el experimento 16. El tamaño de gota no fue alterado por el procedimiento de lavado (D₄₃ fue inicialmente de 30,4 µm, después de lavado 1:30,4, lavado 2:42,5, lavado 3:34,7, lavado 4:42,9 y lavado 5:41,6 µm).

Colorantes (encapsulación en la fase acuosa interna de una emulsión doble)

Se encapsularon diferentes colorantes en la fase acuosa interna de emulsiones dobles. Se encapsuló un colorante alimenticio como se describe en el experimento 11 que muestra una excelente eficacia de encapsulación y estabilidad de almacenamiento. Estas emulsiones se congelaron adicionalmente en nitrógeno líquido y se descongelaron como se describe en el experimento 12, o se liofilizaron como se describe en el experimento 13 con

un grado de encapsulación mantenido aceptable. El azul de Coomassie se encapsuló usando el mismo método, pero con una concentración de almidón de 500 mg/ml de aceite. La sustancia encapsulada no alteró la distribución del tamaño de gota o la apariencia visual de las gotas de doble emulsión.

- 5 La vitamina B12 también se encapsuló usando el método descrito para azul de Coomassie.

Conclusiones en vista del Experimento 15

- 10 Las sustancias se pueden encapsular eficazmente en la fase oleosa de emulsiones con buena estabilidad. Las sustancias solubles en agua se pueden encapsular en emulsiones dobles con partículas de almidón que estabilizan la emulsión externa. Estos experimentos muestran la idoneidad de las gotas de emulsión estabilizadas por gránulos de almidón para la encapsulación de ingredientes o sustancias activas en alimentos y productos farmacéuticos.

Experimento 16

- 15 En el experimento 16, se estudió un método para lograr una supresión de sabores desagradables en emulsiones dobles con penicilina encapsulada, y en emulsiones calentadas y no calentadas usando aceite de pescado como fase dispersa. El aceite de pescado contiene ácidos grasos omega-3 y, en general, se considera que posee beneficios para la salud, aunque es muy susceptible a la oxidación, causando sabores desagradables. También se sabe que la penicilina causa mal sabor, tal como un sabor amargo altamente detectable.

Experimental

Penicilina

- 25 Se prepararon y lavaron emulsiones dobles estabilizadas con almidón y penicilina (Kåvepenin) como se describe en el experimento 15. Se realizó un análisis sensorial antes y después del lavado. Los parámetros sensoriales se evaluaron mediante una pequeña cantidad de la doble emulsión que se aplicó en la lengua y luego se ingirió. Se realizó una curva sensorial estándar con solo tampón y Kåvepenin a diferentes concentraciones para detectar el límite sensorial del panelista.

Aceite de pescado

- 35 Se usó almidón granular pequeño modificado con OSA preparado como en el experimento 1. La fase continua fue un tampón de fosfato de 5 mM con pH 7 con 0,2 M NaCl. La fase oleosa era un aceite de pescado comercial (Eskimo-3 Pure, Green Medicine AM, Malmö, Suecia). Se realizó la emulsificación usando 500 mg de almidón/ml de aceite y un 10 % de fase oleosa, tal como se describe en el experimento 1. Algunas de las emulsiones se trataron luego térmicamente en un baño de agua a 70 °C durante 1 minuto. Las emulsiones se sellaron y almacenaron a 5 °C durante 1 semana. La estabilidad de la emulsión se observó inmediatamente después de la preparación de la muestra y una semana después. El análisis de microscopía y distribución de tamaño de partícula se realizó como se describe en el experimento 2. Un análisis sensorial fue realizado por una persona. Los parámetros sensoriales se evaluaron a partir de una pequeña cantidad de la emulsión aplicada en la lengua y luego ingerida.

Resultados penicilina

- 45 El límite de detección por parte de los voluntarios de Kåvepenin en tampón fue inferior a 10 mg/ml según la curva estándar. No se detectó sabor de Kåvepenin a partir de emulsiones dobles que contenían aproximadamente 6 veces esta concentración. El lavado no produjo diferencias en el sabor de la emulsión doble.

Aceite de pescado

- 55 Se formaron emulsiones estabilizadas con almidón (véase la Figura 10-1), y las gotas de la emulsión fueron estables al tratamiento térmico y al almacenamiento. Las emulsiones no tratadas térmicamente eran blancas, mientras que las emulsiones tratadas térmicamente tenían un color ligeramente amarillo antes y después del almacenamiento. El almacenamiento durante 1 semana no alteró la distribución del tamaño de partícula. La emulsión no calentada tenía un sabor muy fuerte del aceite de pescado. La emulsión calentada tenía un sabor más suave con respecto al aceite de pescado.

Conclusiones en vista del Experimento 16

- 60 Se demostró una supresión del sabor desagradable y fue altamente eficaz cuando se encapsuló la penicilina. Las emulsiones estabilizadas con almidón podían prepararse también con aceite de pescado. El aceite de pescado no afectó negativamente la estabilidad de las emulsiones. Las emulsiones estabilizadas con almidón pueden ser adecuadas para la encapsulación de ingredientes o sustancias con sabor indeseable en alimentos y productos farmacéuticos.

Experimento 17

En el experimento 17 se han usado gránulos de almidón para estabilizar la espuma.

- 5 La fase oleosa en este experimento fue la grasa de karité (AAK, Suecia), los gránulos de almidón se aislaron de la quinua y se hicieron más hidrofóbicos mediante la modificación con OSA al 2,9 % (como se describe en el experimento 2), y la fase continua fue de tampón de fosfato de 5 mM a pH 7 y 0,2 M NaCl. La manteca de karité se fundió a 60 °C antes de la homogeneización en un mezclador Sorvall Omni a nivel 8 durante 5 minutos usando una unidad de dispersión de 300 ml. El soporte más grande permitió que el aire se succionara en las fases líquidas
- 10 durante la mezcla mediante un vortex en la superficie del líquido. De esta forma, se formaron burbujas y gotas estabilizadas con partículas.

Resultado del experimento 17

- 15 Se produjo una estructura rígida similar a la espuma con una densidad similar a la de la nata montada. Era sólida y se podía cortar en una pieza como la que se muestra en la figura 11-1. Esta espuma tampoco se modificó después de más de un mes de almacenamiento.

Conclusiones en vista del Experimento 17

- 20 Se ha demostrado el uso satisfactorio de gránulos de almidón para estabilizar la espuma. La estructura resultante podría resultar atractiva para varias aplicaciones cosméticas y alimentarias.

REIVINDICACIONES

1. Una emulsión o una espuma estabilizadas con partículas que comprende al menos dos fases y partículas sólidas, en donde dichas partículas sólidas son gránulos de almidón y dichos gránulos de almidón o una parte de los mismos están situados en la interfase entre las dos fases proporcionando la emulsión o la espuma estabilizadas con partículas, en donde los gránulos de almidón tienen un tamaño granular pequeño en el intervalo de 0,2-4 (D_{32}) micras, y en donde la cantidad de gránulos de almidón añadidos cubre más del 10 % de la superficie de una gota de emulsión.
2. Una emulsión o una espuma estabilizadas con partículas de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los gránulos de almidón han sido sometidos a modificación física y/o modificación química para aumentar la hidrofobicidad de los gránulos de almidón.
3. Una emulsión o una espuma estabilizadas con partículas de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la modificación física se realiza por calentamiento en seco o por otros medios que desnaturalizan parcialmente las proteínas de la superficie.
4. Una emulsión o una espuma estabilizadas con partículas de acuerdo con las reivindicaciones 2 o 3, en donde la modificación química se realiza por tratamiento con anhídrido alquenil succínico o mediante injerto con otros productos químicos con una cadena lateral hidrofóbica.
5. Una emulsión o una espuma estabilizadas con partículas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde los gránulos de almidón tienen un tamaño granular pequeño en el intervalo de 0,2-1 micras.
6. Una emulsión o una espuma estabilizadas con partículas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde los gránulos de almidón se obtienen de cualquier fuente botánica.
7. Una emulsión o una espuma estabilizadas con partículas de acuerdo con la reivindicación 6, en donde los gránulos de almidón se obtienen a partir de quinoa, amaranto, hierba de vaca, malanga, bledo y taro, incluyendo variedades cerosas y con alto contenido de amilosa de los anteriores.
8. Una emulsión o una espuma estabilizadas con partículas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde las al menos dos fases se eligen entre fase oleosa/fase acuosa y fase gaseosa/fase acuosa, tal como una emulsión de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite.
9. Una emulsión o una espuma estabilizadas con partículas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicha emulsión estabilizada con partículas ha sido sometida a un tratamiento térmico para mejorar o alterar las propiedades de barrera y/o reológicas de la emulsión estabilizada con partículas.
10. Una emulsión o una espuma estabilizadas con partículas secas, en donde una emulsión o una espuma estabilizadas con partículas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 han sido sometidas a eliminación de agua tal como mediante secado.
11. Uso de una emulsión estabilizada con partículas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para controlar la densidad de las gotas de la emulsión.
12. Uso de una emulsión estabilizada con partículas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para la encapsulación de sustancias elegidas entre productos biofarmacéuticos, proteínas, probióticos, células vivas, enzimas, anticuerpos, ingredientes alimenticios sensibles, vitaminas y lípidos.
13. Uso de una emulsión estabilizada con partículas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en productos alimenticios, productos cosméticos, cremas para la piel, lociones, formulaciones farmacéuticas.
14. Una formulación que comprende una emulsión estabilizada con partículas secas de acuerdo con la reivindicación 10 y una sustancia elegida entre productos biofarmacéuticos, proteínas, probióticos, células vivas, enzimas, anticuerpos, ingredientes alimenticios sensibles, vitaminas y lípidos.

Fig 0-1

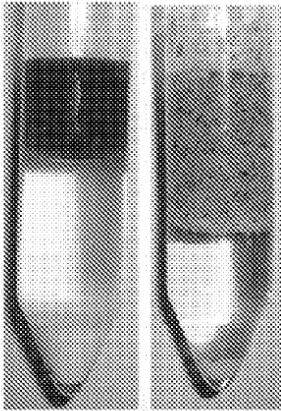


Fig 0-2

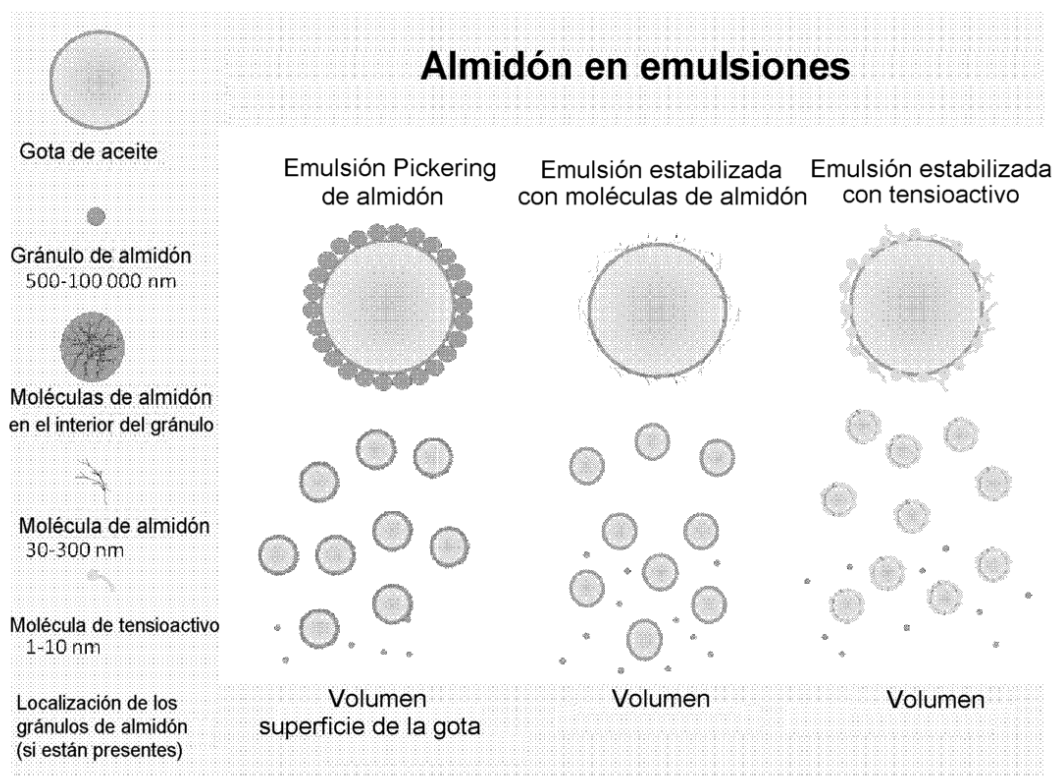


Fig. 0-3

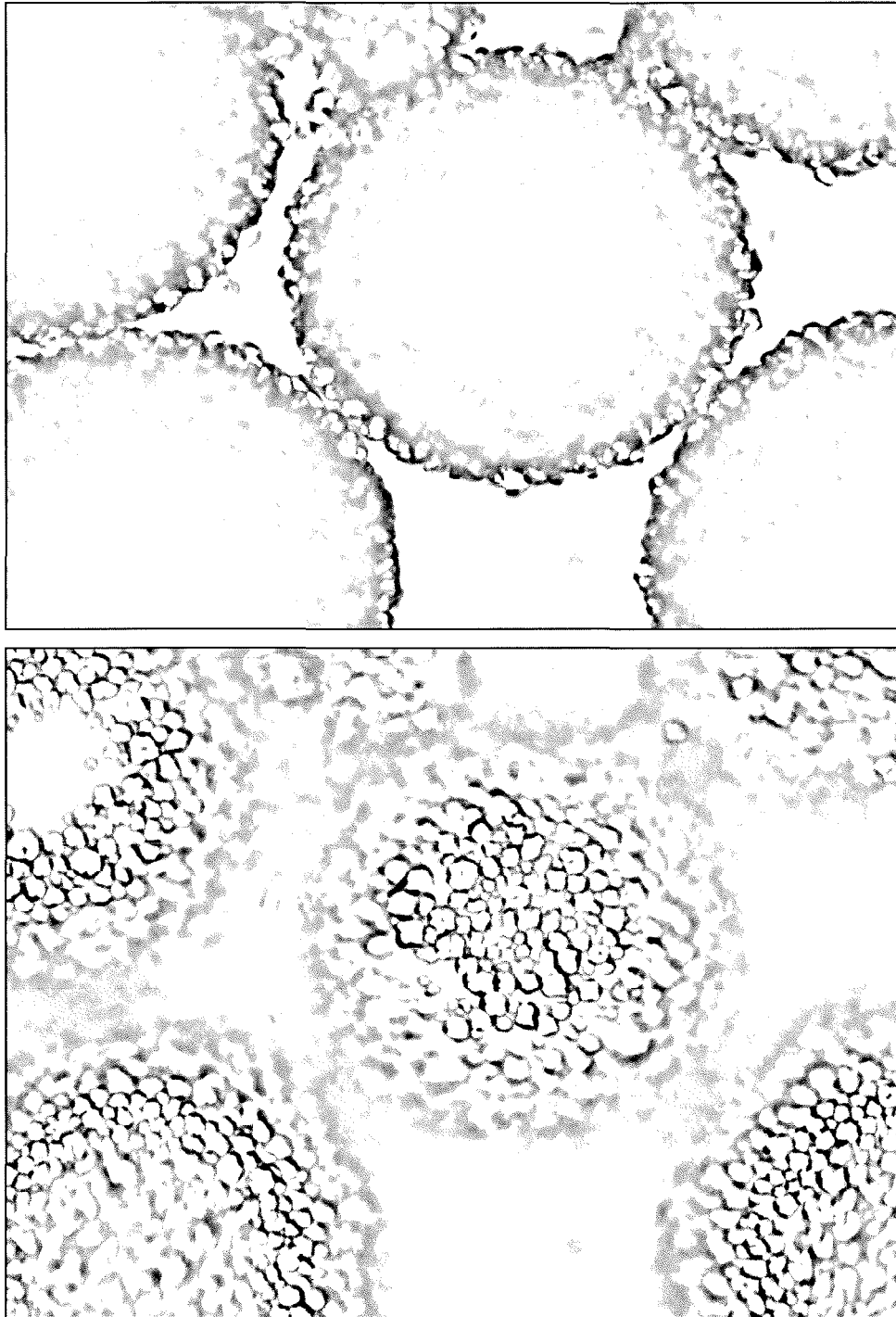


Fig 0-4A

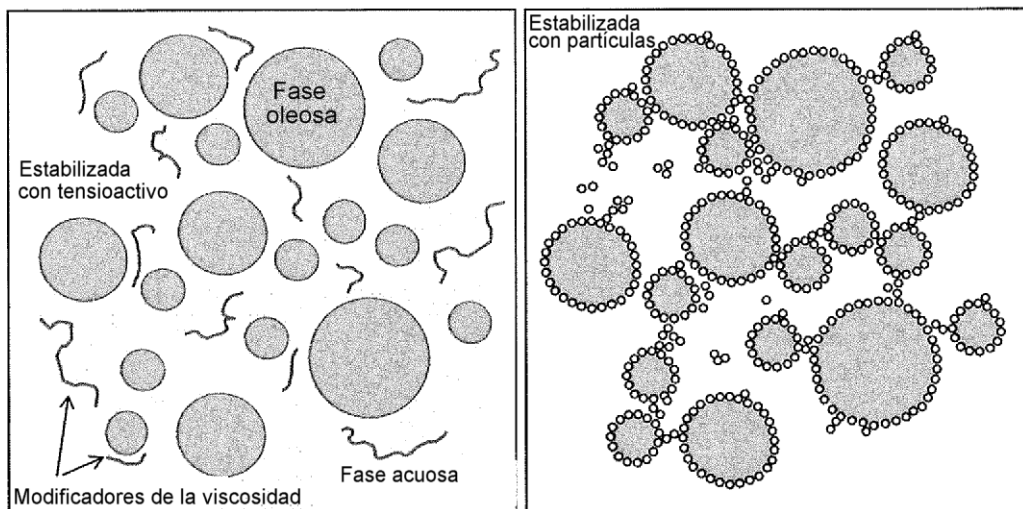


Fig. 0-4B

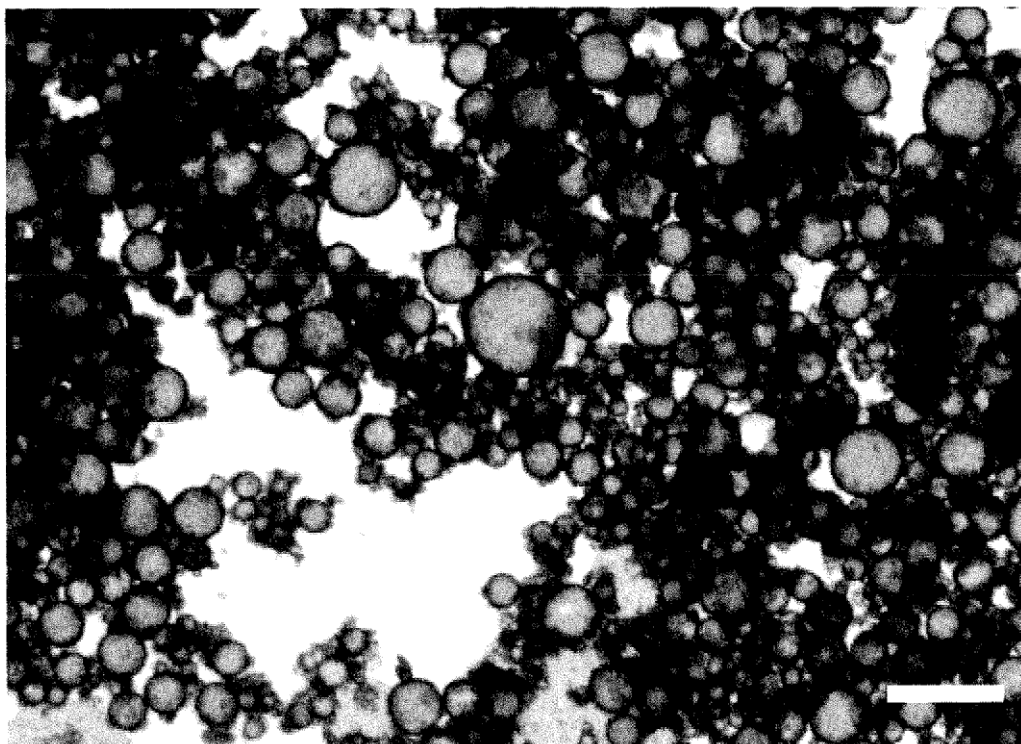


Fig. 0-5A

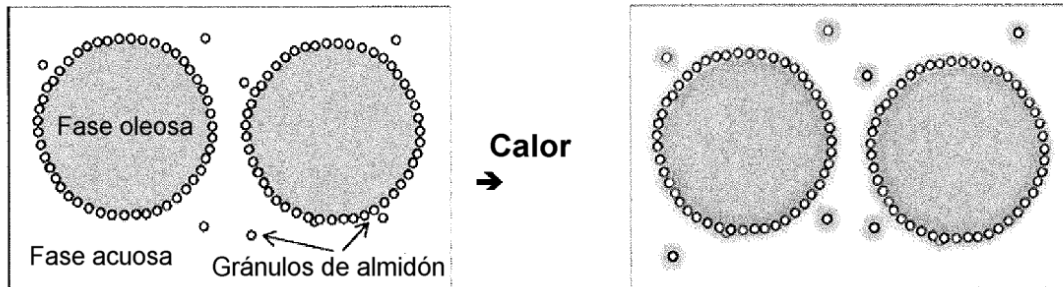


Fig. 0-5B

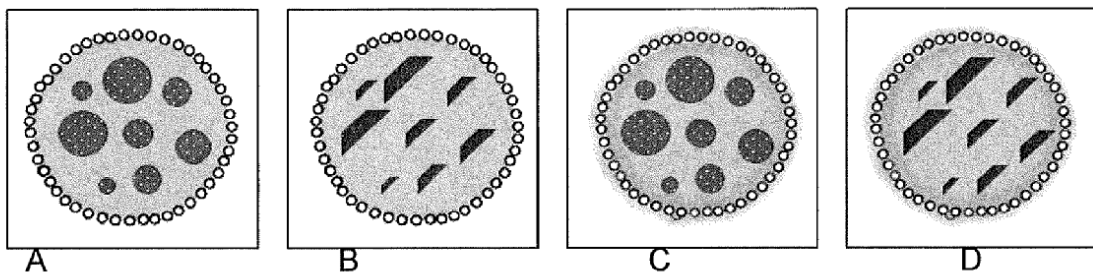


Fig. 0-6

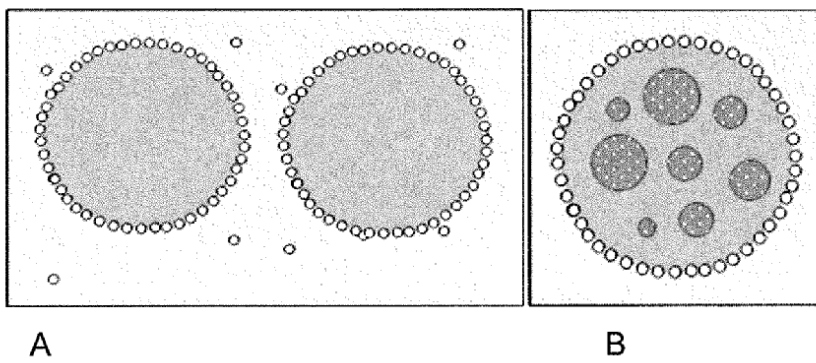


Fig. 1-1

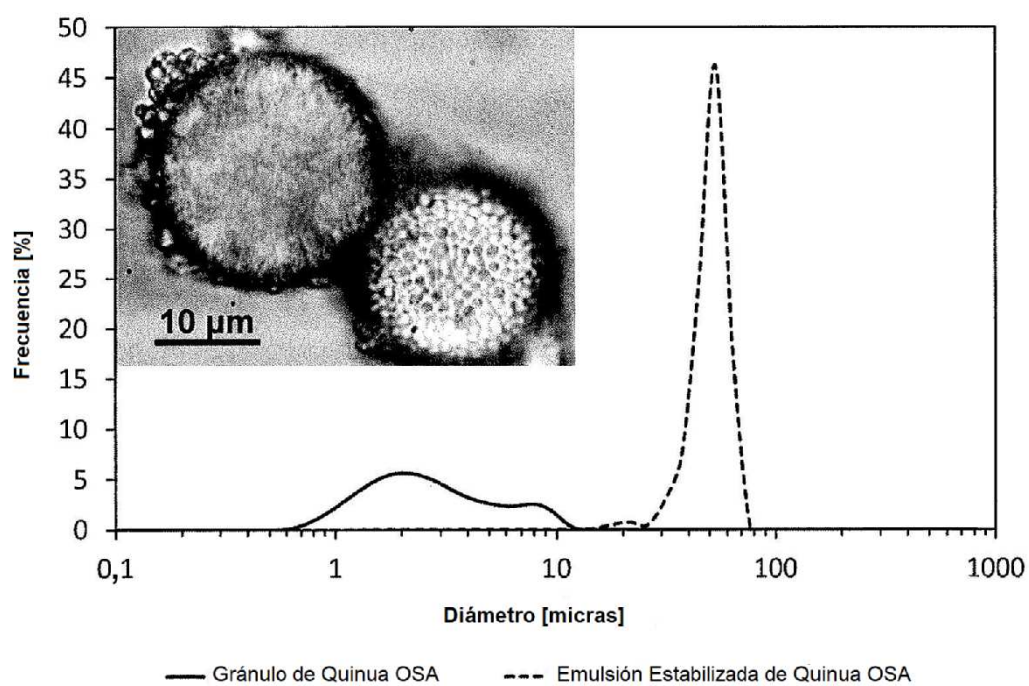


Fig. 1-2

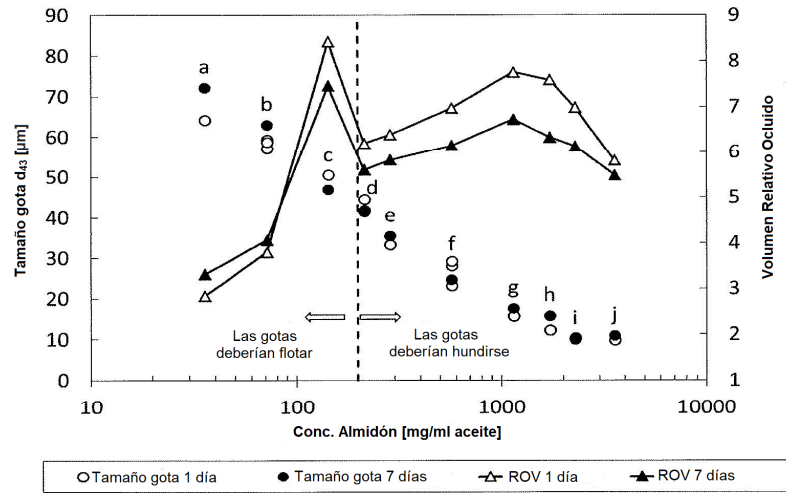
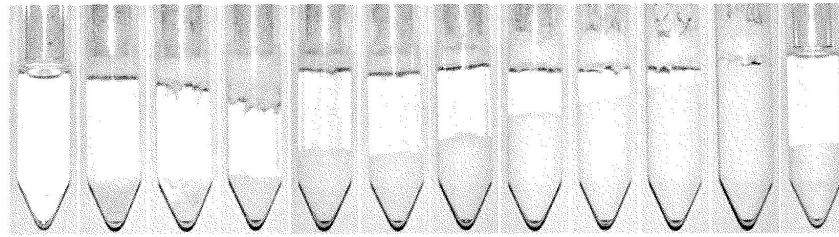
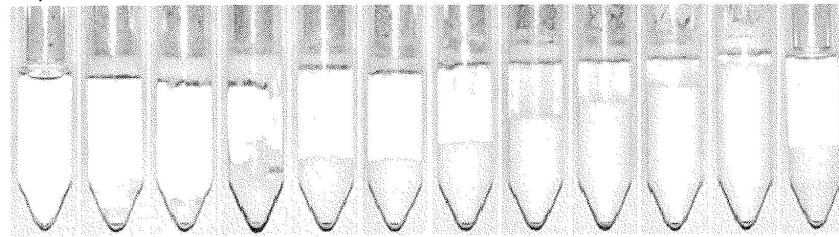


Fig. 1-3

Después de 1 día



Después de 7 días



sin almidón

a

b

c

d

e

f

g

h

i

j

sin aceite
máx.
almidón

Fig. 2-1

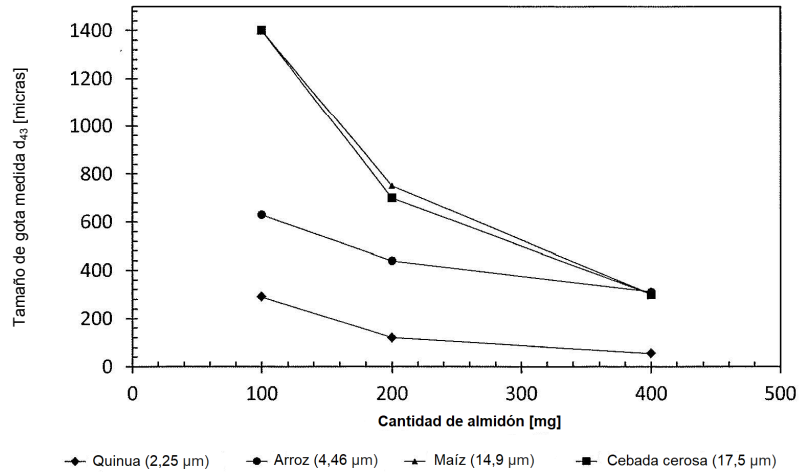


Fig. 2-2

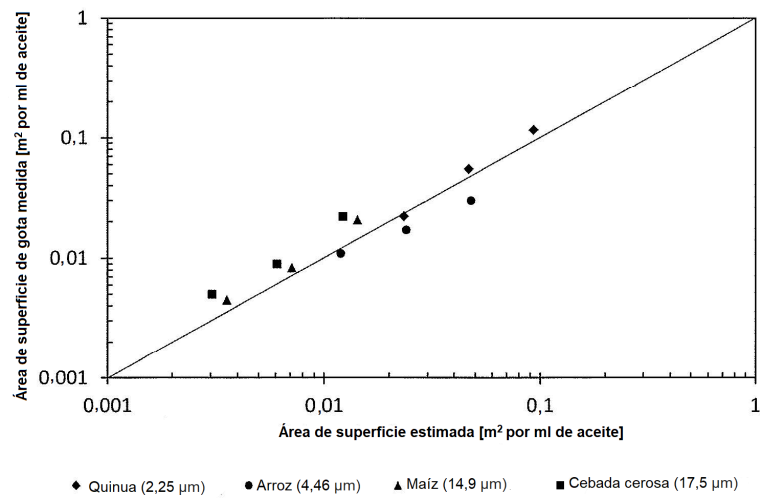


Fig. 3-1

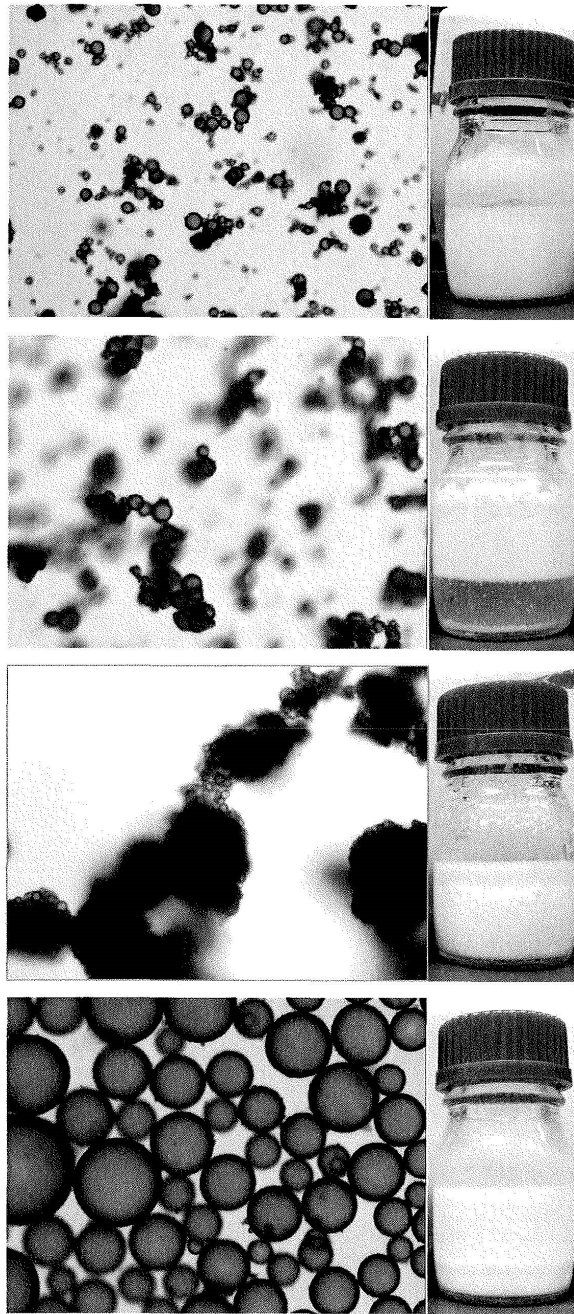


Fig. 4-1

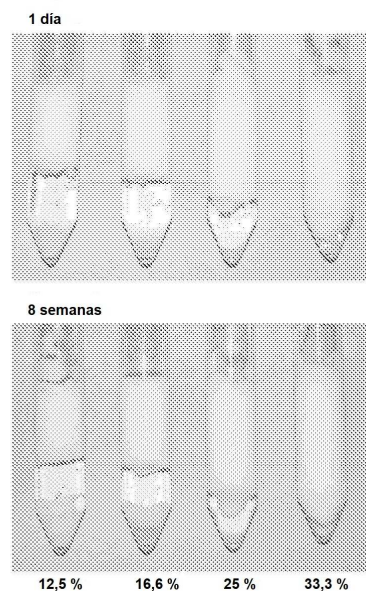


Fig. 4-2

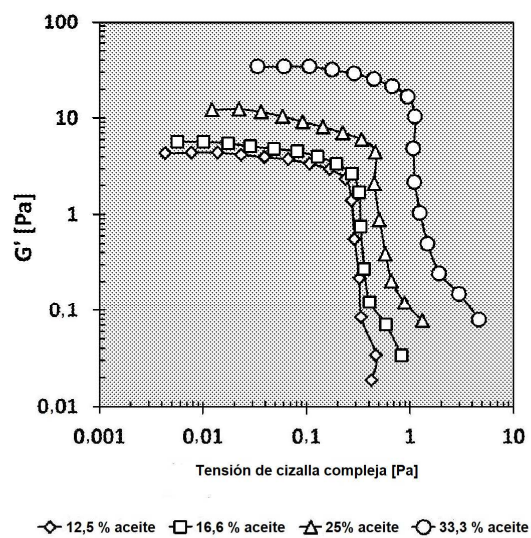


Fig. 5-1

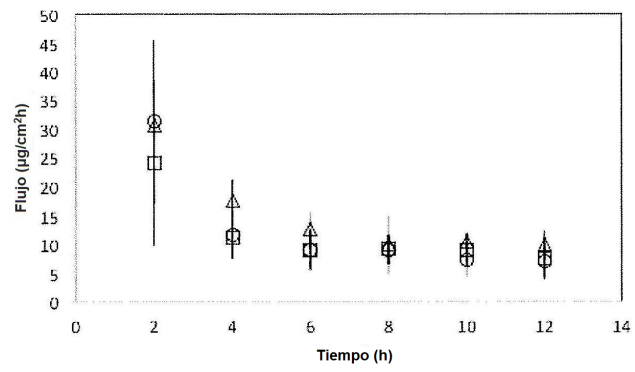


Fig. 6-1

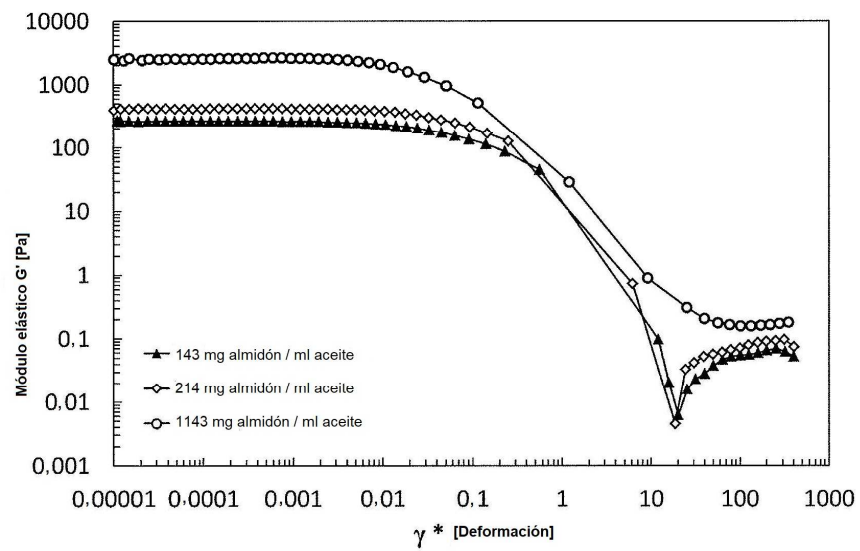


Fig. 7-1

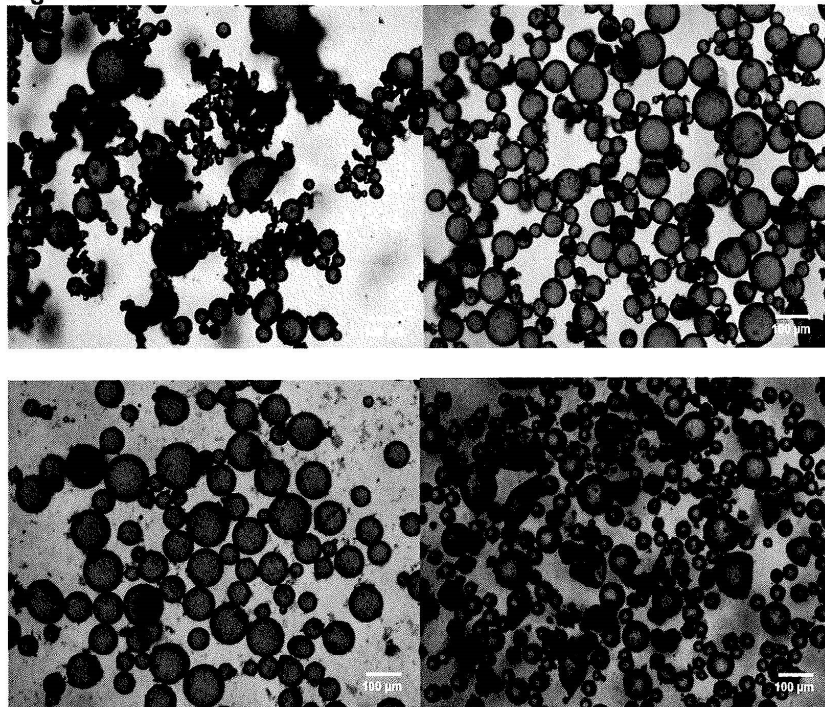


Fig. 7-2

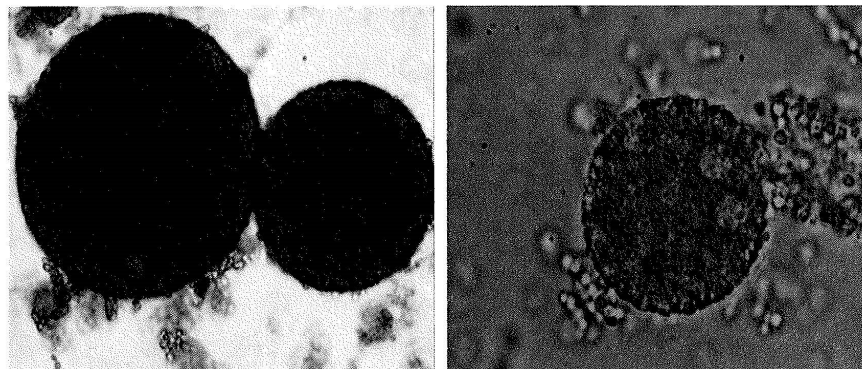


Fig. 7-3

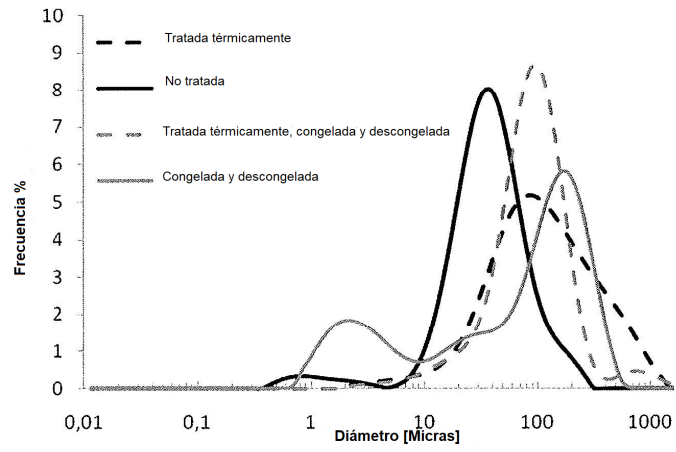


Fig. 8-1



Fig 8-2

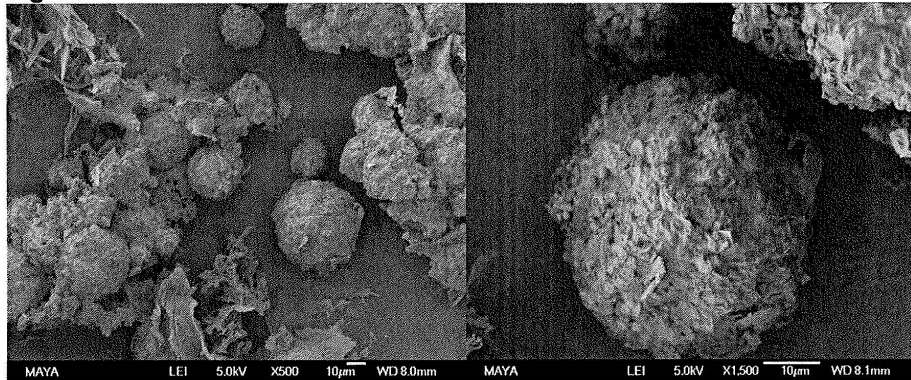


Fig. 8-3

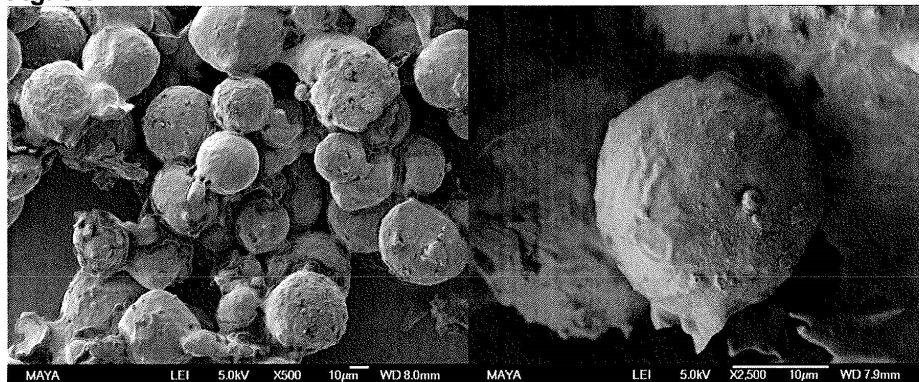


Fig. 8-4

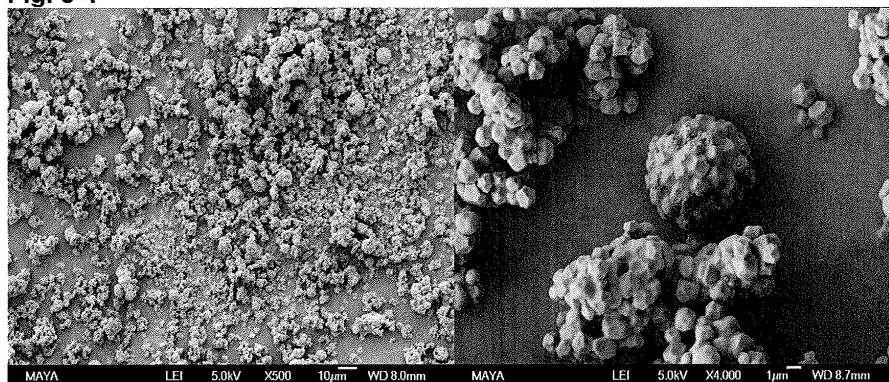


Fig. 8-5

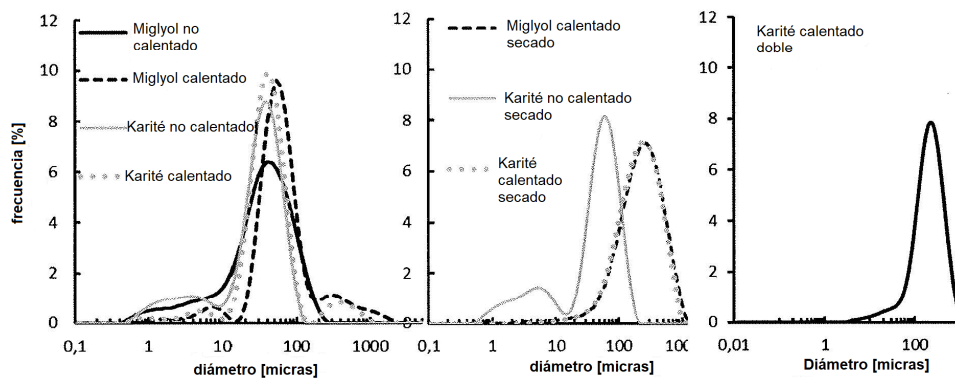
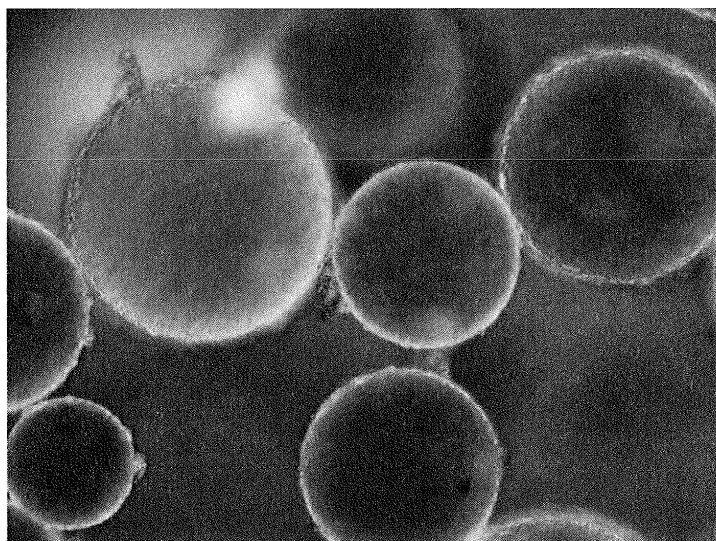


Fig. 9-1



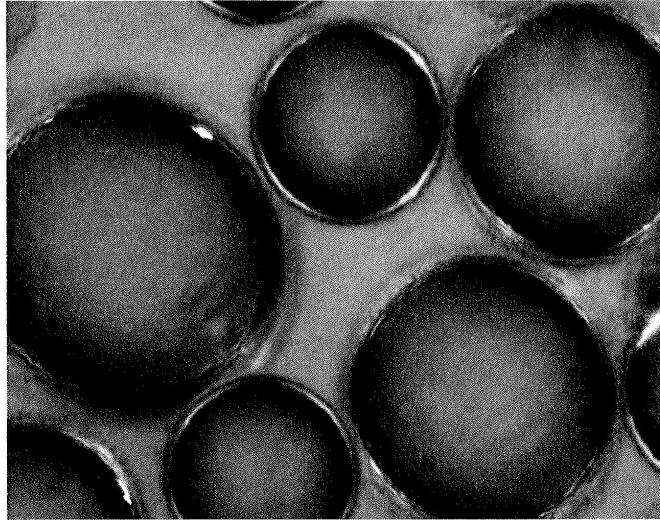


Fig. 9-2

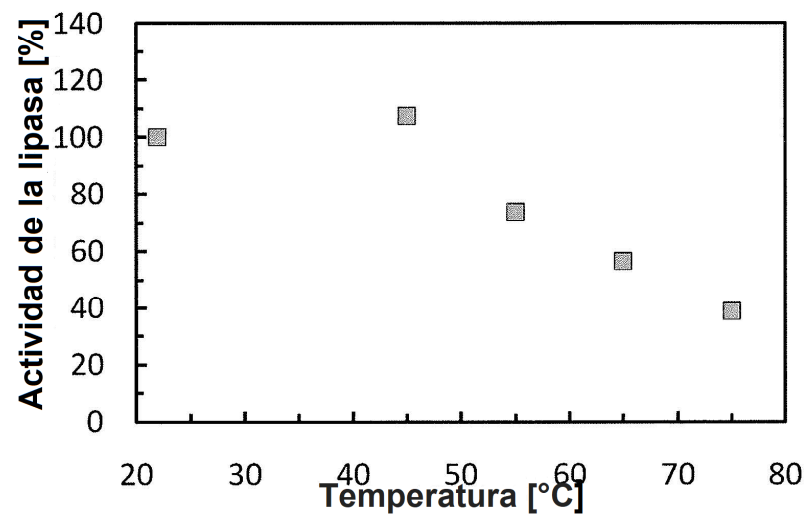


Fig. 10-1

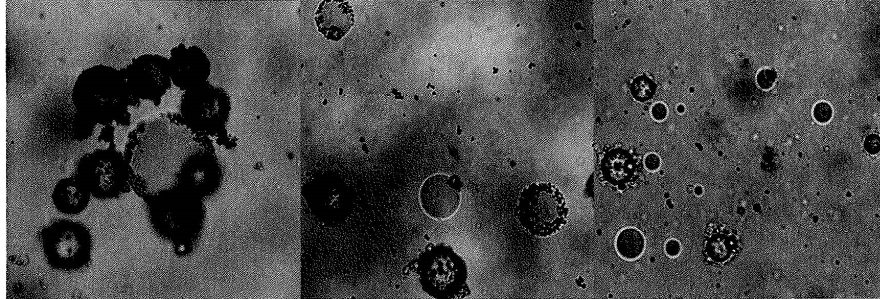


Fig. 11-1

