



Secretaría de Educación Pública

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Veracruz

Estudio y caracterización de emulsiones a partir de un extracto no alcohólico de vainilla (*Vainilla planifolia*)

Tesis

Que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

I.B.Q. Javier Martínez Rodríguez

Asesores:

Dr. José Alberto Monroy Rivera
Dra. Cynthia Cano Sarmiento

H. Veracruz Ver.

Junio de 2017

RESUMEN

Martínez Rodríguez Javier Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. Junio de 2017. “Estudio y caracterización de emulsiones a partir de un extracto no alcohólico de vainilla (*Vainilla planifolia*)”. Asesores: Monroy Rivera José Alberto, Cano Sarmiento Cynthia.

La vainilla (*Vainilla planifolia*) es originaria de la zona norte de Veracruz y es considerada como el saborizante de mayor importancia en el mundo. Sin embargo, su aplicación en alimentos está limitada ya que se comercializa principalmente como extractos etanólicos debido a que la vainillina es insoluble en agua. Además, no todas las personas consumen alcohol por condiciones religiosas o de salud. Por otro lado, las emulsiones en la industria de alimentos son utilizadas para estabilizar mezclas de dos o más sustancias inmiscibles entre sí, por lo que este trabajo propuso estudiar la estabilidad de emulsiones de vainilla generadas por altas presiones a partir de un extracto no alcohólico. Para la elaboración de la emulsión se utilizaron las tecnologías de alta energía, la homogeneización por válvula de alta presión y por microfluidización. En la formulación de las emulsiones se utilizó lecitina de soya, Tween 20, concentrado de vainilla, goma guar, agua, azúcar y glicerol a tres concentraciones diferentes. Se evaluó el efecto de la presión, el número de ciclos, utilizando un factorial $2^3 \times 3$. En la segunda etapa, las emulsiones óptimas se almacenaron a temperaturas controladas de 15, 25 y 35°C durante 41 días. A las emulsiones obtenidas se evaluó el tamaño de partícula, índice de polidispersión, potencial Z. La concentración 7% de glicerol produjo emulsiones más estables en las emulsiones de vainilla con y sin azúcar. Para generar una emulsión estable sin azúcar, 5 ciclos a una presión de 400 bar fueron suficientes, sin embargo para la emulsión con azúcar fueron necesarios 9 ciclos a una presión de 200 bar. Durante el almacenamiento, las altas temperaturas tienden a desestabilizar más rápidamente las emulsiones. A los 35°C ambas emulsiones se desestabilizaron en el día 21 presentando fenómenos de inestabilidad, sin embargo a 25°C la emulsión con azúcar se mantuvo estable durante los 41 días que duró el experimento, mientras que la emulsión sin azúcar solo llegó al día 28. De las temperaturas estudiadas la de 15°C permitió que ambas emulsiones de vainilla con y sin azúcar permanecieran estables durante 41 días que duró el almacenamiento.

ABSTRACT

Martínez Rodríguez Javier. Master of Science in Biochemical Engineering. Food Research and Development Unit. Instituto Tecnológico de Veracruz. June de 2017. June 2017. "Study and characterization of emulsions from a non alcoholic extract of vanilla (*Vanilla planifolia*)". Advisors: Monroy Rivera José Alberto, Cano Sarmiento Cynthia.

Vanilla (*Vanilla planifolia*) is native to northern of Veracruz and is considered the most important flavoring in the world. However, its application in foods is limited as it is marketed primarily as ethanolic extracts because vanillin is insoluble in water. Further, not all people consume alcohol for religious or health conditions. On the other hand, emulsions in the food industry are employed to stabilize mixtures of two or more substances immiscible with each other, This work proposed to study the stability of vanilla emulsions prepared by high pressures from a nonalcoholic extract. For the elaboration of the emulsion, the technologies of high energy, the homogenization by valve of high pressure and microfludización were used. In the formulation of the emulsions soy lecithin, Tween 20, vanilla concentrate, guar gum, water, sugar and glycerol were used at three different concentrations. The effect of pressure and the number of cycles, were evaluated using a factorial $2^3 \times 3$. In the second stage, the optimum emulsions were stored at controlled temperatures of 15, 25 and 35 ° C for 41 days. The emulsions obtained were evaluated for particle size, polydispersity index, Z potential and Stability Index (TSI). A concentration of glycerol 7% produced more stable emulsions in the vanilla emulsions with and without sugar. To generate a stable emulsions without sugar, 5 cycles at a pressure of 400 bar were sufficient; however, for emulsions with sugar, 9 cycles were necessary at a pressure of 200 bar. During storage, high temperatures destabilized the emulsions more quickly. At 35 °C both emulsions were destabilized on day 21 However, at 25 °C the sugar emulsions remained stable during the 41 days of the experiment, while the sugar-free emulsions only reached day 28. From the temperatures studied, 15 °C allowed both vanilla sugar and sugar-free emulsions to remain stable during the 41 days of storage.

CONTENIDO

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE TABLAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
INTRODUCCION	8
1 ANTECEDENTES	10
1.1 Vainilla	10
1.2 Proceso de curado	11
1.3 Composición de la Vainilla	11
1.4 Composición de Extractos de Vainilla	12
1.5 Proceso de extracción de vainilla	15
1.6 Emulsiones	17
1.7 Clasificación	17
1.8 Mecanismos de inestabilidad en una emulsión	18
1.9 Surfactantes	19
1.10 Métodos de elaboración de una emulsión	22
1.11 Técnicas de emulsificación	22
1.12 Sistemas de alta presión	23
1.12.1 Sistema de rotor estator	23
1.12.2 Homogeneizador de válvula de alta presión	24
1.12.3 Microfludización	24
1.12.4 Sonicación	25
2 JUSTIFICACIÓN	28
3 HIPÓTESIS	29
4 OBJETIVOS	30
4.1 General	30
4.2 Específicos	30
5 MATERIALES Y MÉTODOS	31
5.1 Reactivos y Solventes	31
5.2 Metodología	31

5.3	Diseño de experimentos	33
5.4	Caracterización del concentrado de vainilla	33
5.4.1	Proceso de Evaporación	33
5.4.2	Análisis por cromatografía de líquidos	34
5.5	Elaboración de la emulsión	35
5.6	Pre – Homogeneización	37
5.6.1	Homogeneización por válvulas de alta presión	37
5.6.2	Homogeneización por microfluidización	38
5.7	Análisis fisicoquímico	38
5.7.1	Análisis del Tamaño de partícula y Potencial Z	38
5.7.2	Análisis Tamaño de partícula e índice de estabilidad (TSI)	39
5.7.3	Análisis estructural de la emulsión	40
5.7.4	Análisis estadístico	41
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
6.1	Proceso de evaporación	42
6.1.1	Método cromatográfico (HPLC)	43
6.1.2	Preliminares en la emulsión	45
6.2	Elaboración de las emulsiones	46
6.2.1	Parámetros Fisicoquímicos evaluados por Turbiscan Lab	47
6.2.2	Parámetros fisicoquímicos evaluados por ZetasizerNano	52
6.2.3	Estabilidad en emulsiones de vainilla procesadas por homogeneizador de válvulas alta presión	54
6.2.4	Estabilidad en emulsiones procesadas por homogeneización por microfluidización	59
6.3	Análisis óptico de las emulsiones	63
6.3.1	Estabilidad óptica de las emulsiones	63
6.4	Estabilidad óptica durante el almacenamiento	66
6.5	Morfología de las emulsiones	68
7	CONCLUSIONES	71
8	RECOMENDACIONES	73
9	BIBLIOGRAFIA	74

LISTA DE TABLAS

TABLA 1.1. Composición de Vainas de Vainilla en función del país de origen	12
TABLA 1.2. Contenido de nutrientes del extracto de vainilla en 34,4% de etanol	13
TABLA 1.3. Composición química en un extracto de vainilla	14
TABLA 1.4. Comparación de sistemas para la producción de emulsiones	27
TABLA 5.1. Diseño de experimentos	33
TABLA 5.2. Gradiente de concentración	34
TABLA 5.3. Formulación de emulsiones de vainilla con azúcar	35
TABLA 5.4. Formulación de emulsiones de vainilla sin azúcar	35
TABLA 5.5. Tratamientos en mulsiones de vainilla natural con azúcar	36
TABLA 5.6. Tratamiento en emulsiones de vainilla natural sin azúcar	36
TABLA 6.1. Micrografías de tamaño de partícula	70

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1. Principales compuestos aromáticos en las vainas de vainilla beneficiadas	14
FIGURA 1.2. Mecanismos físicos de inestabilidad en emulsiones	19
FIGURA 1.3. Válvulas de homogeneización por una y dos vías	24
FIGURA 1.4. Cámaras de interacción por microfluidización	25
FIGURA 1.5. Homogeneizador por Ultrasonido	26
FIGURA 5.1. Elaboración de las emulsiones primera etapa	32
FIGURA 5.2. Almacenamiento	32
FIGURA 5.3. Homogeneizador por rotor estator	37
FIGURA 5.4. Homogeneizador por válvulas de alta presión	38
FIGURA 5.5. Homogeneizador por microfluidización	38
FIGURA 5.6. ZetasizerNano (SZ90)	39
FIGURA 5.7. Turbiscan Lab	40
FIGURA 5.8. Microscopio electrónico de transmisión	40
FIGURA 6.1. Rampa de presiones para mostrar la evaporación	42
FIGURA 6.2. Concentrado de vainilla	42
FIGURA 6.3. Curvas de calibración de compuestos Vainillina, Ac. Vainílico, <i>p</i> -hidroxibenzaldehído, Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	43
FIGURA 6.4. Cromatograma concentrado de Vainilla	44
FIGURA 6.5. Evolución de tamaño de partícula en emulsión de vainilla	46
FIGURA 6.6. Efecto de la presión en el tamaño de partícula	46
FIGURA 6.7. Análisis estadístico en emulsiones con azúcar	47
FIGURA 6.8. Análisis estadístico en emulsiones sin azúcar	48
FIGURA 6.9. Cinética de estabilidad en emulsiones con azúcar	50
FIGURA 6.10. Cinética de estabilidad en emulsiones sin azúcar	50
FIGURA 6.11. Emulsiones con azúcar	51
FIGURA 6.12. Emulsiones sin azúcar	51
FIGURA 6.13. Evolución de tamaño de partícula en emulsión de vainilla	52

FIGURA 6.14. Análisis estadístico en emulsiones con azúcar	53
FIGURA 6.15. Análisis estadístico en emulsiones sin azúcar	53
FIGURA 6.16. Análisis estadístico sobre la pendiente (TSI)	54
FIGURA 6.17. Análisis estadístico sobre la pendiente en tamaño de partícula	54
FIGURA 6.18. Emulsión con azúcar E8-CA	55
FIGURA 6.19. Emulsión sin azúcar E2-SA	56
FIGURA 6.20. Cinética de inestabilidad y tamaño de partícula en emulsiones de vainilla con azúcar E8-CA	57
FIGURA 6.21. Cinética de inestabilidad y tamaño de partícula en emulsiones vainilla sin azúcar E2-SA	58
FIGURA 6.22. Cinética de inestabilidad y tamaño de partícula en emulsión de vainilla con azúcar E8-CA	61
FIGURA 6.23. Cinética de inestabilidad y tamaño de partícula en emulsión de vainilla sin azúcar E2-SA	62
FIGURA 6.24. Estabilidad óptica en emulsiones con azúcar a 25°C durante 7 días de almacenamiento	64
FIGURA 6.25. Estabilidad óptica en emulsiones sin azúcar a 25°C durante 7 días de almacenamiento	65
FIGURA 6.26. Estabilidad óptica en emulsión con azúcar almacenada a 15 °C – 25 °C – 35 °C durante 42 días	67
FIGURA 6.27. Estabilidad óptica en emulsión con azúcar almacenada a 15 °C – 25 °C – 35 °C durante 42 días	67

INTRODUCCIÓN

Especies de vainilla comerciales como *Vainilla planifolia* es originaria de los bosques tropicales al suroeste de Mesoamérica. Esta vainilla se utilizó en la era prehispánica para varios propósitos, como tributos, fragancias, aromatizantes, remedios medicinales y era utilizada por grupos indígenas como los mayas, aztecas y totonacas. A finales del siglo XVII los totonacas de la región de Papantla, Veracruz fueron los primeros y únicos exportadores de vainilla en el mundo durante casi 100 años (Havkin, 2011)

La vainilla es una orquídea trepadora nativa de México del género *Vainilla* existiendo más de 110 especies siendo tres de mayor importancia comercial (*Vainilla planifolia*, *Vainilla tahitensis* y *Vainilla pompona*) siendo la *Vainilla planifolia* predominante en el cultivo para la obtención de vaina de vainilla (Pérez, 2011). Actualmente la vainilla es considerada como el mayor saborizante natural en el mundo, su uso y distribución está dividida en diferentes sectores industriales, entre estos se encuentran la farmacéutica, cosmético, alimentos y bebidas.

El extracto de vainilla de acuerdo con la NOM-139.SCFI-1999 y la; NOM-182-SCFI-2011 debe ser derivado de las vainas de vainilla, Es una solución etanol/agua con una coloración ámbar de olor y sabor característico, debe tener una concentración de etanol mayor al 35%v/v y una unidad de concentración de vainillina (UCV) equivalente a 0.11 g en 100 ml siendo denominado: "1 FOLD". El sabor y aroma característico del extracto de Vainilla es desarrollado en las vainas debidamente curadas, siendo el resultado de una serie de transformaciones bioquímicas, donde se han identificado más de 170 compuestos aromáticos volátiles, encontrando la Vainillina, el ácido *P*-hidroxibenzoico, el *P*-hidroxibenzaldehído y el ácido Vanílico, como principales compuestos que le otorgan el sabor y el aroma característico a Vainilla; sin embargo la concentración de estos cuatro compuestos Puede variar dependiendo de la especie y el país de origen (Pérez, 2011).

INTRODUCCIÓN

Por otra parte, las emulsiones son utilizadas en un gran número de alimentos, por ejemplo en bebidas, aderezos y helados. Las emulsiones son sistemas inestables que consisten en dos líquidos inmiscibles, uno de los líquidos dispersos en pequeñas gotas. Se clasifican en emulsiones aceite en agua (o/w) o agua en aceite (w/o) Para hacer una emulsión estable es necesario la adición de emulsificantes. Para que una sustancia actúe como un emulsificante se requiere una afinidad en el área interfacial, entre la fase continua y la fase dispersa.

Existen mecanismos fisicoquímicos que describen la capacidad en una emulsión para resistir los cambios generados con respecto el tiempo. Los mecanismos de inestabilidad en las emulsiones más referidos son, sedimentación, sedimentación inversa, floculación, coalescencia y maduración de Ostwald.

Para evitar los fenómenos fisicoquímicos de inestabilidad existen métodos de alta y baja energía para conseguir emulsiones más estables, dentro de los métodos de baja energía se encuentran las alteraciones de las condiciones ambientales y la formación espontanea de gota, Para los métodos de alta energía se encuentran: homogeneizador por ultrasonido, homogeneizador por válvula de alta presión y microfluidización. Estudios demuestran que el tamaño de gota tiende a disminuir cuando en el proceso por homogeneización se aumenta la presión o el número de ciclos, este aumento repercute en la disminución en la tensión superficial, aumentando la velocidad de adsorción del emulsificante y modificando la relación de la viscosidad de la fase dispersa a continua (McClements, 2010).

Por lo cual en este trabajo se propone elaborar emulsiones de vainilla libre de alcohol, evaluando el efecto que tiene el número de ciclos, las altas presiones, la concentración de glicerol en la formulación de emulsiones con y sin azúcar partiendo de un extracto alcohólico de vainilla. Posteriormente se estudiara el efecto de las temperaturas de almacenamiento 15°C, 25°C, 35°C en la estabilidad de las emulsiones.

1 ANTECEDENTES

1.1 Vainilla

La vainilla (*Vainilla planifolia*) pertenece al género de las Orchidaceae del genero de vainilla, originaria de la zona costera al norte del estado de Veracruz, sus regiones productoras son Papantla de Olarte, Martínez de la Torre, Gutiérrez Zamora, Tecolutla y Poza Rica mientras que en Puebla se ubican en la región de Cuetzalan del Progreso, Xóchitlan de Romero Rubio, Ixtepec, Caxhuacan y Huachinango (Musalem, 2002). Es considerada como el saborizante de mayor importancia en el mundo, Su uso y su distribución está dividida en algunos sectores industriales como en la industria de alimentos, bebidas, farmacéuticos y cosméticos.

Particularmente *Vainilla planifolia*, las flores miden alrededor de 5cm color blanco y un tono amarillo verdosos, presentando tres pétalos y una columna central en donde se presentan sus órganos sexuales, la planta está constituida por dos tipos de raíces las primeras son las que brotan los nudos y se encuentran por debajo de la tierra y las segundas son las que brotan de los nudo de la parte aérea (Musalem, 2002; Castro, 2008). Los países europeos intentaron la producción de Vainas de Vainilla después de la llegada de los españoles a México, observando que las flores no llegaron a producir frutos (Vainas) ni en climas ni en suelos beneficiados para su cultivo, por tal motivo la zona de Papantla en el estado de Veracruz-México fue el productor de Vainas de Vainilla por más de 300 años, por lo que se convirtió en la ciudad de más importancia económica a nivel mundial.

En el año de 1836, Charles Morren encontró que las orquídeas no se daban en otras partes del mundo debido a que la polinización se daba naturalmente por la avispa y por el colibrí. Encontrando un método de polinización artificial que dio paso a la producción de grandes volúmenes de Vainilla a nivel mundial (Pérez, 2011).

1.2 Proceso de curado

Las vainas de vainilla verde son casi inoloras desarrollando un débil olor fenólico de a diferencia de las vainas curadas que alcanzan la etapa de madurez de la cosecha desarrollando un sabor como resultado de la acción enzimática inducida naturalmente. Dentro del proceso de curado de las vainas de vainilla salen estar en patios o cobertizos donde se almacenan las vainas por algunos días hasta que las vainas empiezan a encogerse, posteriormente son colocados en grandes cajas de sudoración en estas cajas son colocados en una serie de tapetes sobre las cajas de sudoración de tal manera que la temperatura sea apropiada y pueda mantenerse para que se realicen las reacciones enzimáticas que generan el sabor característico a Vainilla, acompañado de una ligera fermentación. Esta etapa se realiza durante veinticuatro horas el proceso puede repetirse de seis a ocho veces durante la primera parte de curado pudiéndose extender de dos a tres semanas, durante este período las vainas verdes adquieren un color chocolate y la humedad se reduce hasta un nivel de 250 g/kg por la exposición frecuente a la luz solar y a la sudoración. En la parte final del curado se colocan las vainas en cajas de por un período de 2-3 meses, las vainas se juntan y forran con papel encerado, el proceso mexicano de curado tarda aproximadamente de 5 a 6 meses (Ramachandra y Ravishanka, 2000)

1.3 Composición de la Vainilla

La identificación de los compuestos químicos de la vainilla inicio desde el siglo pasado identificando más de 200 compuestos volátiles que son responsables del aroma a vainilla. (Sinha, 2008) Los compuestos que otorgan el aroma a vainilla, son compuestos volátiles como carbonilos, alcoholes aromáticos, ácidos aromáticos, ésteres aromáticos, fenoles, alcoholes alifáticos, lactonas, hidrocarburos aromáticos y alifáticos, terpenoides, heterocíclicos. Por otra parte, los compuestos no volátiles que imparten el sabor a la vainilla son los: taninos, polifenoles, resinas y aminoácidos libres. Todos estos compuestos juntos imparten un delicado, rico y aroma suave con dulce picante,

ANTECEDENTES

amaderado y con notas balsámicas (Ramachandra y Ravishanka, 2000). Entre todos los compuestos volátiles mencionados la vainillina es el compuesto principal característico al sabor a vainilla. Por otro lado, las vainas de vainilla beneficiada y todas las concentraciones de estos compuestos dependen de las especies, los factores ambientales los procedimientos de crecimiento y de postcosecha, haciendo referencia al contenido de compuestos generales en las vainas verdes y secas (Parthasarathy *et al.*, 2008). Un estudio realizado por Ranadiver *et al.*, (1992), comparan los compuestos más importantes que otorgan el sabor característico a vainilla para vainas curadas de diferentes zonas geográficas (Tabla.1.1).

TABLA 1.1. Composición de Vainas de Vainilla en función del país de origen

Origen	Ácido p-hidroxibenzoico (mg/100 mL extracto)	p-hidroxibenzaldehído (mg/100 mL extracto)	Ác. Vanílico (mg/100 mL extracto)	Vainillina (mg/100 mL extracto)
Madagascar	5.6	13.7	15	164
Indonesia	3.4	9.3	7.7	117
México	4	7	13	90.0
Costa Rica	5.2	14	12	135
Jamaica	n.d.	8.4	4.2	216
Tonga	2.1	10	7.6	197
Tahití	32.8	13	4.4	103

(Ranadive, 1992)

1.4 Composición de Extractos de Vainilla

El aroma y sabor característico de vainilla se debe a la presencia de compuestos no volátiles en el extracto de vainilla, en esto se incluyen los taninos, polifenoles, amino libres ácidos y resinas, siendo los extractos con más resinas retendrán mayormente los compuestos aromáticos (Sinha, 2008). En las Tablas 1.2 y 1.3 se muestra el contenido

ANTECEDENTES

de nutrientes y la composición química en el extracto de vainilla al 34.4% de etanol después del curado.

TABLA 1.2. Contenido de nutrientes del extracto de vainilla en 34,4% de etanol

Nutrientes	Valor 100 g porción comestible	Lípidos	Valor 100 g por porción comestible
Agua (g)	52.58	Total de ác. grasos	0.010
Proteína	0.06	Ác. Grasos mono in saturados	0.010
Lípidos totales	0.06	Ác. grasos poliinsaturados	0.004
Ceniza	0.26		
Carbohidratos	12.65		
Minerales		Vitaminas	
Ca	11	Tiamina	0.011
Fe	0.12	Riboflavina	0.095
Mg	12	Niacina	0.425
P	6	Ácido pantoténico.	0.035
K	148	Vitamina B6	0.026
Na	9		
Zn	0.11		
Cu	0.072		
Mn	0.23		

(Parthasarathy *et al.*, 2008)

El sabor y aroma característicos de las Vainas de vainilla, es desarrollado en el curado de las mismas, siendo el resultado de una serie de transformaciones bioquímicas. Se han identificado compuestos aromáticos volátiles en las vainas de vainilla, la vainillina es la más abundante con (1.5 - 3.2 %) seguida por el Ácido p-hidroxibenzoico (0.02 %), el p-hidroxibenzaldehído (0.12-0.2 %) y el Ácido vanílico (0.1-0.2 %). Sin embargo esta proporción podría variar, ya que depende en su mayoría de la especie y del país de

origen. La Figura 1.1 muestra los principales compuestos de la vainilla beneficiada (Ranadiver, 1992; Ramachandra y Ravishanka, 2000; Pérez, 2011).

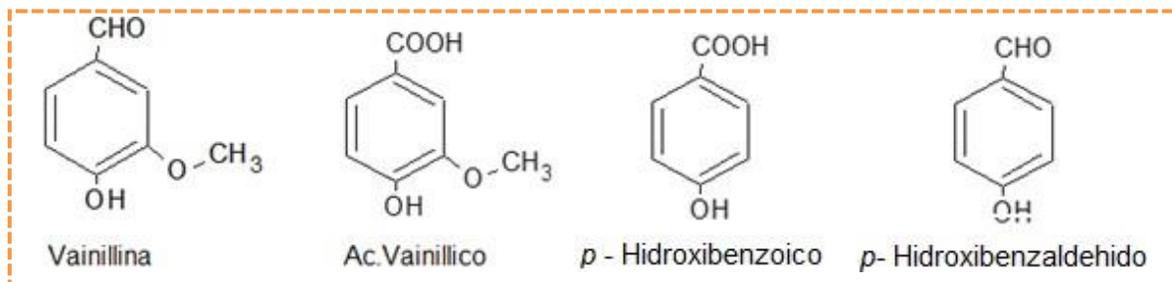


FIGURA 1.1. Principales compuestos aromáticos de las vainas de vainilla beneficiadas

TABLA 1.3. Composición química en un extracto de vainilla

COMPUESTOS	NUMERO DE COMPUESTOS
Hidrocarburos	40
Aldehídos Carbonilos	11
Ácidos	20
Lactónas	2
Compuestos Sulfurados	1
Eteres	5
Furános	10
Alcoholes	25
Cetonas	10
Esteres	41
Acetatos	1
Bases	3
Fenoles	10
Epóxidos, Pirános, Cumarinas	2

(Ramachandra y Ravishanka, 2000)

Por otra parte Pérez *et al.*, en 2011, realizaron la caracterización química del extracto y la compararon con diferentes investigaciones, observando que la vainillina se encuentra como glucósido o glicona. Mientras que el alcohol vanílico, alcohol p-hidroxibencil, ácido p-hidroxibenzoico, y el p-hidroxibenzaldehído, fueron las únicas

coincidencias en tres investigaciones diferentes (kaunzinger *et al.*, 1997; Shymala *et al.*, 2007; Palama *et al.*, 2009).

1.5 Proceso de extracción de vainilla

Son utilizados principalmente dos métodos para la extracción de vainilla, encontrando la percolación y la oleoresina.

La percolación consiste en circular una solución de etanol/agua en proporciones 35-50 y 65-50 (v/v), sobre y a través de vainas en condiciones de vacío durante aproximadamente 48 a 72 días. Mediante este proceso se puede obtener una concentración de aproximada de cuatro Fold de vainillina. Por otra parte el método de oleoresina consiste en pulverizar todas las vainas de vainilla, haciendo circular etanol sobre las vainas al vacío a 45°C, siendo eliminado el exceso de etanol por evaporación. Este proceso toma alrededor de 8-9 días y se puede obtener aproximadamente una concentración de diez Fold de vainillina (Ramachandra y Ravishanka, 2000).

De acuerdo con las normas NOM -139.SCFI-1999 y NOM-182-SCFI-2011, el extracto de vainilla natural es un líquido color ámbar de olor y sabor característicos, derivado de vainas de vainilla, alcohol y agua, el cual puede o no contener glicerina, propileno glicol, azúcar (incluye azúcar invertido), dextrosa, jarabe de maíz (incluye jarabe de maíz deshidratado). La concentración de etanol no debe ser menor del 35% v/v y debe tener una unidad de concentración de vainilla (UCV) equivalente a 0.11 g en 100 mL denominado 1 FOLD. Por tal motivo se considera extracto de vainilla cuando la concentración de etanol es igual al 35% v/v y contiene un equivalente de concentración de 0.11 g de vainillina en 100 mL (1 FOLD).

Por otra parte existe un creciente interés en la producción de emulsiones para la industria de alimentos, bebidas y productos farmacéuticos con el fin de encapsular, proteger y suministrar compuestos funcionales, tales como sabores, vitaminas y

ANTECEDENTES

fármacos (McClements, 2011) presentándolas al consumidor como productos acabados o que aparecen durante la preparación de algunos alimentos (Øystein y Johan, 2003).

La industria en los alimentos constantemente tiene como objetivo la fabricación de productos de alta calidad variando el proceso y los ingredientes. Para lograr este objetivo, es importante que la industria alimentaria comprenda cómo las características fisicoquímicas y sensoriales de los alimentos (tales como estabilidad, textura, apariencia y sabor) están relacionadas con su composición y microestructura, seleccionando los ingredientes y proceso de elaboración para crear alimentos con composiciones y microestructuras para productos finales con los atributos de calidad deseada (McClements, 2007). Por lo tanto emulsiones deben tener una cierta textura siendo atractiva para consumidor.

1.6 Emulsiones

Una emulsión son sistemas termodinámicamente inestables y puede definirse como; un sistema compuesto por dos líquidos inmiscibles, uno de los cuales es disperso como gotitas (la fase dispersa o interna) a través de la otra (la fase continua o externa) (Jafari *et al.*, 2008)

Algunos alimentos naturales o procesados consisten en estar parcial o totalmente en presentación de una emulsión, tomando como ejemplo están; leche, crema, bebidas de frutas, fórmula para bebés, sopas, aderezos, mayonesa, postres, helado, café blanqueador, mantequilla y margarina. La ciencia en las emulsiones combina aspectos de la física, la química, la biología y la ingeniería. Las emulsiones han evolucionado dentro de la industria alimentaria y se han incorporado una variedad de otras disciplinas, el análisis sensorial y la fisiología, ya que investigadores tratan de correlacionar calidad sensorial de emulsiones en los alimentos como sabor, olor, textura, apariencia, composición y las propiedades físico-químicas (McClements, 2004).

1.7 Clasificación

Las emulsiones pueden estar clasificadas de acuerdo a la distribución de sus fases oleosa y acuosa, si las gotas de aceite están dispersas en la fase acuosa son llamadas emulsiones aceite en agua O/W, sistemas que consisten en gotas de agua dispersas fase oleosa son llamados agua en aceite W/O, también es posible elaborar emulsiones múltiples llamadas aceite en agua en aceite O/W/O ó agua en aceite en agua W/O/W. El tipo de emulsión O/W y W/O depende de la proporción del volumen cuanto mayor sea la fracción de una fase, mayor será la probabilidad de que forme la fase externa, por ejemplo es probable que se forme una emulsión O/W si el agua representa una mayor fracción del volumen que la fase oleosa. (McClements, 2004).

Si se dejan reposar por algún tiempo, estos líquidos inestables las moléculas de la fase dispersa tienden a asociarse para formar una capa que puede migrar o precipitar a la superficie, esto se debe a la diferencia de densidades entre las dos fases (Jafari, 2008).

Las emulsiones se pueden clasificar dependiendo del tamaño de partícula dividiéndose en tres tipos; micro emulsiones 10-100 nm, nano emulsiones 100-1000 nm y macro emulsiones 0.5 a 100 μm (Jafari *et al.*, 2008) Por otra parte la estabilidad de una emulsión es un término que se usa frecuentemente para describir la capacidad en la emulsión para resistir los cambios generados con respecto al tiempo. (McClements, 2004).

1.8 Mecanismos de inestabilidad en una emulsión

Existe una variedad de mecanismos fisicoquímicos que pueden ser responsables de las alteraciones en las propiedades en la emulsión. Los mecanismos físicos más comunes que se presentan en la inestabilidad de las emulsiones en alimentos, son sedimentación inversa y sedimentación (siendo estas dos formas de separación gravitacional), la floculación, la coalescencia y la maduración de Ostwald son tipos de agregaciones de las gotas (McClements, 2004).

La sedimentación inversa describe el movimiento de gotas hacia arriba de la solución esto se debe a que las gotas tienen una densidad menor que el líquido circundante, mientras que la sedimentación se describe como el movimiento de las gotas hacia abajo debido a que las gotas tienen una mayor densidad que el líquido circundante. La floculación se produce cuando dos o más gotas se unen para formar un agregado en el que las gotas conservan su integridad individual mientras que la coalescencia es el proceso mediante el cual dos o más gotas se combinan entre sí para formar una sola gota grande (McClements, 2004).

Por otra parte la fuerza impulsora termodinámica en la maduración de Ostwald es la diferencia en los potenciales químicos entre las gotas más pequeñas y las más grandes, teniendo lugar el transporte de masa por difusión entre las gotitas. Por lo tanto, la

maduración de Ostwald ocurre a velocidades significativas, y la fase dispersa debe tener una solubilidad apreciable dentro de la fase continua (Dickinson, 2009).

Conociendo los mecanismos fisicoquímicos de inestabilidad de una emulsión, es necesario identificar cuál de estos mecanismos son importantes en el sistema que se pretende desarrollar y considerar estrategias eficaces para mejorar la estabilidad en cualquier sistema. En la Figura 1.2 se muestran los mecanismos físicos de inestabilidad.

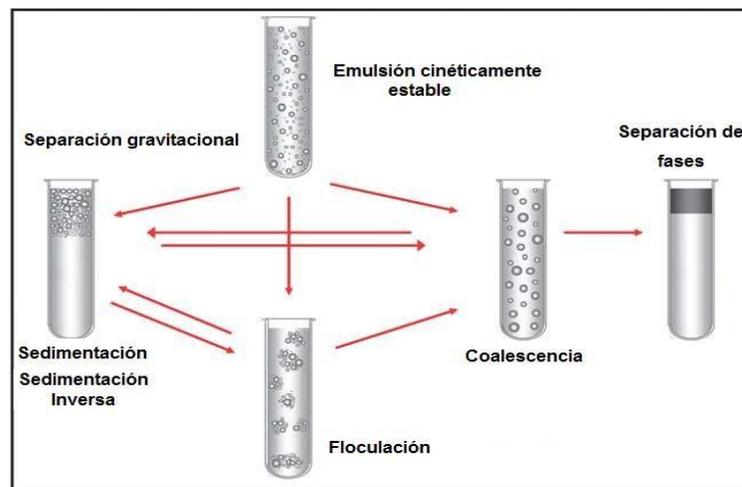


FIGURA 1.2. Mecanismos físicos de inestabilidad en emulsiones (McClements, 2011).

1.9 Surfactantes

Los surfactantes son moléculas anfifílicas con actividad superficial, es decir poseen tanto grupos polares como apolares que les permiten ubicarse en la interfase de las emulsiones y reducir la tensión superficial entre el aceite en agua o agua en aceite, mejorando la interacción y el tamaño de las partículas en la emulsión, creando una barrera una vez absorbidos, protegiendo a la emulsión contra la coalescencia y la floculación (McClements, 2004) los surfactantes se pueden clasificar mediante el balance Hidrofílico-lipofílico (HLB) que corresponde al porcentaje de la porción

ANTECEDENTES

hidrofílica de la estructura molecular de un agente surfactante, por lo que el índice HLB es la determinación de la parte hidrofílica de una molécula

Por otra parte se permite una adición considerable de surfactantes en el uso de emulsiones alimentarias, los surfactantes de moléculas pequeñas como; (monoglicéridos y diglicéridos, ésteres de sorbitán de ácidos grasos, polioxietileno, fosfolípidos y muchos otros) contienen residuos de ácidos grasos de cadena larga, que proporcionan el grupo hidrofóbico que se une a la fase lipídica de la interfase entre el aceite-agua provocando la adsorción. Los grupos de estos surfactantes son variados, van desde glicerol (en monoglicéridos y diglicéridos) y restos de fosfogliceril sustituidos en fosfolípidos, hasta sorbitán altamente sustituido con cadenas de polioxietileno. Dicho material puede tener valores de balance hidrófilo-lipofílico (HLB) de 3 (soluble en aceite) a 10 o superior (soluble en agua). Como regla general, se usan surfactantes de un HLB bajo y alto para formar emulsiones W/O y emulsiones O/W, respectivamente (Douglas, 2003)

Los surfactantes: Son moléculas relativamente pequeñas que tienen una “Cabeza” polar, hidrofílica y una “cola” apolar hidrofóbica (Friberg *et al.*, 2014) la cabeza polar puede ser aniónica, catiónica, zwitteriónica (compuesto eléctricamente neutro pero con cargas positivas y negativas en la molécula) o no iónica (McClements, 2011).

Surfactantes iónicos

La mayoría de los surfactantes iónicos de calidad alimentaria tienen una carga negativa, encontrando al menos un surfactante cargado positivamente disponible para ciertas aplicaciones, los surfactantes iónicos pueden usarse para formar emulsiones mediante métodos de elaboración de baja y alta energía, su aplicación puede estar limitada en productos en los que se requieren altos niveles de surfactantes, porque tienden a causar irritación (McClements, 2011).

Aniónicos

Estos compuestos normalmente contienen uno de los cuatro grupos polares (carboxilato, sulfonato, sulfato o fosfato) combinado con una cadena hidrocarbonada hidrofóbica (Torres, 2007).

Catiónicos

La gran mayoría de estos surfactantes son compuestos nitrogenados con varios grupos aminos terciarios o cuaternarios. (Torres, 2007).

Surfactantes No iónicos

Los Surfactantes no iónicos han sido ampliamente utilizado para formar emulsiones debido a su baja toxicidad, falta de irritabilidad y la capacidad de formar fácilmente emulsiones mediante métodos de alta y baja energía, estos surfactantes suelen ser de éster de azúcar (mono-oleato de sorbitán, mono-palmitato de sacarosa) surfactante de éter de polioxietileno (POE) y ésteres de sorbitán etoxilados como Tweens y Spans. (McClements, 2011; Jafari, 2008).

Surfactantes Zwitteriónicos

Son compuestos eléctricamente neutros pero con cargas positivas y negativas en la molécula dependiendo del pH de la solución a un pH alcalino es aniónico y un pH ácido es un catiónico, y cerca de su punto isoeléctrico son realmente neutros presentando un mínimo de actividad superficial. Los fosfolípidos comunes que tienen el estado GRAS (Generally Recognized As Safe), son permitidos en el uso de alimentos un ejemplo es la fosfatidilcolina (lecitina). Muchos fosfolípidos naturales no son particularmente buenos para formar o estabilizar emulsiones cuando se usan solos, pero pueden ser eficaces cuando se usan en combinación con otro surfactante (McClements, 2011).

ANTECEDENTES

Por lo tanto la selección de un surfactante o combinaciones, es uno de los factores importantes a considerar para el diseño una emulsión, encontrado métodos de alta y baja energía para la elaboración de emulsiones; para los de alta energía el surfactante facilita la interrupción de la gota dentro de la homogeneización disminuyendo la tensión interfacial lo que favorece la producción de pequeñas gotas, en los de baja energía el surfactante facilita la formación espontánea de pequeñas gotas debido a la capacidad de producir tensiones muy bajas, bajo ciertas condiciones ambientales y de solución (McClements, 2005; Kralova et al., 2009).

1.10 Métodos de elaboración de una emulsión

La producción y la estabilidad de emulsiones con una distribución de tamaño de gotas pequeña han atraído considerable atención en la industria de alimentos, farmacéutica, y cosmética en los últimos años. (Jafari *et al.*, 2008). Las emulsiones se pueden fabricar utilizando una variedad de métodos, estos se clasifican en alta o de bajo consumo energía. El método de alta energía es utilizado por dispositivos mecánicos capaces de generar intensas fuerzas disruptivas que mezclan e interrumpen las fases de aceite y agua que conduce a la formación de pequeñas gotas de aceite. Los métodos de baja energía se basan en la formación espontánea de pequeñas gotas de aceite en los sistemas de aceite-emulsionado en agua. Esto ocurre cuando la solución o las condiciones ambientales se alteran, por ejemplo, la temperatura o composición. El tamaño de las gotas que pueden ser producidas depende del método utilizado, las condiciones de funcionamiento, y la composición del sistema (McClements, 2011).

1.11 Técnicas de emulsificación

Las técnicas de emulsificación son formas de mezclado para lograr emulsiones más eficientes, estas pueden ser producidas por dispositivos especialmente diseñados, incluyendo de alta presión, ultrasonidos, rotor-estator, y sistemas de membrana.

En estudios de laboratorio es más eficiente la producción de una emulsión en dos pasos, la primera es la conversión de fases oleosa y acuosa separadas en una emulsión gruesa, por lo general elaboradas con un rotor estator y con tamaños de gota de diámetros grandes, posteriormente la reducción del tamaño de gota usando otra técnica como son las altas presión (McClements, 2004; McClements, 2011; Jafari *et al.*, 2008)

1.12 Sistemas de alta presión

1.12.1 Sistema de rotor estator

Estos sistemas son ampliamente utilizados para emulsionar líquidos con viscosidad media a alta, el líquido se introduce en el molino coloidal en forma de una emulsión o como fases separadas, fluyendo a través de un espacio estrecho entre un disco giratorio (rotor) y un disco estático (estator). El conjunto de un rotor/estator consta de un rotor alojado concéntricamente en el interior del estator con dos o más palas y un estator, ya sea con ranuras verticales o inclinadas. A medida que el rotor gira, genera una presión menor para extraer el líquido dentro y fuera del rotor estator, resultando una circulación y una emulsificación.

Una de las dos fuerzas principales que pueden reducir el tamaño de gota es el impacto mecánico contra la pared debido a la alta aceleración de fluido. Otra fuerza es la tensión de cizallamiento en la brecha entre el rotor y el estator, que se genera por la rápida rotación del rotor. La intensidad de la tensión de cizallamiento se puede alterar variando el espesor de la brecha (alrededor de 50 a 1.000 μm), variando la velocidad de rotación (sobre 10,000 - 25,000 rpm). Otros parámetros son: la viscosidad de las fases en la emulsión, surfactantes, el diseño de rotor estator, tamaño, volumen y la relación de volumen de las dos fases (Jafari *et al.*, 2008).

1.12.2 Homogeneizador de válvula de alta presión

Son los métodos más populares de la formación de emulsiones finas en la industria alimentaria. Son dispositivos eficaces en la reducción del tamaño de las gotas en una emulsión gruesa. El homogeneizador tiene una bomba que succiona la emulsión gruesa en una cámara y luego la obliga a pasar a través de una válvula estrecha (Figura 1.3) a medida que la emulsión gruesa pasa a través de la válvula experimenta una combinación de fuerzas (turbulencia, cizallamiento y cavitación), estas fuerzas forman gotas más grandes que se dividen en otras más pequeñas.

Existen una variedad de diferentes diseños de válvulas que están disponibles para aumentar la eficacia en la interrupción de gotas dentro del homogeneizador. Se ha demostrado que el tamaño de la gota tiende a disminuir cuando aumenta la presión y número de ciclos, la tensión interfacial disminuye y aumenta la tasa de adsorción del emulsificante y la relación de viscosidad de la fase dispersa a continua (McClements, 2011).

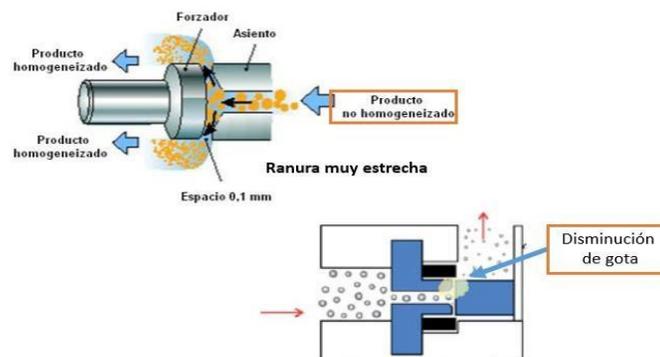


FIGURA 1.3. Válvulas de homogeneización por una y dos vías (McClements, 2011)

1.12.3 Microfluidización

En algunos aspectos microfluidizador son similares en diseño a homogeneizadores con válvula de alta presión, puesto que utilizan una bomba para forzar una emulsión gruesa

a través de un orificio estrecho a presiones elevadas para facilitar la interrupción de las gotas (McClements, 2011).

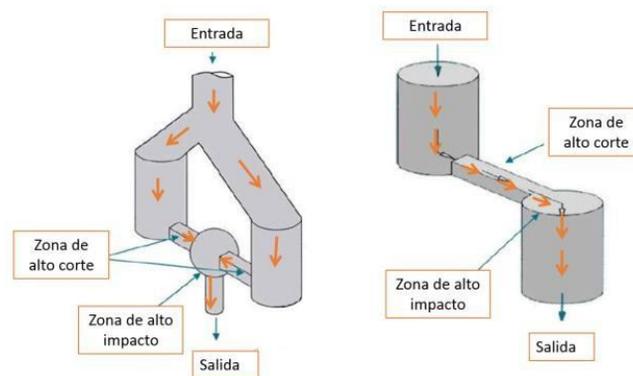


FIGURA 1.4. Cámaras de interacción por microfluidización (Persson, 2014)

La emulsión gruesa se ve forzada a pasar por microcanales entrada a alta presión, el canal está diseñado de manera que divide la emulsión gruesa en dos corrientes para la cámara en (Y) y para la cámara en (Z) la emulsiones viajan en una dirección (Figura 1.4). Las intensas fuerzas disruptivas generadas en las cámaras de interacción son muy eficaces en romper las gotas y la formación de emulsiones finas. Se han examinado que los principales factores que determinan el tamaño de las gotas producidas por microfluidizador utilizando ingredientes adecuados para la preparación de emulsiones y que el tamaño de gota tiende a disminuir con el aumento de presión de homogeneización, el aumento de número de ciclos, aumentando la concentración de emulsionante, y la disminución de la proporción de la viscosidad en la fase dispersa a continua (McClements, 2011).

1.12.4 Sonicación

En el método de sonicación se utilizan ondas ultrasónicas de alta intensidad (frecuencia > 20 kHz) para formar emulsiones que contiene gotas muy finas. Se pueden utilizar para homogeneizar las fases de aceite y agua separadas, o para reducir el tamaño de las gotas en una emulsión gruesa preexistente.

ANTECEDENTES

Los sonicadores son ampliamente utilizados en los laboratorios de investigación para producir pequeños lotes de nanoemulsiones. Estos dispositivos constan de una sonda ultrasónica que contiene un cristal piezoeléctrico que introduce ondas eléctricas en ondas de presión intensas.

La sonda se sumerge en la muestra a homogeneizar, generando fuerzas disruptivas intensas en su punta a través de una combinación de la cavitación, turbulencia (McClements, 2011).

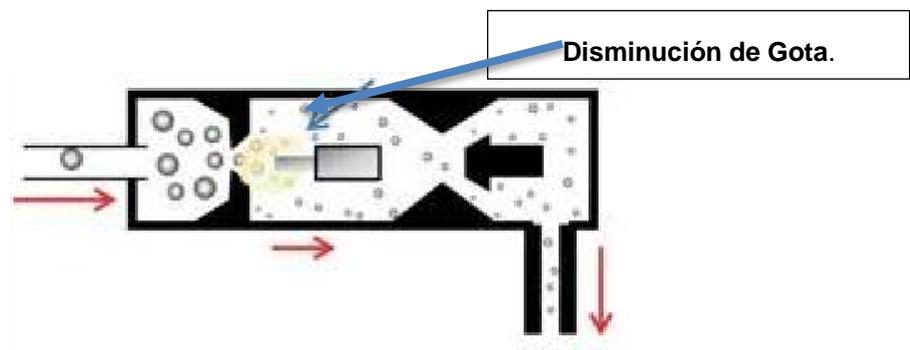


FIGURA 1.5. Homogeneizador por Ultrasonido (McClements, 2011)

Comparación de los sistemas de emulsificación.

Los dispositivos emulsionantes tienen una amplia variedad de diseño y capacidad funcional, la elección está determinada por una serie de factores como el volumen de la emulsión, viscosidad, concentración de emulsificante, condiciones de temperatura y la distribución final de tamaño de gota proporcionando una comparación de estos sistemas de elaboración de emulsiones.

La interrupción de la gotita en los sistemas de rotor y estator es generalmente menos eficiente que los dispositivos de alta presión ya que las zonas de dispersión de los sistemas de rotor estator usualmente tienen volúmenes más grandes. En consecuencia, a una densidad de energía constante y el caudal de volumen, la densidad de potencia en el método con rotor-estator es inferior y el tiempo medio de residencia es más largo

ANTECEDENTES

que en los dispositivos de alta presión. Por lo tanto, emulsiones que tienen tamaños de gota menores de $1\mu\text{m}$ no se puede lograr usando sistemas de rotor-estator. En la emulsificación por homogeneización por alta presión y sonicación, se ha demostrado que se producen gotas más pequeñas siendo más eficiente que los sistemas de rotor y estator. El principal problema es que de la sonicación es un método adecuado solo a escala de laboratorio, en cuanto a los métodos de alta presión, se logran tamaños de gota de $0,1\ \mu\text{m}$ y se puede tener una producción con altos rendimientos (Jafari, 2008).

TABLA 1.4. Comparación de sistemas para la producción de emulsiones

Sistema de Emulsificación	Rotor Estator	Alta Presión	Ultrasonido
Ejemplos	Mezcladores Agitadores Molinos coloidales	Homogeneizador de válvula Microfluidizador	Sonotrodos
Mecanismos de destrucción de gota	Esfuerzo cortante en flujo laminar y/o turbulento	Esfuerzo cortante y en el flujo turbulento y/o laminar cavitación	Cavitación en flujos micro-turbulentos
Rendimiento por Lote - Continuo	Medio a alto Continuo / Lote	Alto /Continuo	Bajo/ Lote
Tamaño mínimo de gota	$1.0\ \mu\text{m}$	$0.1\ \mu\text{m}$	$0.1-0.2\ \mu\text{m}$
Aplicación	Lab /Industrial	Lab /Industrial	Lab
Cambio de energía de entrada	Rotación en la exposición diseño de disco	Presión, recirculación diseño de la boquilla	Intensidad y frecuencia de ultrasonido
Tasa de adsorción necesaria de emulsionante	Baja a alta	Alta a muy alta	Mediano a alto

(Jafari *et al.*, 2008)

En el presente trabajo se decide trabajar con dos tipos de homogeneizadores, por válvulas de alta presión y por microfluidización para evaluar el efecto que tiene la concentración de glicerol, las altas presiones y número de ciclos en la estabilidad de las emulsiones O/W de vainilla natural libre de alcohol con y sin azúcar Por lo tanto se realiza una breve comparación de sistemas de homogeneización para producción de las emulsiones.

2 JUSTIFICACIÓN

La vainilla (*Vainilla planifolia*) es considerada como el saborizante de mayor importancia en el mundo. Sin embargo, su aplicación en alimentos es limitada ya que se comercializa en soluciones con etanol debido a que su composición es insoluble en agua, además no todas las personas consumen alcohol por sus condiciones religiosas o de salud.

Actualmente las emulsiones en la industria de alimentos son utilizadas para estabilizar mezclas de dos o más sustancias inmiscibles entre sí, siendo las emulsiones una excelente alternativa para incorporar vainilla en sistemas O/W y a si prolongar su vida de anaquel.

Por lo tanto, bajo la presentación de una emulsión de vainilla libre de alcohol este trabajo propuso evaluar el efecto que tiene la composición de glicerol, las altas presiones y el número de ciclos en las características fisicoquímicas de las emulsiones de vainilla con y sin azúcar

3 HIPÓTESIS

Es posible obtener una emulsión estable con tiempos largos de almacenamiento de vainilla libre de alcohol partiendo de un extracto natural, mediante la reducción de tamaño de partícula, al utilizar homogeneizadores de alta presión con ayuda de estabilizadores y emulsionantes

4 OBJETIVOS

4.1 General

Estudiar la estabilidad de emulsiones O/W de vainilla natural generada por altas presiones a partir de un extracto no alcohólico.

4.2 Específicos

- Evaluar el efecto de la composición y las altas presiones sobre las características fisicoquímicas de la emulsión
- Evaluar el efecto de la temperatura sobre la estabilidad durante el almacenamiento de las emulsiones

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos y Solventes

Todos los compuestos químicos y solventes utilizados fueron grado analítico o HPLC. Dentro de los solventes utilizados se encuentran ácido acético glacial (JT. BAKER), Metanol (Burdick y Jackson®), Agua (Burdick y Jackson®), Etanol (Merck). Los estándares se obtuvieron de Sigma Vainillina, Ácido vainílico, *p*-hidroxibenzaldehído y ácido *p*-hidroxibenzoico. Los emulsificantes Lecitina de Soya, (Pronot ultra), Tween20 (Sigma USA), Goma Guar (Sineergum), Glicerol (GOLDEN BELL).

5.2 Metodología

En el presente trabajo se evaluó el efecto que tiene la concentración de glicerol, las altas presiones y número de ciclos en la estabilidad de las emulsiones O/W de vainilla natural libre de alcohol con y sin azúcar. El trabajo se llevó a cabo como se muestran en la Figura 5.1 y 5.2 dividiéndolo en dos etapas; la primera es la evaluación de los factores que tienen mayor influencia en la elaboración de las emulsiones durante siete días, utilizándolas con un factorial $2^3 \times 3$ como se muestra en la Tabla 5.1, en la segunda etapa se almacenaron las emulsiones a temperaturas controladas, 15°C - 25°C - 35°C evaluando el efecto que tienen las temperaturas de almacenamiento en la estabilidad de la emulsión.

PRIMERA ETAPA. Elaboración de las emulsiones

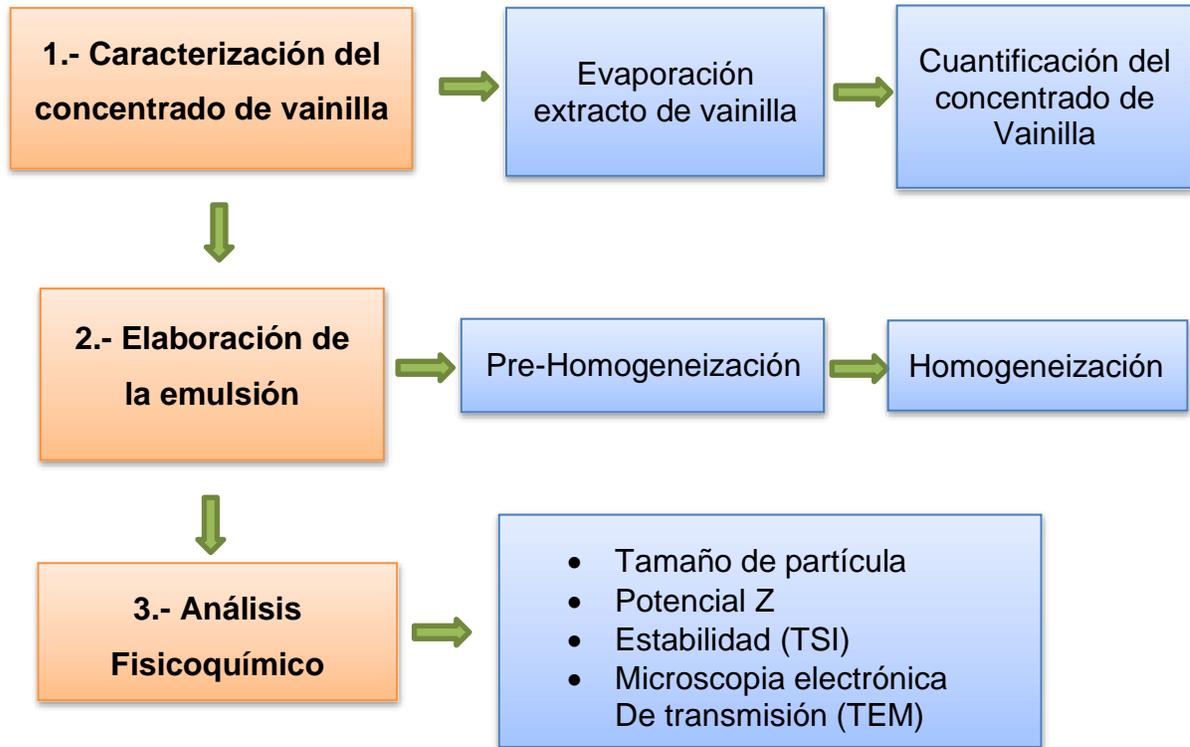


FIGURA 5.1. Elaboración de las emulsiones primera etapa

SEGUNDA ETAPA. Almacenamiento

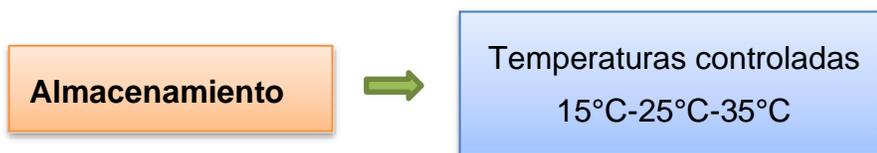


FIGURA 5.2. Almacenamiento

5.3 Diseño de experimentos

El diseño evalúa el efecto que tiene la presión, ciclos, glicerol y el azúcar en las emulsiones en la primera etapa del trabajo. Obteniendo un diseño de experimentos 2^3 * 3 realizando 24 experimento por duplicado Tabla 5.1.

TABLA 5.1. Diseño de experimentos

FACTORES	NIVELES
Presión.	200 y 400 Bar
Ciclos	5 y 9 Ciclos
Azúcar	Con y Sin Azúcar.
Glicerol.	3.5% ,7%, 10%

Posteriormente en la segunda etapa del trabajo se evaluó el efecto de las temperaturas de almacenamiento 15, 25 y 35°C en las mejores emulsiones de vainilla natural con y sin azúcar resultantes de la primera etapa.

5.4 Caracterización del concentrado de vainilla**5.4.1 Proceso de Evaporación**

Se realizó un proceso de evaporación a un lote de 60 L de extracto alcohólico de vainilla con un equipo rotavapor (R- 210 BUCHI) ejerciendo una evaporación al vacío en un rango de 70 mbar a 25 mbar a temperatura constante de 25°C, procesando 1 L /h de extracto de vainilla con alcohol, eliminando 100% de etanol existente en el extracto.

5.4.2 Análisis por cromatografía de líquidos

Mediante la técnica analítica por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se realizó la cuantificación de los compuestos químicos principales presentes en el extracto alcohólico de vainilla; cuantificando vainillina, ácido vainílico, *p*-hidroxibenzaldehído y ácido *p*-hidroxibenzoico (Pérez, 2011) modificando las condiciones del Método Oficial de la AOAC 990.25 para la cuantificación de los compuestos mencionados.

Las condiciones cromatográficas se realizaron a una velocidad de flujo 1 mL/min (Binary Pump Waters1525) detección UV a 254 nm (Dual λ Absorbance Detector Waters 2487) con una inyección de 10 μ L (Autosampler Waters 717 plus).

La fase móvil se adiciona por gradiente (Curva 8) mostrando la relación en la Tabla 5.2 con 800 mL agua acidificada, adicionando 1 mL ácido acético en la bomba B y metanol 95% en la bomba A. Se utilizó una columna cromatográfica (DIONEX) C18 con 5 μ m de partículas acero inoxidable 4.6 x 150 mm.

TABLA 5.2. Gradiente de concentración (CURVA 8)

Tiempo/ min	% Bomba A	% Bomba B
0	0	100
35	95	5
40	95	5

Curva de calibración

Se preparó una solución madre con estándares de vainillina, ácido vainílico, *p*-hidroxibenzaldehído y ácido *p*-hidroxibenzoico, realizando curvas de calibración para cada uno de los compuestos, inyectando concentraciones de 5 μ L, 10 μ L, 15 μ L, 20 μ L, 25 μ L.

Preparación de la muestra

Se realizó una dilución 1:10 en Etanol al 99.9% con un matraz aforado de 10 mL filtrando la muestra con filtros de membrana de 0.45 µm (Millipore PVDF). Cabe mencionar se preparó de igual manera la solución madre utilizada en la curva de calibración.

5.5 Elaboración de la emulsión

En la Tabla 5.3 y 5.4 se muestra la formulación para la elaboración de las emulsiones de vainilla con y sin azúcar, todas las formulaciones contienen una concentración de vainillina 0.11 g/100 mL de emulsión.

TABLA 5.3. Formulación de emulsiones de vainilla con azúcar

Compuesto	Formulación A%	Formulación B%	Formulación C%
Concentrado de Vainilla	33.5	33.5	33.5
Lecitina	0.5	0.5	0.5
Tween 20	1.0	1.0	1.0
Goma guar	0.25	0.25	0.25
Glicerol	3.5	7	10
Azúcar	5	5	5
Agua	56.25	52.75	49.75

TABLA 5.4. Formulación de emulsiones de vainilla sin azúcar

Compuesto	Formulación A%	Formulación B%	Formulación C%
Concentrado de Vainilla	33.5	33.5	33.5
Lecitina	0.5	0.5	0.5
Tween 20	1.0	1.0	1.0
Goma guar	0.25	0.25	0.25
Glicerol	3.5	7	10
Agua	61.25	57.75	54.75

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizó el efecto de los factores mostrados en el diseño de experimentos en la Tabla 5.1 para todas las emulsiones procesadas. En la Tabla 5.5 y 5.6 se muestra el tratamiento que recibió cada una de las emulsiones evaluando la concentración de glicerol, presión y el número de ciclos en las emulsiones con azúcar y sin azúcar, almacenadas por 7 días a 25°C.

TABLA 5.5. Tratamientos en emulsiones de vainilla natural con azúcar

Emulsión	Presión (bar)	Ciclos	Glicerol (%)
E1-CA	200	5	3.5
E2-CA	400	5	7
E3-CA	200	5	10
E4-CA	400	5	3.5
E5-CA	200	5	7
E6-CA	400	5	10
E7-CA	200	9	3.5
E8-CA	200	9	7
E9-CA	200	9	10
E10-CA	400	9	3.5
E11-CA	400	9	7
E12-CA	400	9	10

TABLA 5.6. Tratamiento en emulsiones de vainilla natural sin azúcar

Emulsión	Presión (bar)	Ciclos	Glicerol (%)
E1-SA	200	5	3.5
E2-SA	400	5	7
E3-SA	200	5	10
E4-SA	400	5	3.5
E5-SA	200	5	7
E6-SA	400	5	10
E7-SA	200	9	3.5
E8-SA	200	9	7
E9-SA	200	9	10
E10-SA	400	9	3.5
E11-SA	400	9	7
E12-SA	400	9	10

5.6 Pre – Homogeneización

Las pre-emulsiones se elaboraron con un homogeneizador tipo rotor-estator (Ultra Turrax T- 25) a 15000 rpm durante 5 min a temperatura de 15°C mezclando, Lecitina de Soya, Polisorbato 20 (Tween20), Goma Guar, Concentrado de vainilla agua y glicerol.



FIGURA 5.3. Homogeneizador por rotor estator (Ultra Turrax T-25)

5.6.1 Homogeneización por válvulas de alta presión

Para las emulsiones finas después del proceso de homogeneización por rotor estator, se utilizó un homogeneizador de válvulas de alta presión (APV 1000 Lab Series), evaluando presiones de trabajo y ciclos. El líquido se hace pasar a través de las válvulas de homogeneización, enviando el flujo a gran velocidad por el efecto de un pistón. Las condiciones de proceso a las cuales se trabajaron en la primera etapa se muestran en las Tablas 5.5 y 5.6.



FIGURA 5.4. Homogeneizador por válvulas de alta presión

5.6.2 Homogeneización por microfluidización

En la etapa de almacenamiento se analizan dos homogeneizadores de alta presión el primer equipo es por homogeneización de válvulas de alta presión y el segundo por microfluidización (Microfluidics M-110) evaluando el efecto en la estabilidad en almacenamiento a 15°C, 25°C, 35°C en las emulsiones de vainilla. Las condiciones a optimas a evaluar en el almacenamiento de las emulsiones con y sin azúcar E8-CA; E2-SA son 200 bar 9 ciclos y 400 bar 5 ciclos.



FIGURA 5.5. Homogeneizador por microfluidización

5.7 Análisis fisicoquímico

5.7.1 Análisis del Tamaño de partícula y Potencial Z

Se determinó la medición del tamaño de partícula e índice de polidispersidad en un equipo ZetasizerNano-SZ90 (Malvern Instruments) empleando las técnicas por Dispersión de Luz Dinámica (DLS) Su intervalo de detección es de 0.3 nm a 5 µm, las muestras se diluyeron con agua destilada desionizada con un factor de dilución 1:1000

MATERIALES Y MÉTODOS

(emulsión/agua) utilizando celdas Versa Flour Cuvette 170-2415, adicionando 1 mL de la dilución.

Para la determinación potencial z se utilizó la técnica por micro-electroforesis laser Doppler utilizando el mismo factor de dilución que en el tamaño de partícula utilizando celdas electroforéticas del Zetasizer (Nano-ZS90). Este procedimiento se realiza para todas las emulsiones y las mediciones se realizaron por triplicado a una temperatura de 25°C con un angulo de 90°.



FIGURA 5.6. ZetasizerNano (SZ90)

5.7.2 Análisis Tamaño de partícula e índice de estabilidad (TSI)

La estabilidad y el tamaño de partícula en las emulsiones se evaluaron utilizando un analizador óptico de dispersión de luz Turbiscan® LAB EXPERT, mediante la técnica de dispersión múltiple de luz estática por transmisión y retrodispersión; la luz emitida se encuentra en rango de la longitud de onda al infra rojo cercano 880 nm (McClements, 2007) depositando 40 mL la muestra en una celda de vidrio cilíndrica, y se analizó mediante un haz de luz emitido que escanea la celda de abajo hacia arriba. (Formulacion, 2014).

El seguimiento en la estabilidad de las emulsiones de vainilla en la primera etapa del trabajo se realizó durante 7 días, en la segunda etapa se evaluó el almacenamiento durante 42 días a temperaturas de 15°C - 25°C - 35°C. Por otra parte para el cálculo del tamaño de partícula se midió el índice de refracción de la fase continua y dispersa.



FIGURA 5.7. Turbiscan Lab

5.7.3 Análisis estructural de la emulsión

Para realizar el análisis estructural de las emulsiones de vainilla, se capturaron y analizaron micrografías en el Instituto de Ecología (INECOL) en la ciudad de Xalapa, Ver, en un microscopio electrónico de trasmisión (TEM-1400) alcanzando hasta 120kV con una cámara de alta resolución Gatan ES1000W de 11 megapixels y montaje lateral elevado, esto permite obtener imágenes con gran amplitud de campo y excelente nitidez. Las imágenes creadas en el software de control Digital Micrograph.

Por otra parte para manejo de la muestra se adicionaron 10 μ L de emulsión en una rejilla de cobre cubierta con carbón durante 1 minuto, posteriormente se realizó una tinción adicionando 10 μ L de Ácido Fosfotungstico a Ph 7 secando la muestra a temperatura ambiente durante 1 hora.



FIGURA 5.8. Microscopio electrónico de trasmisión (TEM-1400)

5.7.4 Análisis estadístico

Todos los experimentos se desarrollaron por duplicado, los datos se presentan como promedios \pm desviación estándar y todos los datos fueron tratados con análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA) con el software MiniTab 16.1 (Minitab Inc., State Collage, Pennsylvania). Las diferencias de los valores promedios fueron comparados usando la prueba Tukey de múltiples rangos, el nivel de significancia se definió como $p \leq 0.05$.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Proceso de evaporación

Se realizó eliminación del solvente en los extractos etanólicos de vainilla con un proceso de rota-evaporación (Galetto, 1978; Ruiz, 2001) obteniendo como resultado 15 L de concentrado de vainilla a partir de extracto de vainilla con alcohol. El proceso consistió en realizar una evaporación al vacío realizando una disminución de 5 mbar cada 5 minutos con un rango de 70 mbar a 25 mbar durante 60 min a temperatura constante de 25°C como se muestra en la Figura 6.1 eliminando el 100% etanol.

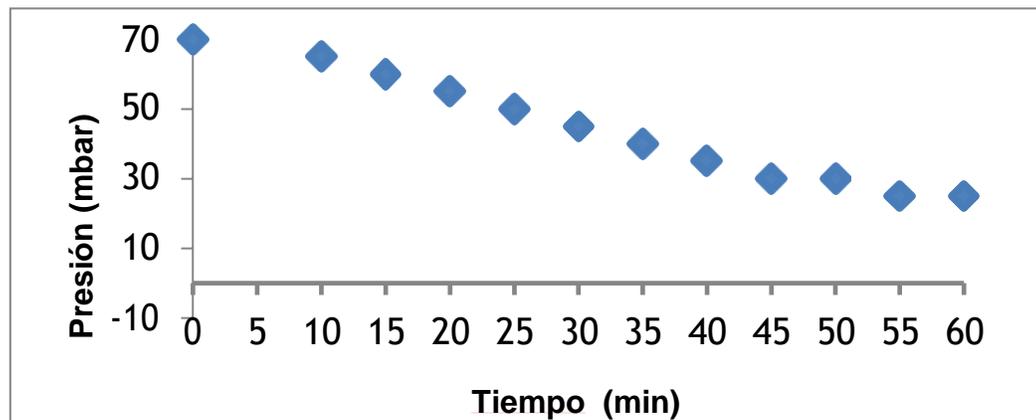


FIGURA 6.1 .Rampa de presiones para mostrar la evaporación



FIGURA 6.2. Concentrado de vainilla

6.1.1 Método cromatográfico (HPLC)

Se modificó el método oficial de la AOAC (990.25) para la identificación de los compuestos principales vainilla, ácido vainílico, *p*-hidroxibenzaldehído, y ácido *p*-hidroxibenzoico, las modificaciones son descritas en el apartado 5.4.2.

Se realizaron curvas de calibración Figura 6.3 de los 4 compuestos, por el método de cuantificación por estándar externo que consiste en inyectar la masa por miligramo del componente a cuantificar inyectando 5 µL, 10 µL, 15 µL, 20 µL, 25µL de la solución madre.

Por otra parte la identificación de los compuestos químicos presentes en el concentrado de vainilla, se muestra el cromatograma del concentrado de vainilla, obteniendo los tiempos de retención y concentraciones en el extracto mostradas en la Figura 6.4.

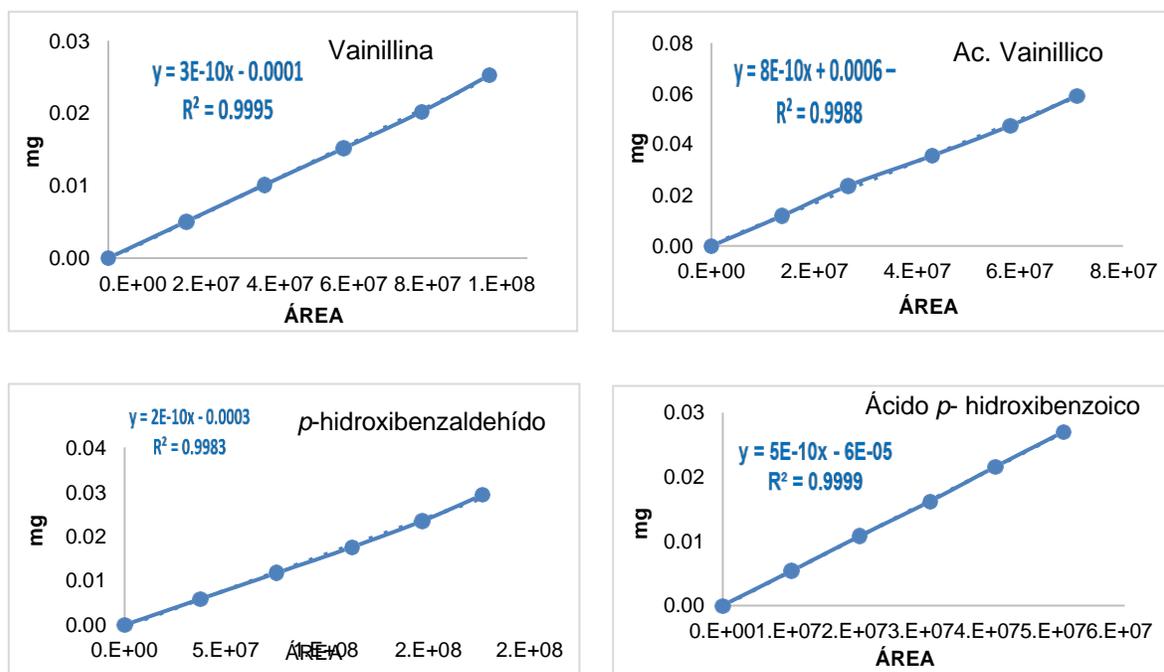
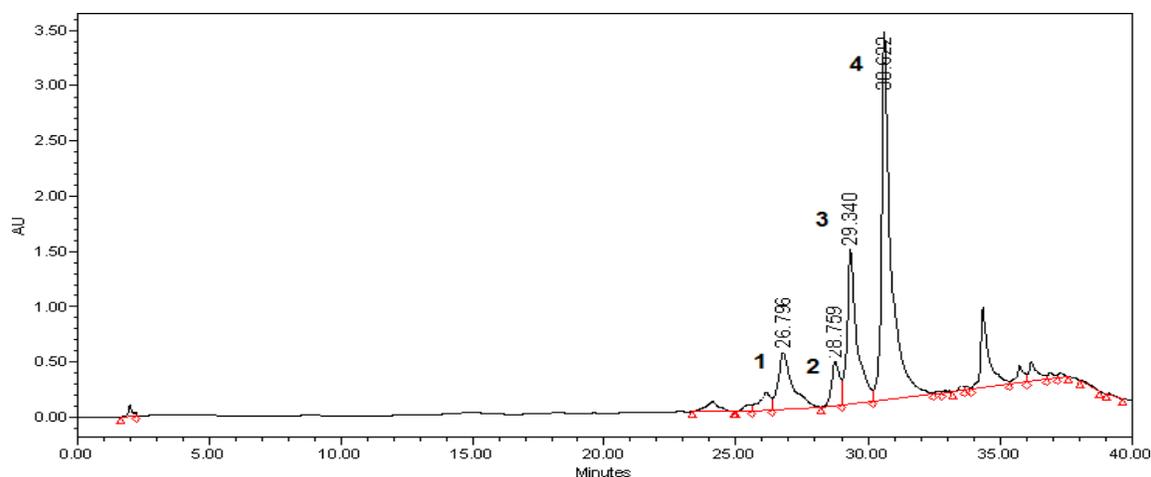


FIGURA 6.3. Curvas de calibración de compuestos Vainillina, Ac. Vainílico, *p*-hidroxibenzaldehído, Ácido *p*-hidroxibenzoico



Compuesto	Tiempo de Retención (RT)	Concentración g/100mL
Ácido p-hidroxibenzoico (1)	26.7	0.045 ±0.01
p-Hidroxibenzaldehído (2)	28.7	0.033 ±0.04
Ac. Vainílico (3)	29.3	0.139 ±0.01
Vainillina (4)	30.6	0.407 ±0.01

FIGURA 6.4. Cromatograma concentrado de Vainilla

En la norma Oficial mexicana NOM 182-SCFI- 2011 (Diario Oficial de la Federación, 2011) sección “7.3. Proporciona Especificaciones fisicoquímicas donde se establece los compuestos de mayor importancia presentes en el extracto de vainilla natural, (ácido p-hidroxibenzoico, el ácido vainílico y el p-hidroxibenzaldehído) los cuales se presenta en el concentrado de vainilla (Romero, 2016).

Para la vainillina (4-hydroxy-3methoxy-benzaldehyde) Waliszewski *et al.*, 2007 presentan diferentes condiciones cromatográfica para la elución de vainillina descritas por diferentes autores, dentro de las variaciones cromatográfica se encuentra el aumento del caudal, la concentraciones de la fase móvil y el tipo de columna, encontrando tiempos de retención de 7 minutos hasta 36 minutos, por otra parte Jenkins y Waite (2008) lograron una separación isocrática de 4-hidroxibenzaldehído, vainillina y cumarina en un tiempo de 5 minutos. Por lo tanto en la Figura 6.4 el tiempo de retención para la vainillina no es el mismo reportado por Waliszewski (2007) esto depende de las condiciones cromatográfica lo mismo sucede para p-hidroxibenzoico, el ácido vainílico y el p-hidroxibenzaldehído reportado en el método oficial de la AOAC (990.25).

6.1.2 Preliminares en la emulsión

Se elaboró una emulsión de vainilla con azúcar evaluando doce ciclos y tres presiones con una formulación que consta con un 10% de concentrado de vainilla, 1% Tween20, 0.5% Lecitina de Soya, 0.25% Goma Guar, y 30% glicerol (Monroy, 2013). Esta emulsión se realizó para determinar las condiciones óptimas de presión y número de ciclos, posteriormente estas condiciones se evalúan en el proceso para elaborar emulsiones de vainilla con y sin azúcar.

Las emulsiones de vainilla evaluadas a presiones de 200 y 400 bar con 12 ciclos el tamaño de partícula tiende a disminuir, a 200 bar con 5 y 9 ciclos el tamaño de partícula es de 184.2 y 154 nm siendo los valores más bajos, observando un aumento considerable a 200 nm en el ciclo 12, la emulsión procesada a 400 bar, la tendencia es a la reducción de tamaño de partícula de 263 a 200 nm durante los 12 ciclos no siendo los valores más bajos. De manera contraria la emulsión procesada a 600 bar la tendencia es al aumento del tamaño de partícula observando este aumento desde el primer ciclo de 230 a 526.7 nm durante los 12 ciclos

En la Figura 6.5 las gráficas describen el efecto que tiene el número de ciclos y las presiones 200 bar, 400 bar y 600 bar con 12 ciclos en el tamaño de partícula, encontrando que las mejores condiciones de proceso para la emulsión de vainilla se encuentran en el rango de los 200 a 400 bar de 5 a 9 ciclos. Definiendo las presiones y los ciclos para el trabajo.

En la Figura 6.6 se muestran los valores de tamaños de partícula más bajos en el rango de 200 y 400 bares, por lo tanto se utilizan estas presiones para el resto de los experimentos. Por otra parte es necesario saber las condiciones de proceso a evaluar ya que puede existir un sobre procesamiento en la emulsión, repercutiendo en el aumento del tamaño de partícula (Qian y McClements, 2011). Como se observa en la emulsión procesada a 600 bar.

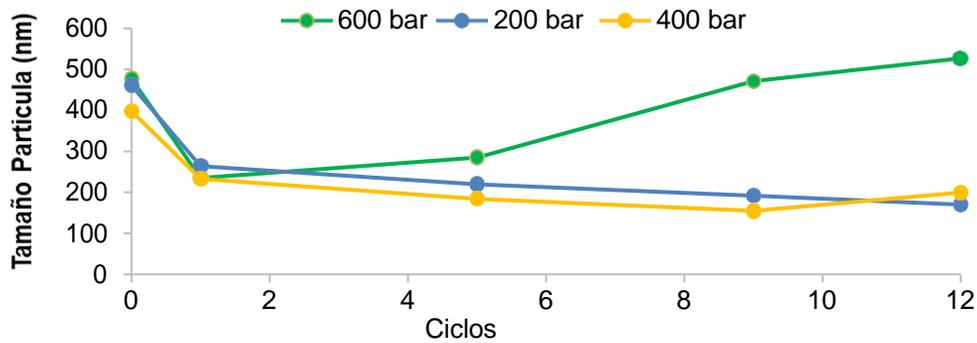


FIGURA 6.5. Evolución de tamaño de partícula en emulsión de vainilla

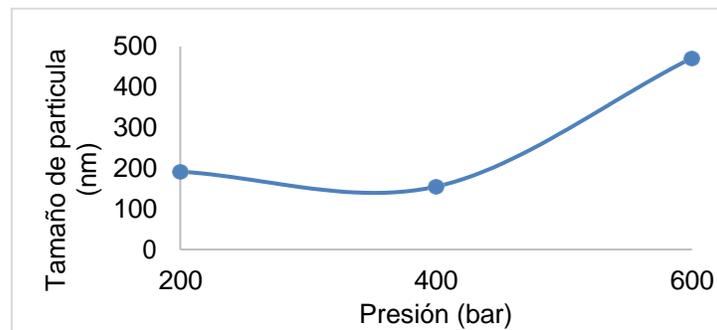


FIGURA 6.6. Efecto de la presión en el tamaño de partícula

6.2 Elaboración de las emulsiones

Se realizaron adaptaciones al trabajo de Monroy, (2013) en el proceso de elaboración en la emulsión, la formulación de las emulsiones descrito en el apartado 5.5. Dentro de la primera etapa del trabajo se realizaron 24 emulsiones por duplicado evaluando los factores descritos en la Tabla 5.1. Como resultado en las cinéticas de tamaño de particular, índice de polidispersidad, potencial z y estabilidad se empleó la técnica descrita en la sección 5.9.1 por Dispersión de Luz Dinámica (DLS), micro-electroforesis laser Doppler, con respecto al tamaño y al índice de estabilidad del Turbiscan (TSI) se utilizó la técnica dispersión múltiple de luz estática descrita en la sección 5.9.2, por transmisión y retrodispersión, durante 7 días.

6.2.1 Parámetros Fisicoquímicos evaluados por Turbiscan Lab

Para el análisis del TSI y tamaño de partícula se decidió evaluar las pendientes observando la tendencia al fenómeno de inestabilidad de cada emulsión, Los datos obtenidos fueron sometidos a pruebas de Tukey y la información se procesó en el software MiniTab 16.1 (Minitab Inc., State Collage, Pennsylvania). Por otra parte cada punto representado en las Figuras 6.7 y 6.8 una cinética de 7 días de cada emulsión procesada con y sin azúcar.

En la Figura 6.7 se observa una diferencia significativa mediante la prueba de Tukey en el tratamiento de las emulsiones con azúcar 1 y 8. La emulsión 1 se descartó para la evaluación ya que presentaba floculación a diferencia de la emulsión 8.

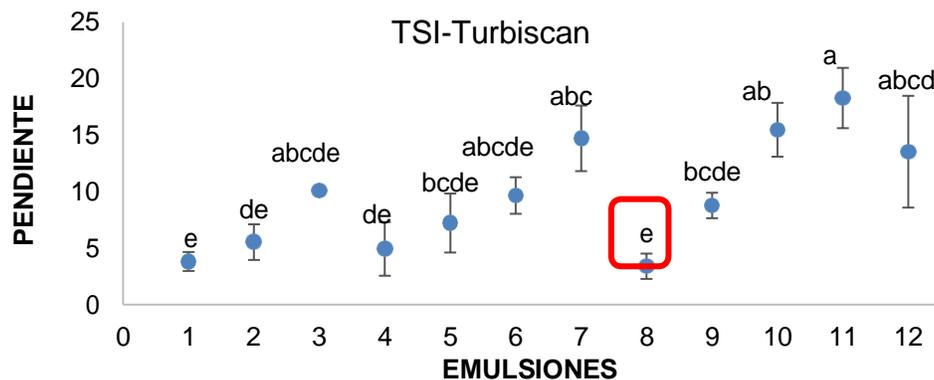


FIGURA 6.7. Análisis estadístico en emulsiones con azúcar

En la Figura 6.8 se muestra una diferencia significativa en el tratamiento en la emulsión 2 sin azúcar esto pudiera deberse a la manera de ser procesada, influyendo la presión y el número de ciclos, obteniendo una menor dispersión en los datos con una disminución del tamaños de partícula, al aumentar la concentración de glicerol la emulsión se vuelve más viscosa impidiendo la aglomeración de las partículas; es decir favorece la formación de sistemas mono dispersos (McClements, 2004; Chanasattru, 2009; Qian y McClements, 2011).

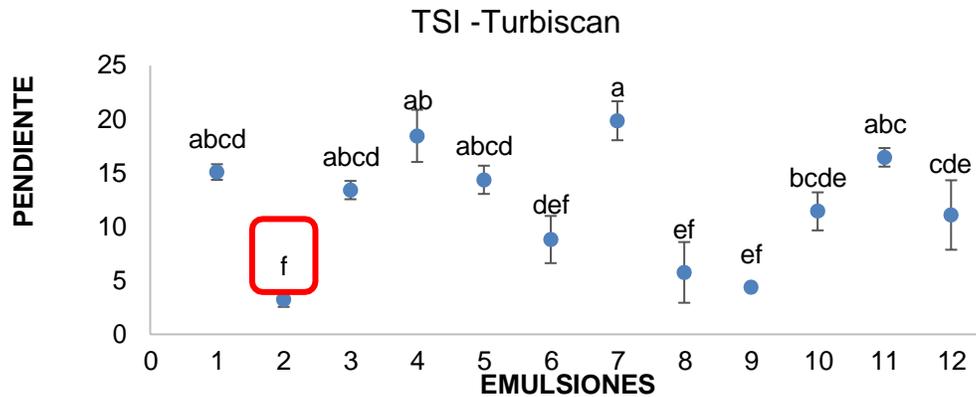


FIGURA 6.8. Análisis estadístico en emulsiones sin azúcar

El resultado de las mejores emulsiones fue confirmando en la Figura 6.9 y 6.10 donde se observa la cinética de desestabilización en la emulsión ocho con azúcar, y la emulsión dos sin azúcar siendo las más estables, ya que las emulsiones presentan Índice de Turbiscan (TSI) bajos, indicando una mayor estabilidad durante los 7 días de almacenamiento en comparación con las demás emulsiones.

Adicionalmente Qian y McClements (2011) modificaron la concentración de glicerol de la fase continua para la disminución del tamaño de partícula, evaluando el efecto de la viscosidad al adicionar diferentes concentraciones de glicerol (0-50% p/p) antes de realizar la homogeneización, encontrando una reducción de tamaño al incrementar la concentración de glicerol obteniendo tamaños de 127 nm con 0% de glicerol a 80 nm con 50% de glicerol utilizando como emulsificantes SDS al 2.5%.

Wooster *et al.*(2008) con la adición de polietilenglicol y McClements, 2004 con el incremento en la concentración de glicerol en la fase continua en sus emulsiones, conlleva a la disminución del tamaño de partícula y al aumento de la viscosidad retardando la difusión de las moléculas del soluto a través de la solución promoviendo la estabilidad además al adicionar estas sustancia como co-disolvente como el glicerol, ayuda a los sistemas a la solubilización y a la no formación de cristales y precipitación de los compuestos bioactivos.

RESULTADOS

(Maskan y Gögüs, 2000) demostraron que el efecto del azúcar aumenta la estabilidad de las emulsiones ya que el contenido de sólidos y la viscosidad aumenta en el alimento. En el caso de las emulsiones de vainilla la concentración de azúcar es la misma para todas las emulsiones analizadas, para procesar la emulsión con azúcar es necesario utilizar una homogeneización a 200 bar con 9 ciclos ya que la emulsión tiende a ser más viscosa y requiere mayor número de ciclos, a diferencia de la emulsión sin azúcar que solo es necesario 400 bar con 5 ciclos

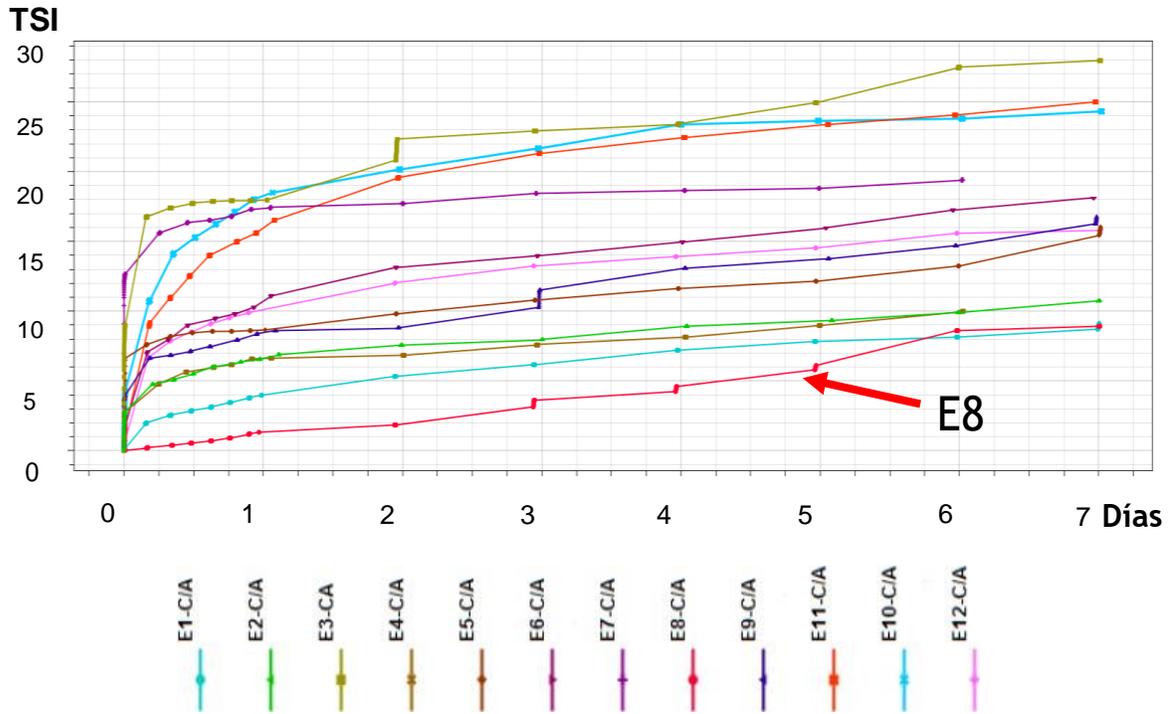


FIGURA 6.9. Cinética de estabilidad en emulsiones con azúcar

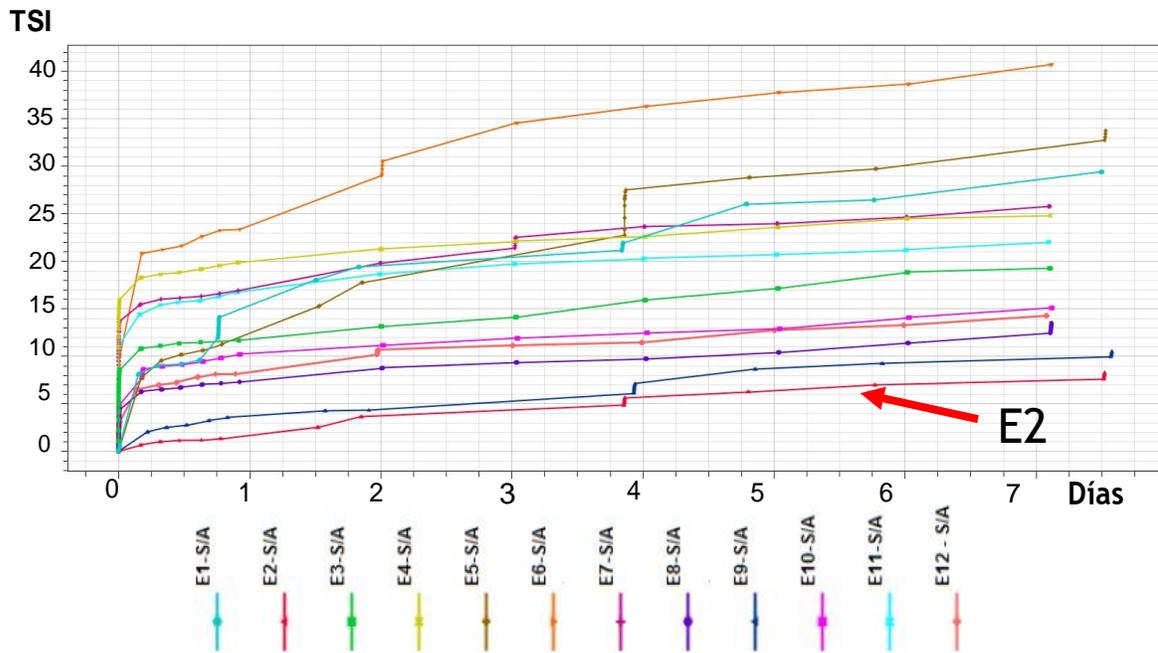


FIGURA 6.10. Cinética de estabilidad en emulsiones sin azúcar

RESULTADOS

En las Figuras 6.11 y 6.12 se muestran todas las emulsiones con azúcar y sin azúcar procesadas, obteniendo como resultado la emulsión E8-CA y E2-CA como las emulsiones óptimas para la etapa de almacenamiento. Por otra parte analizaron las emulsiones 12-CA y 11-SA ya que a diferencia de las demás, estas dos emulsiones no presentaron fenómenos de inestabilidad, esto se decidió por que al observar las emulsiones presentaron buen comportamiento de estabilidad en ambas emulsiones, durante los 7 días de almacenamiento

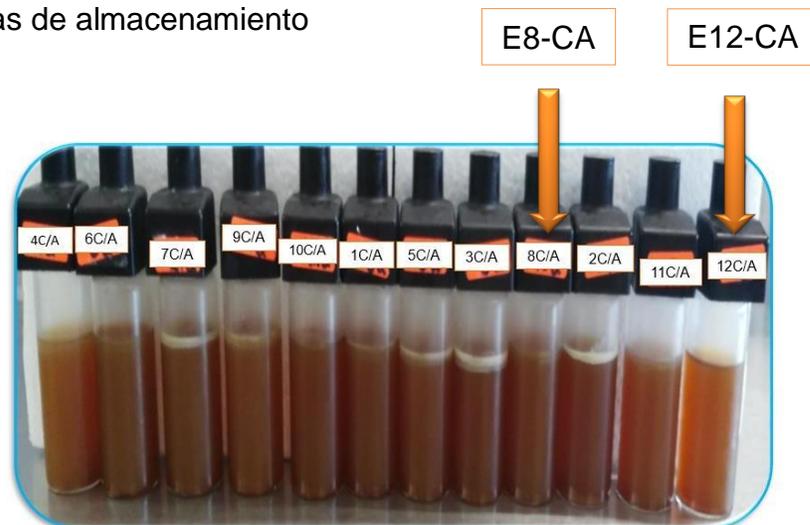


FIGURA 6.11. Emulsiones con azúcar

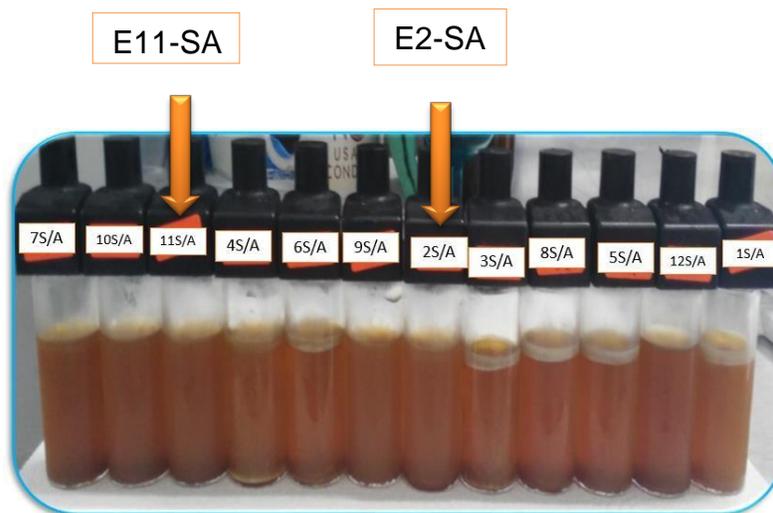


FIGURA 6.12. Emulsiones sin azúcar

6.2.2 Parámetros fisicoquímicos evaluados por ZetasizerNano

En la Figura 6.13 se describe la evolución del tamaño de partícula en una emulsión de vainilla sin azúcar, donde se observa una dispersión en todas las emulsiones procesadas debido al dinamismo de la partícula durante los 7 días.

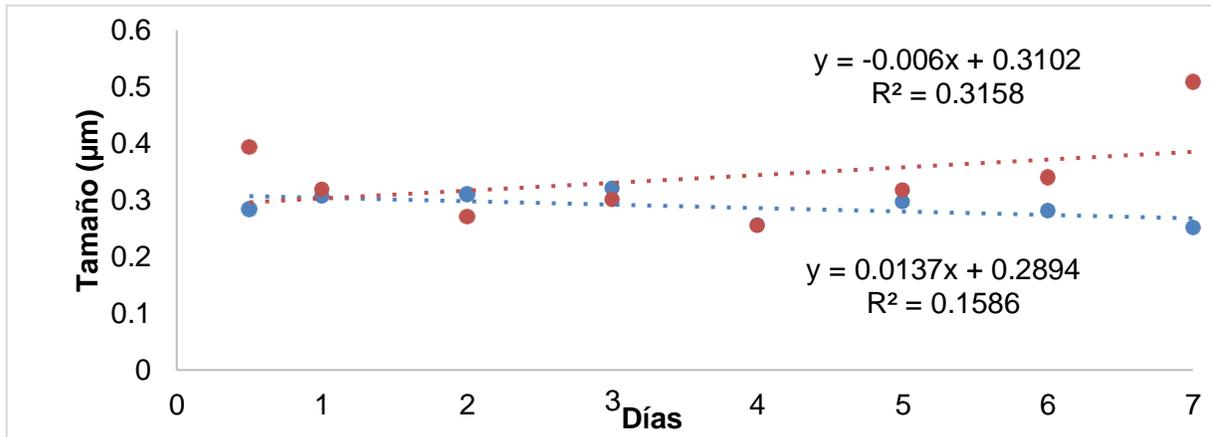


FIGURA 6.13. Evolución de tamaño de partícula en emulsión de vainilla

Se toma como ejemplo la Figura 6.13 para representar que en todas las emulsiones evaluadas por tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial z existe la misma tendencia a la dispersión de los datos, esto puede atribuirse a tres factores; la viscosidad debido a la concentración de glicerol, a la velocidad con la que se mueve la partícula (Wooster, 2008; McClements, 2004; Qian y McClements, 2011) y a la manera de tomar la muestra, ya que el muestreo se realizó en el mismo punto de la celda encontrando diferentes tamaños de partícula por lo antes mencionado.

Las gráficas mostradas en la Figuras 6.14 y 6.15 no presentan diferencia significativa entre los tratamientos de cada una de las cinéticas evaluadas, los datos obtenidos fueron sometidos a pruebas de Tukey y la información se procesó en el software MiniTab 16.1 (Minitab Inc., State College, Pennsylvania).

Obteniendo como resultado que la prueba de Tukey no encuentra diferencia significativa en cada una de las cinéticas evaluadas esto indica que la técnica por Dispersión de Luz

RESULTADOS

Dinámica (DLS) y micro-electroforesis lasser Dopple no fue la mejor opción para evaluar estabilidad en las emulsiones de vainilla con y sin azúcar. Por tal motivo en las siguientes secciones no se presentan resultados sobre la dispersión de la distribución del tamaño de partícula y se decide evaluar todas las emulsiones mediante el índice de estabilidad del Turbiscan (TSI).

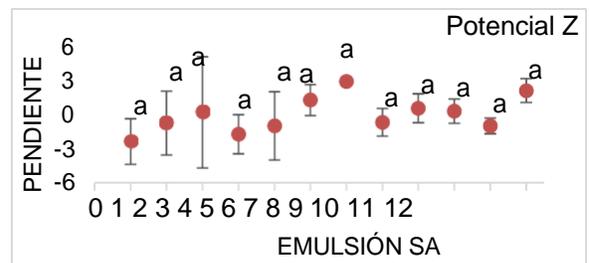
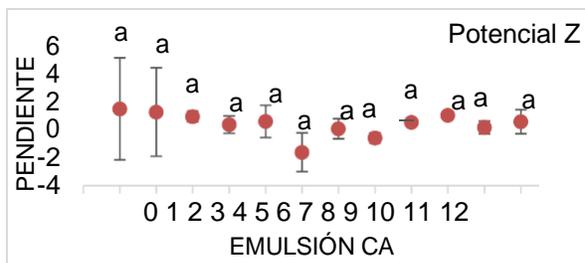
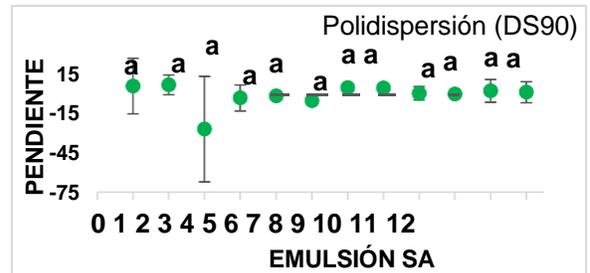
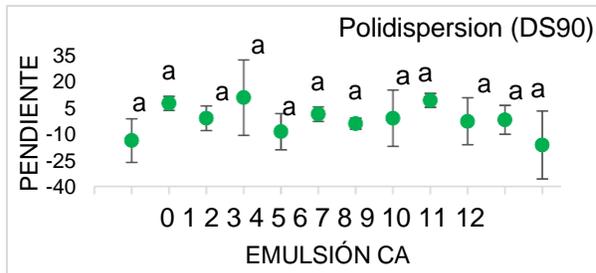
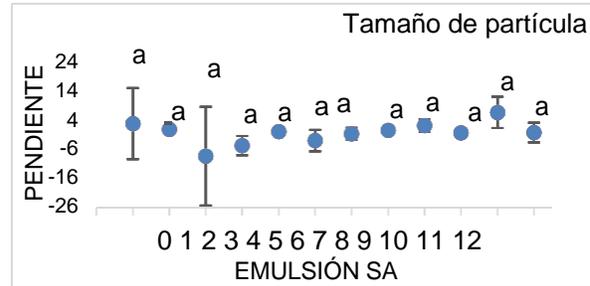
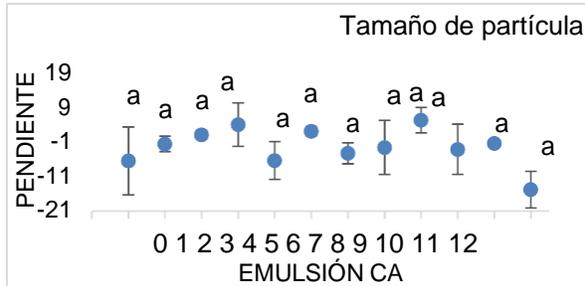


FIGURA 6.14. Análisis estadístico en emulsiones con azúcar evaluando Tamaño de partícula, Índice de polidispersión

FIGURA 6.15. Análisis estadístico en emulsiones sin azúcar evaluando Tamaño de partícula, Índice de polidispersión

6.2.3 Estabilidad en emulsiones de vainilla procesadas por homogeneizador de válvulas alta presión.

Para la segunda etapa del trabajo se almacenaron las emulsiones de vainilla con y sin azúcar 15°C, 25°C y 35°C durante 42 días. En la Figura 6.16 y 6.17 se presenta el análisis estadístico evaluando las cuatro emulsiones óptimas obtenidas en la primera etapa del trabajo. Los datos se analizaron mediante la prueba de Tukey evaluando las pendientes analizando la tendencia que presentan las emulsiones con respecto a la inestabilidad y al tamaño de partícula en almacenamiento.

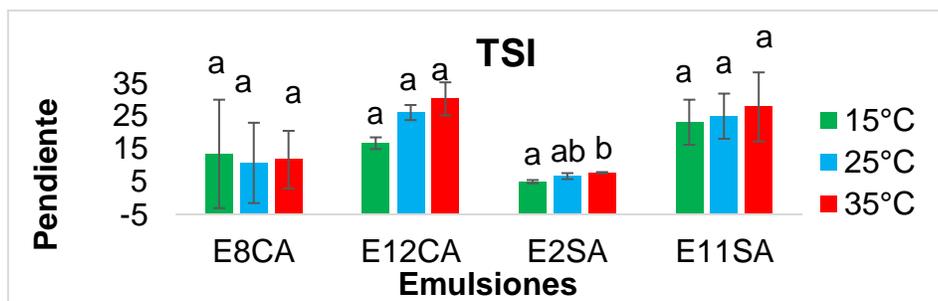


FIGURA 6.16. Análisis estadístico sobre la pendiente (TSI)

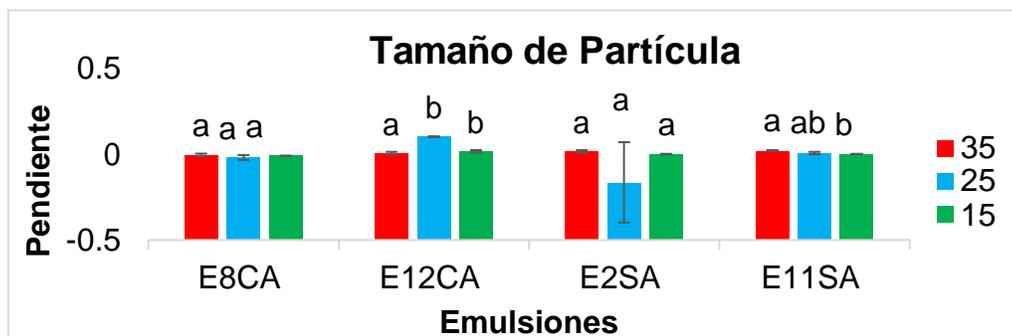


FIGURA 6.17. Análisis estadístico sobre la pendiente en tamaño de partícula

En el caso del índice de estabilidad (TSI) Figura 6.16 la emulsión E2-SA se observa claramente que existe una diferencia en el almacenamiento de 15°C y 35°C, diferencia que no muestran las otras emulsiones. Con respecto al análisis del tamaño partícula

RESULTADOS

Figura 6.17 la emulsión E12-CA presenta una diferencia en el tamaño de partícula al almacenarla a 35°C mientras que en la emulsión E11-SA muestra diferencia a 15°C y 35°C. El resultado mostrado en la Figuras 6.17 y 6.18 no proporcionan información suficiente para evaluar comportamiento del almacenamiento mediante el análisis de Tukey.

Esto puede deberse a que la velocidad con la que se mueven las partículas en la emulsión forman comportamientos diferentes y crean dispersiones muy altas en cada una de las cinéticas, existiendo un cambio en la viscosidad cuando cambia temperatura (Shinoda, 1969; Hemmingsen *et al.*, 2004).

La Figura 6.20 muestra las cinéticas de inestabilidad y tamaño de partícula de la emulsión con azúcar E8-CA, con respecto a la gráfica del TSI se observa claramente el efecto que tienen las temperaturas de almacenamiento en la emulsión, existiendo fenómeno de inestabilidad en el día 21 a los 35°C, las temperaturas de 15°C y 25°C no presentan inestabilidad siendo estable durante los 42 días.

En la cinética del tamaño de partícula se presentan al inicio dispersiones en los tamaños de partícula variando 0.8 μm a 1.2 μm , tomando en cuenta que las emulsiones llevan el mismo tratamiento. En la evolución de la cinética existe un aumento de tamaño de partícula en un rango de 0.95 μm a 1.2 μm a 35°C, las emulsiones almacenadas a 15°C y 25°C presentan menores tamaños de partícula, aumentando la estabilidad. En la Figura 6.18 se muestra una imagen de las emulsiones confirma el resultado descrito anteriormente presentando floculación en la emulsión almacenada a 35°C.



FIGURA 6.18. Emulsión con azúcar E8-CA

RESULTADOS

Por otra parte en la Figura 6.21 de igual manera se describen cinéticas de inestabilidad y tamaño de partícula para la emulsión sin azúcar E2-SA, en la cinética del TSI se muestra la inestabilidad al día 21 a 35°C y al día 29 a 25°C, mostrando un efecto positivo en la temperatura de almacenamiento de 15 °C. Para confirmar el resultado en la Figura 6.19 se muestra el fenómeno de floculación en las emulsiones almacenadas a temperaturas de 25°C y 35°C.



FIGURA 6.19. Emulsión sin azúcar E2-SA

Cortés *et al.*(2009) trabajaron con un homogeneizador de alta presión por reducción de válvulas evaluando el efecto de la temperatura durante el proceso de homogenización obteniendo como resultado que al incrementar la presión en la emulsión se genera un aumento del tamaño de partícula modificando la viscosidad en la fase continua por el efecto del incremento de la temperatura. El estudio concuerda con Shinoda *et al.*, 1969; y Hemmingsen *et al.* (2005) quienes encontraron que cuando la viscosidad en una emulsión se reduce tiende a formar emulsiones menos estables por tal motivo propone disminuir la de la temperatura en el proceso y almacenamiento de las emulsiones para que no se vea afectada la viscosidad.

Por lo cual el fenómeno de floculación en las emulsiones de vainilla con y sin azúcar, se puede atribuir a la temperatura alta de almacenamiento (35°C) ya que existe una disminución en la viscosidad repercutiendo en una rápida difusión de las moléculas aumentando la velocidad de agregación de gotas.

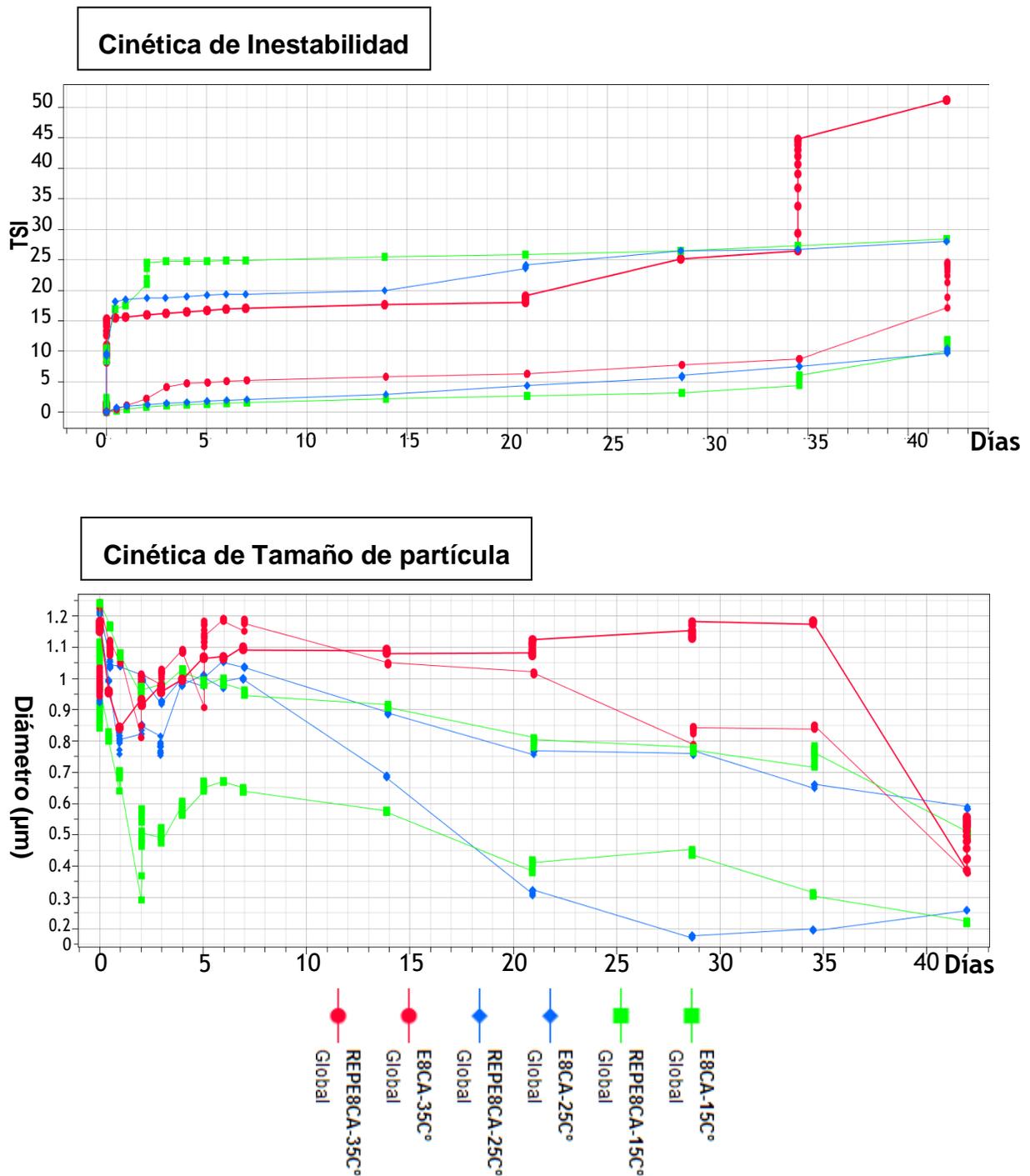


FIGURA 6.20. Cinética de inestabilidad y tamaño de partícula en emulsiones de vainilla con azúcar E8-CA

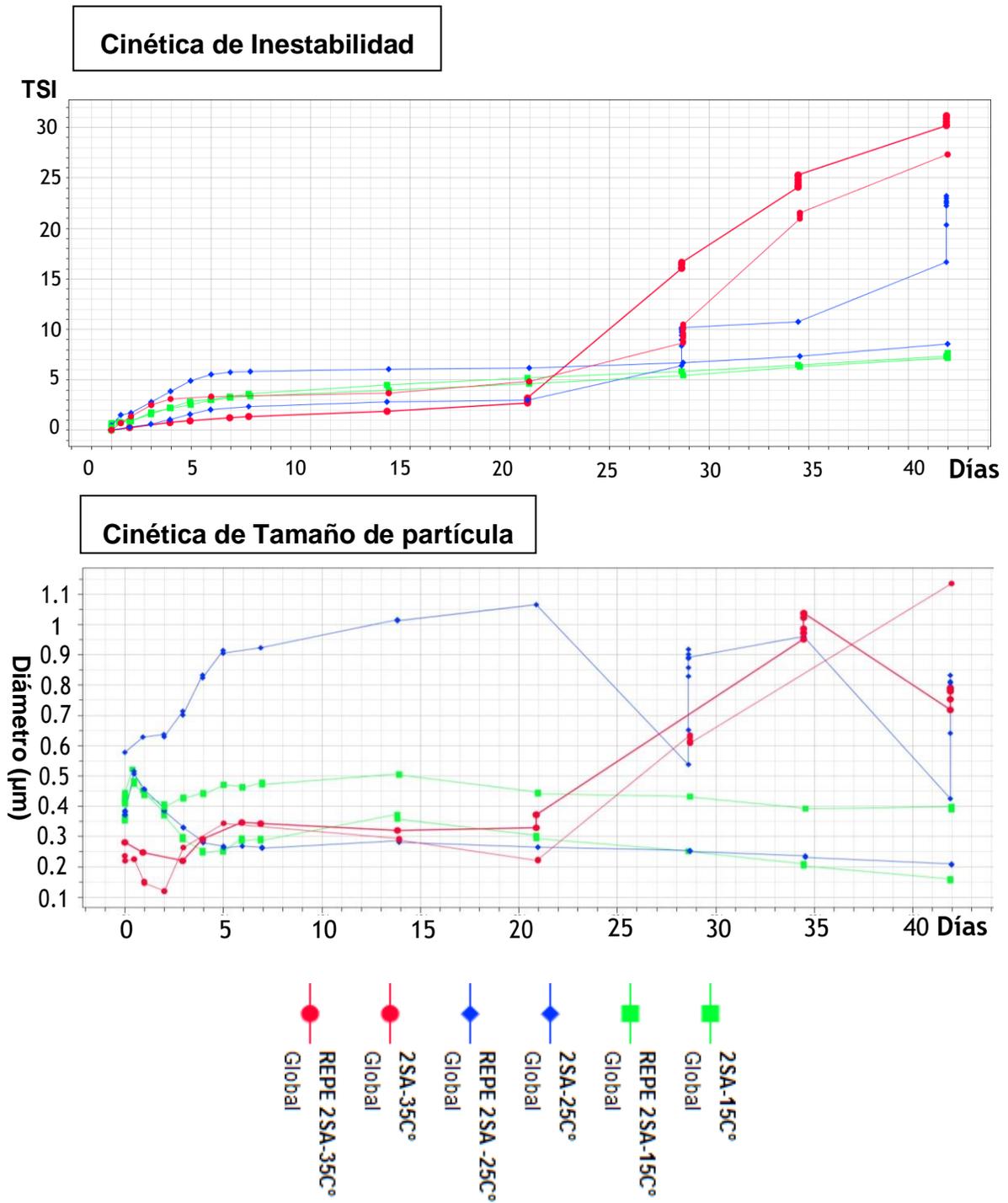


FIGURA 6.21. Cinética de inestabilidad y tamaño de partícula en emulsiones vainilla sin azúcar E2-SA

6.2.4 Estabilidad en emulsiones procesadas por homogeneización por microfludización.

Se procesaron las emulsiones óptimas de vainilla con y sin azúcar en un homogeneizador por microfludización a las mismas condiciones de proceso que en el homogeneizador por válvula de alta presión, obteniendo cinéticas de inestabilidad y tamaño de partícula, analizadas por el equipo Turbiscan.

Las Figuras 6.22 y 6.23 se muestran las cinéticas de inestabilidad y tamaño de partícula para la emulsión E8-CA y E2SA, observando en las dos emulsiones existe el fenómeno de floculación a los 21 días a 35°C por otra parte en las emulsiones E8-CA y E2-SA no hay algún fenómeno de inestabilidad a temperaturas de almacenamiento de 15°C y 25°C durante 42 días.

El comportamiento del tamaño de partícula en las emulsiones E8-CA y E2-SA al inicio de ser elaboradas por microfludización mejora su distribución de tamaño de partícula al inicio de la cinética con respecto al proceso de homogeneización por válvulas esto pudiera deberse al cámara de interacción y a la temperatura del proceso ya que el equipo de homogeneización no cuenta con sistema de enfriamiento. A diferencia en el equipo por microfludización que cuenta con un intercambiador de calor para enfriar la emulsión.

Cortes *et al.* (2009) instrumentaron un homogeneizador por válvulas de alta presión instalando un intercambiador de calor de refrigeración, evaluando el efecto de la temperatura durante el proceso analizando el tamaño de partícula en una emulsión de aceite de cacahuate, la temperatura de la emulsión fue medida a la entrada y a la salida de la válvula. El fenómeno de calentamiento, la composición de emulsión, el aumento de las presiones y los ciclos son condiciones que repercuten en el aumento de la temperatura y por consiguiente el tamaño de partícula, por tal motivo el tamaño de partícula aumenta cuando se utiliza un homogeneizador por válvulas sin tener algún sistema de enfriamiento siendo este el caso

RESULTADOS

Con respecto a la gráfica del TSI se observa claramente el fenómeno de inestabilidad en el almacenamiento a temperatura de 35°C las emulsiones a temperaturas de 15°C y 25°C son estables y no presentan inestabilidad durante los 42 días. Para las cinéticas de tamaño de partícula existe un aumento evidente en el tamaño de partícula en las emulsiones almacenadas a temperatura de 35°C, las emulsiones almacenadas a temperaturas de 15°C y 25°C el tamaño de partícula se mantiene aproximadamente del mismo tamaño durante los 42 días. Por otra parte se observa una mejor distribución de tamaño al inicio de la cinética en las emulsiones E8-CA y E2-SA procesadas por microfluidización.

Por el proceso de microfluidización se obtuvieron mejores resultados con respecto a la cinética del TSI y tamaño de partícula se obtuvieron valores menores de TSI consiguiendo una mayor estabilidad y una mejor evolución en el tamaño de partícula al inicio y durante el todo el almacenamiento. Las emulsiones E12-CA y E11-SA se descartaron ya que presentaron fenómenos de inestabilidad dentro de los días 21 y 29 días a las tres temperaturas de almacenamiento.

El aumento de la viscosidad al adicionar azúcar en la emulsión no influye en el almacenamiento durante los 42 días, observando la misma tendencia a la desestabilización en las emulsiones con y sin azúcar, cabe mencionar que todas las emulsiones se realizaron con la concentración de 7 % glicerol.

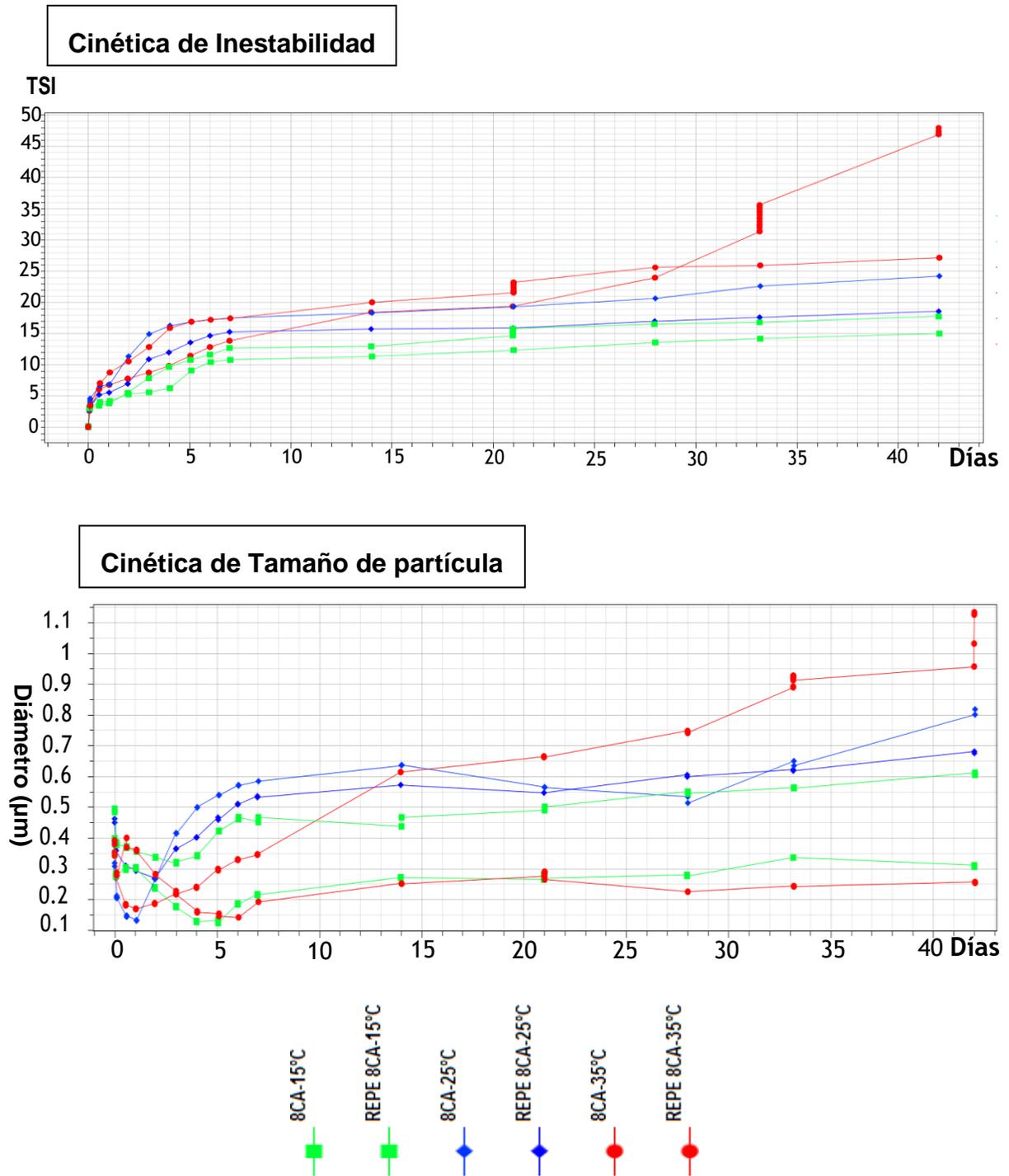
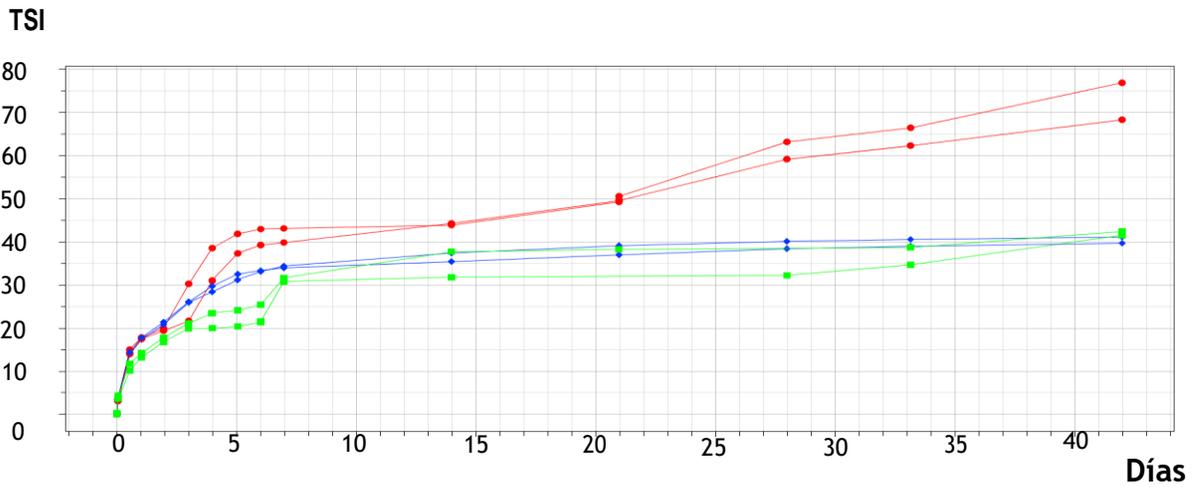


FIGURA 6.22. Cinética de inestabilidad y tamaño de partícula en emulsión de vainilla con azúcar E8-CA

Cinética de Inestabilidad



Cinética de Tamaño de partícula

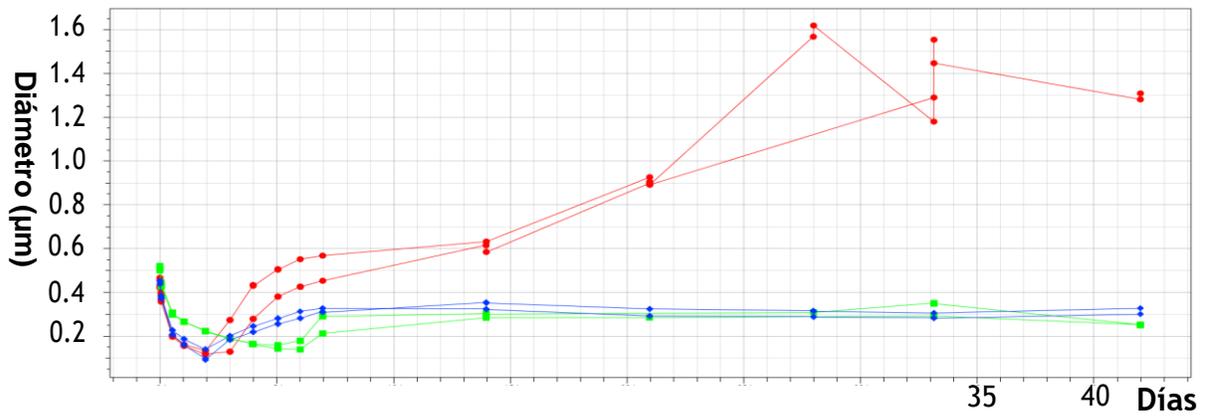


FIGURA 6.23. Cinética de inestabilidad y tamaño de partícula en emulsión de vainilla sin azúcar E2-SA

6.3 Análisis óptico de las emulsiones**6.3.1 Estabilidad óptica de las emulsiones**

En las Figuras 6.24 y 6.25 se muestran el análisis óptico para doce emulsiones de vainilla con y sin azúcar, cuando las emulsiones superan el tamaño de partícula de 600 nm el equipo no detecta la luz transmitida (línea azul) ya que las partículas de mayor tamaño retrodispersan la luz. Por lo tanto a mayor tamaño de partícula, mayor es el porcentaje de retrodispersión (línea naranja) y menor porcentaje de transmisión.

El análisis óptico en las emulsiones con azúcar, se observan en la Figura 6.24 la emulsión con azúcar E8-CA marcada en verde no presenta fenómeno de inestabilidad durante los 7 días de almacenamiento, a diferencia de las demás que muestran retrodispersión de luz, esto quiere decir que hubo un aumento de tamaño de partícula provocando floculación.

Por otra parte el análisis en la emulsión sin azúcar Figura 6.25 marcada en verde E2-SA de igual manera no muestra fenómenos de inestabilidad durante el almacenamiento de los 7 días, observando en las demás emulsiones fenómenos de floculación.

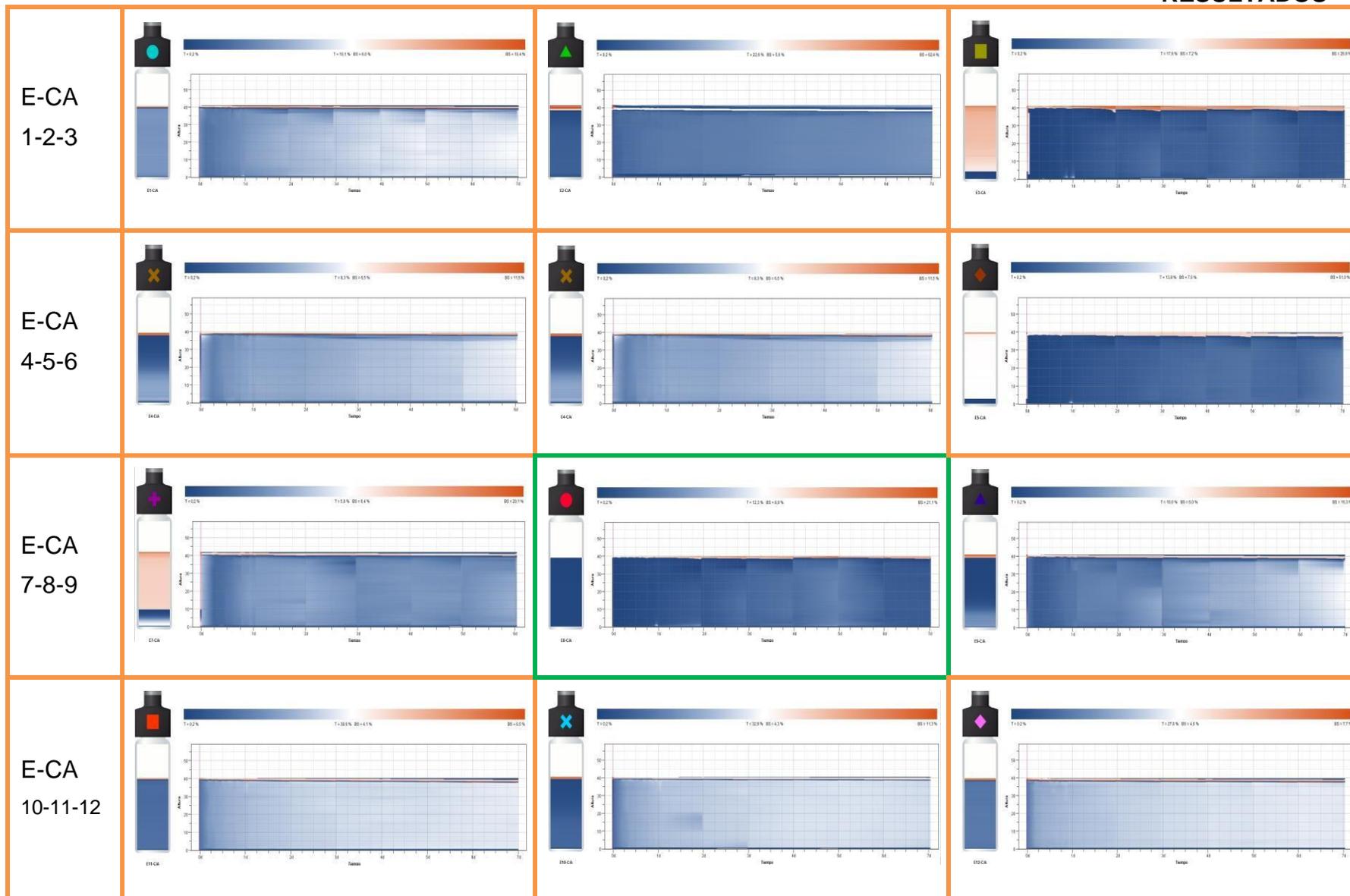


FIGURA 6.24. Estabilidad óptica en emulsiones con azúcar a 25°C durante 7 días de almacenamiento

RESULTADOS

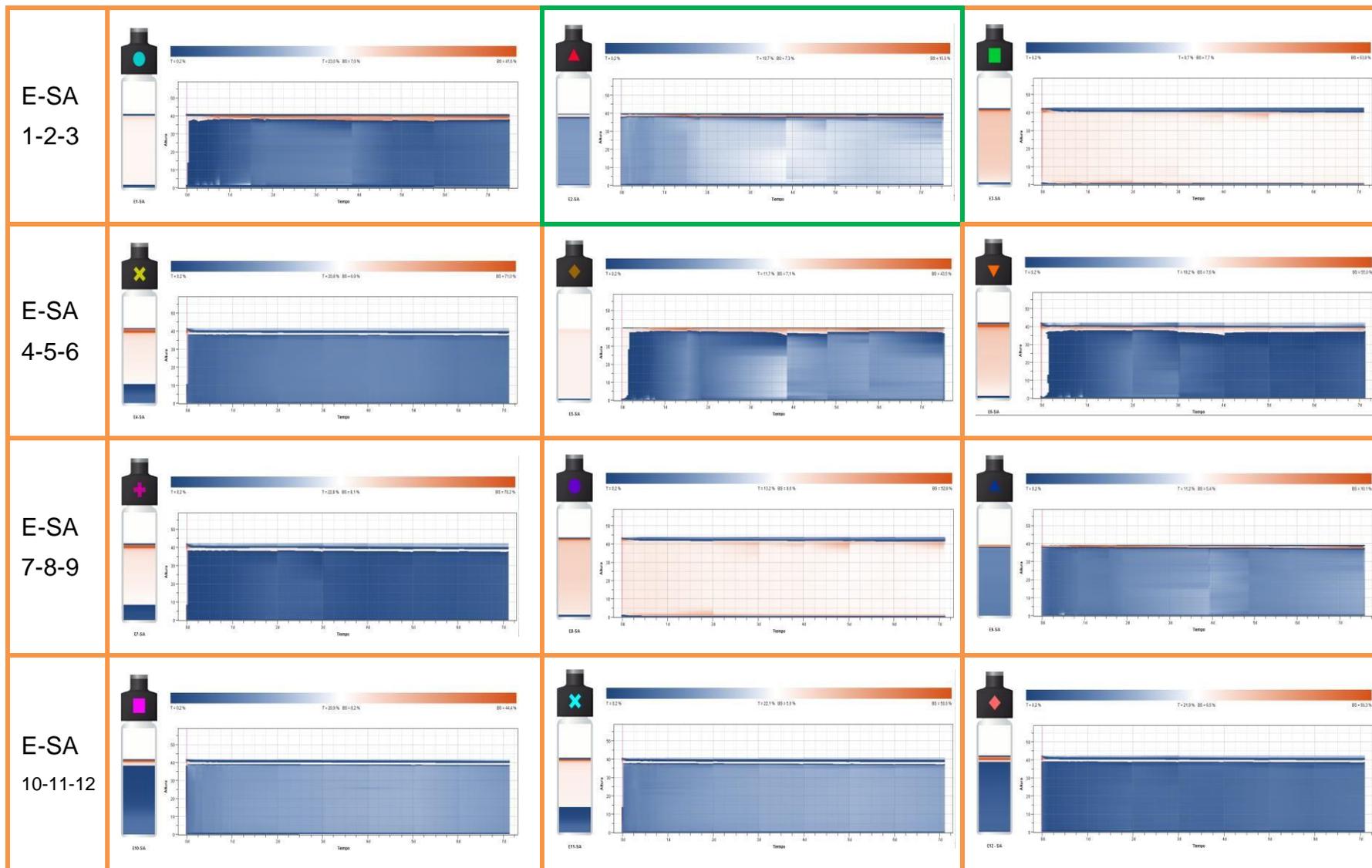


FIGURA 6.25. Estabilidad óptica en emulsiones sin azúcar a 25°C durante 7 días de almacenamiento

6.4 Estabilidad óptica durante el almacenamiento

Esta evaluación es generada por Turbiscan LAB mediante la técnica de dispersión múltiple de luz estática por transmisión y retrodispersión; esta técnica corrobora los resultados obtenidos dentro de la primera etapa en la formulación y proceso, analizando las 24 emulsiones de vainilla por duplicado con y sin azúcar con el fin de obtener emulsiones óptimas para ser almacenadas en la segunda etapa del trabajo y ser evaluadas a 15, 25 y 35°C.

Para las emulsiones almacenadas a 15, 25, 35°C Figura 6.26 y 6.27 el análisis nos proporciona información del efecto en la desestabilización en las emulsiones E8-CA y E2-SA evaluadas durante 42 días.

El almacenamiento de las emulsiones E8-CA a 15°C y 25°C presentan estabilidad durante los 42 días conservándose las emulsiones integrales, por otro lado la emulsión almacenada a 35 °C en el día 21 existe incremento de tamaño de partícula; a mayor tamaño de partícula mayor porcentaje de retrodispersión y menor porcentaje de transmisión, presentándose valores mayores a los 600 nm en la parte superior de la celda ya que la intensidad del color naranja es mucho mayor

En las emulsiones E2-SA ocurre el mismo efecto de inestabilidad que en la emulsión con azúcar a 35°C presentándose este a los 28 días de almacenamiento, las emulsiones a 15°C y 25°C de igual manera no presentan algún fenómeno de inestabilidad durante el tiempo de almacenamiento.

Es importante mencionar que las emulsiones E8-CA y E2-SA almacenadas a 35°C presentan floculación en el día 21 y 28 respectivamente ya que se presenta una variación en la retrodispersión y por ende un aumento del tamaño de partícula, el fenómeno se puede atribuir a la temperatura de almacenamiento debiéndose a la disminución en la viscosidad en la emulsión Hemmingsen *et al.*, 2005; Shinoda *et al.*, 1969 repercutiendo en el aumento en la velocidad de agregación de gotas migrando hacia arriba teniendo una densidad menor que la del líquido que los rodea (McClements, 2005).

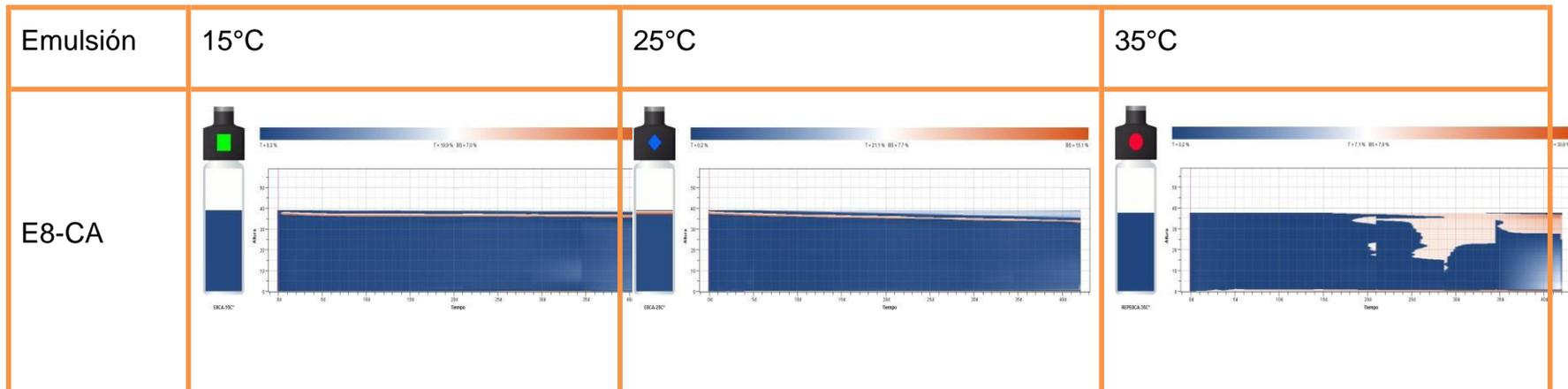


FIGURA 6.26. Estabilidad óptica en emulsión con azúcar almacenada a 15 °C – 25 °C – 35 °C durante 42 días

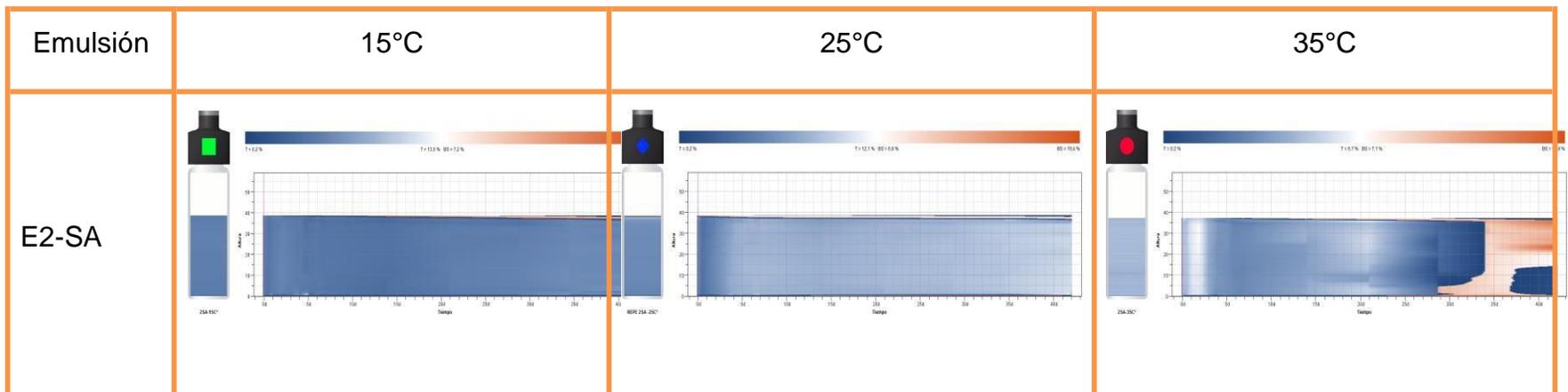


FIGURA 6.27. Estabilidad óptica en emulsión con azúcar almacenada a 15 °C – 25 °C – 35 °C durante 42 días

6.5 Morfología de las emulsiones

La microscopía es a menudo la más simple y directa técnica que proporcionar información sobre la floculación de gota en las emulsiones se pueden utilizar diversos tipos de microscopía para caracterizar los flóculos en emulsiones, incluidos los ópticos, los electrones y fuerza atómica microscópica.

Si las gota en una emulsión a través de la imagen muestra una separación clara y uniforme entonces se puede suponer que la emulsión no se encuentra floculada si las gotitas están estrechamente asociadas entre sí y se agrupan en ciertas regiones, se puede suponer que la emulsión esta floculada y si las gotas iniciales son relativamente pequeñas ($d < 1 \mu\text{m}$), puede ser difícil observar individualmente, pero puede ser posible detectar la floculación porque se crean aglomerados y son relativamente grandes ($d > 1 \mu\text{m}$).

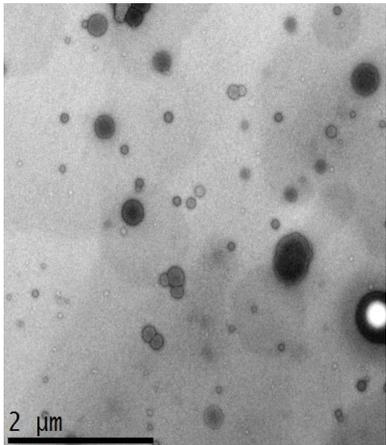
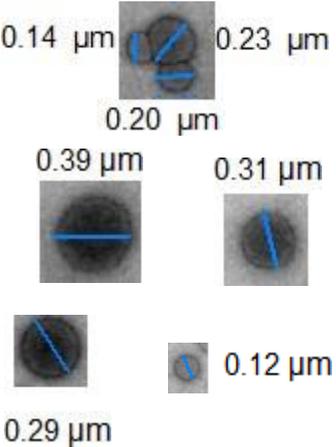
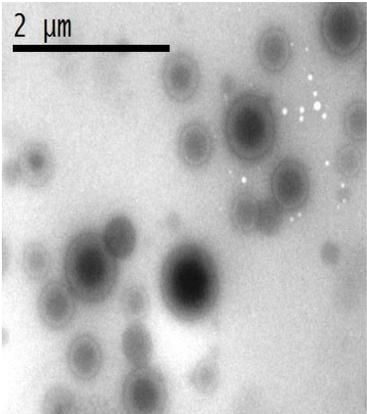
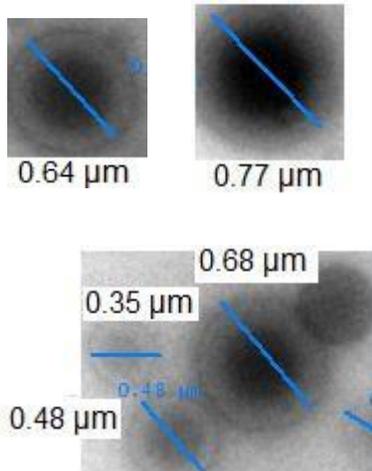
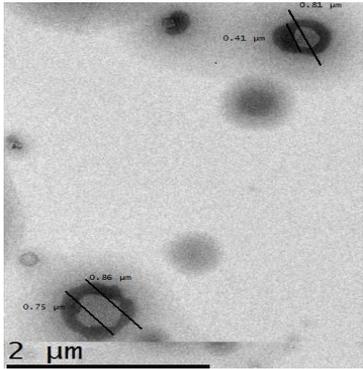
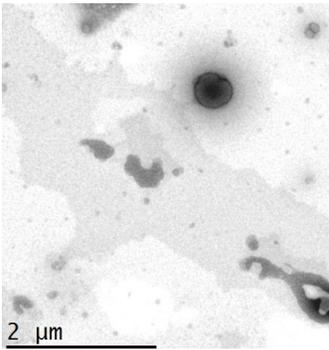
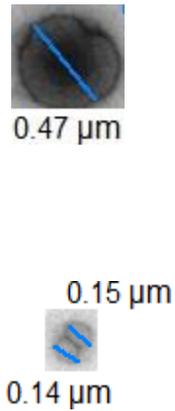
Dentro del campo de la microscopia se puede obtener información útil sobre los flóculos al ser observada la microestructura evaluando su tamaño, morfología y las fuerzas de atracción entre las gotas. Los flóculos tienden a ser de una forma más compacta y una forma regular cuando sus fuerzas de atracción tienden a ser débiles, mientras que forman estructuras de manera irregular cuando las fuerzas de atracción son fuertes, pudiendo distinguir entre la fuerza de interacción observando el tipo de micro estructura presente en los aglomerados (McClements, 2007; McClements, 2011).

En la Tabla 7.1 se observan las microestructuras de la emulsiones E8-CA y E2-SA mostrando la dispersión de las gotas teniendo tamaño de partícula de $0.14 \mu\text{m}$ a $0.86 \mu\text{m}$ para la emulsión E8 – CA con respecto a la emulsión E2-SA se observan tamaños de gota de $0.14 \mu\text{m}$ a $0.77 \mu\text{m}$ observando floculos en ambas emulsiones creándose aglomerados, esto indica que probablemente la emulsión tienda a presentar sedimentación inversa al pasar los días. Sin embargo se obtienen emulsiones estables durante 42 días a 15°C y 25°C . Por lo tanto al ser observadas las emulsiones al microscopio mediante una micrografía es posible correlacionar el tamaño de partícula

RESULTADOS

presente en las emulsiones con los datos obtenidos con técnicas por dispersión de luz corroborando el tipo fenómeno de inestabilidad presente en la emulsión mediante a su microestructura con los aglomerados.

TABLA 6.1. Micrografías de tamaño de partícula en emulsiones 8-CA y 2-SA

Emulsión 8 - CA	Emulsión 2 - CA		
			
			

7 CONCLUSIONES

1. Se optimizaron las emulsiones de vainilla libres de alcohol con y sin azúcar, obteniendo como la mejor concentración 7% de glicerol para ambas emulsiones. Se obtiene como resultado en la emulsión con azúcar las mejores condiciones para el proceso son 200 bar -9 ciclos y para la emulsión sin azúcar 400 bar -5 ciclos.
2. Las mejores condiciones de almacenamiento se encuentran a temperaturas de refrigeración ya que todas las emulsiones de vainilla son estables durante los 42 días que duró el experimento, mientras que las emulsiones almacenadas a temperaturas altas son estables hasta el día 21 mostrando menor tiempo de almacenamiento en anaquel. Por otra parte la adición del azúcar en las emulsiones no influye en la viscosidad observando en el almacenamiento la misma tendencia a la desestabilización de las emulsiones con y sin azúcar
3. Por otra parte las emulsiones de vainilla procesadas por homogeneización por microfluidización muestra mejor distribución tamaño de partícula, en comparación con el equipo de homogeneización por válvulas de alta presión, esto se debe al tipo de cámara de interacción con la que cuenta el equipo, además estar equipado con un intercambiador de calor que enfría la emulsión y un sistema de control para la presión permitiendo un mayor control del proceso.
4. Se determinó que el mejor método para analizar las emulsiones de vainilla con y sin azúcar libres de alcohol, es el analizador óptico de dispersión de luz Turbiscan® LAB EXPERT mediante la técnica de dispersión múltiple de luz estática por transmisión y retrodispersión, ya que proporciona información precisa para identificar el fenómeno de inestabilidad en la emulsión.

5. La microscopia permitió elucidar el fenómeno de inestabilidad (floculación o coalescencia) presentes en las emulsiones de vainilla con y sin azúcar complementando los estudios de estabilidad.

8 RECOMENDACIONES

- 1.- Realizar estudios en la emulsión de vainilla a presiones mayores de 1000 bar y evaluando el menor número de ciclos.
- 2.- Aumentar el tiempo de estudio de 42 días en la estabilidad en las emulsiones de vainilla libre de alcohol.
- 3.- Se recomienda realizar pruebas de evaluación sensorial en las emulsiones de vainilla libre de alcohol con y sin azúcar

9 BIBLIOGRAFIA

Castro, G. 2008. Evaluación del cultivo y producción de vainilla en la zona de Papantla, Veracruz, México. Tesis de Doctorado en Ciencias en Ecología y Manejo de Recursos Naturales. Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Veracruz, México.

Chanasattru, W., Decker, E. A. y McClements, D. J. 2009. Influence of glycerol and sorbitol on thermally induced droplet aggregation in oil-in-water emulsions stabilized by β -lactoglobulin. *Food hydrocolloids*. **23** (2): 253-261.

Cortés, M., Chevalier, L. D. y Dumay, E. 2009. Characteristics of submicron emulsions prepared by ultra-high pressure homogenisation: Effect of chilled or frozen storage. *Food hydrocolloids*. **23** (3): 640-654.

Cuevas, M., Támbara, Y., Delgado, M. I., Merchán, A. Y., Castiñera, M. y Márquez, J. 2009. Development of a HPLC-IR method for determination of residual ethanol in vaccine. *Revista Cubana de Farmacia*. **43** (2): 1-9.

Dickinson, E. 2009. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food hydrocolloids*. **23** (6): 1473-1482

Friberg, S. E., Larsson, K. y Sjöblom, J. 2004. Food emulsifiers: Their chemical and physical properties. pp. 45-89. En: *Food Emulsions*, 4ta ed., (Ed. Krog N. J. y Vang F.).

Formulation, 2013. Turbiscan Lab High Performance Stability Analyser. Disponible online en <http://www.formulation.com/stability-turbiscan-lab.html>. (Consultado el 8 abril de 2016)

Formulation, S. S. 2014. User manual TurbiscanLab. France.

Galetto, W. G. y Hoffman, P. G. 1978. Some benzyl ethers present in the extract of vanilla (*Vanilla planifolia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **26** (1): 195-197.

Hemmingsen, P. V., Silset, A., Hannisdal, A. y Sjöblom, J. 2005. Emulsions of heavy crude oils. I: Influence of viscosity, temperature, and dilution. *Journal of dispersion science and technology*. **26** (5): 615-627.

Havkin, D. y Belanger, F. 2011. Mexican vanilla production. pp. 3-23. En: *Handbook of Vanilla Science and Technology* (Ed. Hernández, J.), Wiley -Black Well. USA.

Hu, M., McClements, D. J. y Decker, E. A. 2003. Impact of whey protein emulsifiers on the oxidative stability of salmon oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51** (5), 1435-1439.

Jafari, S. M., Assadpoor, E., He, Y. y Bhandari, B. 2008. Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. *Food hydrocolloids*. **22** (7): 1191-1202.

Jenkins, T. y Waite, M. (2008). Screening of Commercial Vanilla Extracts for Authenticity. Milford, U.S.A. Waters Corporation.

- Kralova, I. y Sjöblom, J. 2009. Surfactants used in food industry: a review. *Journal of Dispersion Science and Technology*. **30** (9): 1363-1383.
- Malver Inc. 2004. Zetasizer Nano, User Manual Man0485. Inglaterra.
- Maskan, M. y Göğüş, F. 2000. Effect of sugar on the rheological properties of sunflower oil–water emulsions. *Journal of Food Engineering*. **43** (3): 173-177.
- Medina, V. G. 2013. Evaluación del efecto tensoactivo de lecitina natural aplicada en la elaboración de emulsiones farmacéuticas. 2013. Tesis de licenciatura en Química farmacéutica. Universidad Central del Ecuador, Ecuador.
- McClements, D. J. 2004. Food emulsions: principles, practices, and techniques 2da. Ed. CRC press, Boca Raton, Florida. pp 104-107.
- McClements, D. J. 2007. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **47** (7): 611-649.
- McClements, D. J. 2011. Edible nanoemulsions: Fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*. **7** (6): 2297-2316.
- Monroy, J. A. 2013. Formulación de una emulsión estable de concentrado de vainilla libre de alcohol y proceso de obtencion del mismo. México. Patente MX2013014920A1.
- Musalem, O. 2002. La vainilla en Mexico una tradicion con un alto Portencial. Comercializacion Agropecuaria. Secretaria de Agricultura Ganaderia Desarrollo Rural, Pesca y Alimentacion (SAGARPA).
- Pasquel, A. 2001. Gomas: una aproximación a la industria de alimentos. *Revista amazónica de investigación*. **1** (1):1-8.
- Parthasarathy, V. A., Chempakam, B. y Zachariah, T. J. 2008. Vanilla. pp. 287-311. En: Chemistry of spices, (Ed. Azees, S.), Cabi. USA.
- Pérez, T.S. y López, A. Extractos de vainilla: una mezcla de componentes químicos de aroma y sabor. Temas selectos de ingeniería de alimentos. Universidad de las Américas Puebla. pp. 51-63.
- Persson, K. H., Blute, I. A., Mira, I. C. y Gustafsson, J. 2014. Creation of well-defined particle stabilized oil-in-water nanoemulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. **459**: 48-57
- Qian, C. y McClements, D. J. 2011. Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: factors affecting particle size. *Food Hydrocolloids*. **25** (5): 1000-1008.
- Ranadive, A. S. 1992. Vanillin and related flavor compounds in vanilla extracts made from beans of various global origins. *Journal of agricultural and food chemistry*. **40** (10): 1922-1924.
- Ramachandra, S. y Ravishankar, G. A. 2000. Vanilla flavour: production by conventional and biotechnological routes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80** (3), 289-304.

Romero, A. G. 2016. Diferencias químicas en el perfil aromático de seis quimiotipos de vainilla (*vanilla planifolia*) de Puebla y Veracruz. Tesis de Maestría en Tecnología Avanzada. Instituto Politécnico Nacional. Queretaro, México.

Ruiz, F., Perez, I. y López, A. 2001. Enzymatic extraction and transformation of glucovanillin to vanillin from vanilla green pods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **49** (11): 5207-5209.

Shinoda, K. y Saito, H. 1969. The stability of O/W type emulsions as functions of temperature and the HLB of emulsifiers: the emulsification by PIT-method. *Journal of Colloid and Interface Science*. **30** (2): 258-263.

Sinha, A. K., Sharma, U.K y Sharma, N. 2008. A comprehensive review on vainilla flavor: Extraction, isolation and quantification of vanillin and others. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. **59** (4) 299-326.

Torres, M. M. 2007. Efectos de la formulación sobre el tamaño de gota de eulsiones provenientes de sistemas monómero/surfactante/agua. Tesis de licenciatura en Ingeniería Química. Universidad de los Andes. Mérida, Yucatan, México.

Waliszewski, K. N., Pardo, V. T. y Ovando, S. L. 2007. A simple and rapid HPLC technique for vanillin determination in alcohol extract. *Food Chemistry*. **101** (3): 1059-1062.

Wooster, T. J., Golding, M. y Sanguansri, P. 2008. Impact of oil type on nanoemulsion formation and Ostwald ripening stability. *Langmuir*. **24** (22): 12758-12765.