



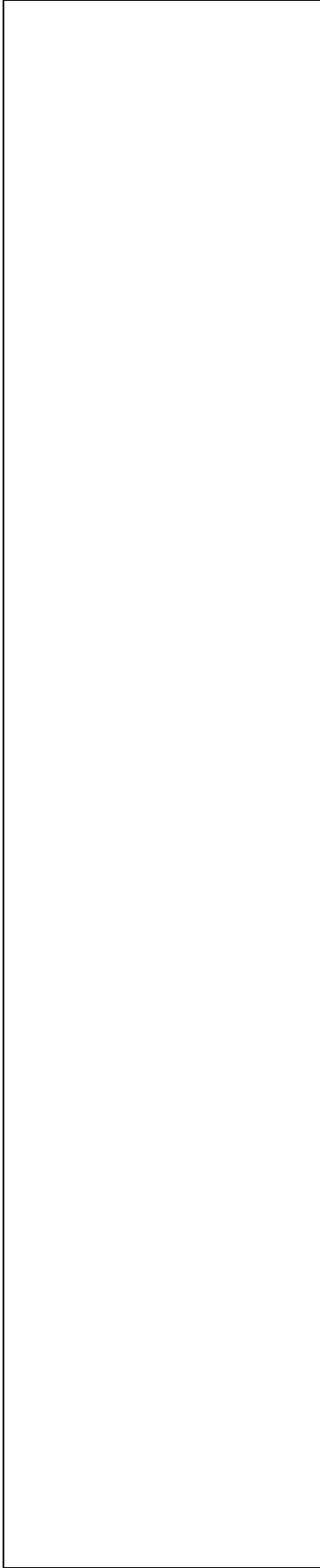
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y
TECNOLOGÍA DEL MEDIO AMBIENTE
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN TUTELADO

MASTER EN INVESTIGACIÓN EN
INGENIERÍA TÉRMODINÁMICA DE FLUIDOS

FORMULACIÓN DE β -CAROTENO EN
SOLUCIONES PRESURIZADAS DE ETANOL-
AGUA.

ALEJANDRO BARTOLOMÉ ORTEGA
26/MAYO/2013



D. ÁNGEL MARTÍN MARTÍNEZ, Investigador Ramón y Cajal del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente de la Universidad de Valladolid y, Dña. ESTHER DE PAZ BARRAGÁN estudiante de Doctorado con Beca FPI UVa del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente de la Universidad de Valladolid CERTIFICAN:

Que D. ALEJANDRO BARTOLOMÉ ORTEGA ha realizado bajo mi dirección el Trabajo de Investigación Tutelado del Programa de Doctorado, titulado FORMULACIÓN DE β -CAROTENO EN SOLUCIONES PRESURIZADAS DE ETANOL-AGUA.

Valladolid, 26 de Mayo de 2009

Fdo. TUTOR

Fdo. TUTOR

ÍNDICE

	TÍTULO.....	1
1.	RESUMEN.....	6
2.	INTRODUCCIÓN.....	6
3.	MATERIALES Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	9
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	12
5.	CONCLUSIONES.....	15
6.	AGRADECIMIENTOS.....	15
7.	REFERENCIAS.....	15

FORMULACIÓN DE β -CAROTENO EN SOLUCIONES PRESURIZADAS DE ETANOL-AGUA.

Alejandro Bartolomé Ortega. alejandro.bartolome@alumnos.uva.es. Grupo de procesos a alta presión, Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente. Universidad de Valladolid. Prado de la Magdalena s/n, 47011 Valladolid, España.

1. RESUMEN.

El β -caroteno es un pigmento de gran importancia en las industrias alimentaria, farmacéutica y estética, debido a sus propiedades como colorante natural, antioxidante y suplemento vitamínico. Por estas razones, es importante una buena formulación de β -caroteno, para que las partículas sean estables, y por lo tanto mantengan sus propiedades intactas a lo largo del tiempo y las suspensiones mantengan el color deseado. En este trabajo se estudia la formulación de β -caroteno por precipitación a partir de una disolución de etanol presurizada empleando almidón modificado con el grupo OSA (n-octenil anhídrido succínico) refinado a partir de maíz ceroso como agente encapsulante. Se obtuvieron formulaciones de β -caroteno con tamaños de partícula entre 120-160 nm, y con porcentajes de encapsulado de hasta el 38%. La relación orgánico/agua, la concentración de la suspensión de β -caroteno en etanol y de la disolución de almidón fueron los parámetros modificados en cada ensayo.

Palabras clave: β -caroteno, etanol, formulación, almidón, suspensión.

2. INTRODUCCIÓN.

El β -caroteno es uno de los pigmentos rojos, anaranjados y amarillos llamados carotenoides. El β -caroteno y otros carotenoides proveen aproximadamente el 50% de la vitamina A necesaria en la dieta (MedlinePlus). El β -caroteno está presente en las frutas y verduras, tales como, zanahoria, piña y cítricos, así como en flores, semillas, algunas estructuras animales, como, plumas y músculos, y también en micro-algas, levaduras y bacterias, aunque también puede ser sintetizado de manera artificial en un laboratorio. El β -caroteno es un compuesto del tipo polieno, con dobles enlaces conjugados con posibilidad de resonancia posicional. Su fórmula molecular es $C_{40}H_{56}$, su punto de fusión esta entre 176-182°C, su masa molecular es de 536,58 g/mol y su longitud de onda de máxima absorbanza es a 466nm y 496 nm (Restrepo 2007). Su estructura molecular se puede ver en la Figura 1.

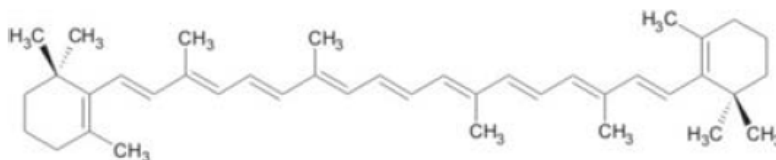


Fig 1. Estructura β -caroteno.

En la sociedad actual, los clientes demandan productos naturales, saludables y de mayor efectividad. Para conseguir que los productos tengan estas cualidades, es necesario la utilización de aditivos naturales, los cuales, darán al producto final un valor añadido (Mattea et al. 2009). Para la aplicación de los carotenoides como colorantes naturales en los campos de la alimentación y la cosmética, es necesario llevar a cabo una formulación con un tamaño de partícula limitado y con una intensidad del color adecuada que dependen de las propiedades de las partículas.

Las aplicaciones del β -caroteno son muy variadas, destacando en el campo de la medicina la disminución del asma producido por el esfuerzo físico, prevención de ciertos cánceres, enfermedades del corazón, cataratas y degeneración macular senil. Se aplica, también, en las mujeres desnutridas para disminuir las probabilidades de muerte y ceguera nocturna durante el embarazo. Todas estas aplicaciones, están aún en investigación, por lo que de algunas de ellas no se tiene resultados convincentes sobre la efectividad de su aplicación (MedilinePlus).

Otra rama de aplicaciones para el β -caroteno son las derivadas de la industria alimentaria y la industria farmacéutica y estética. Su uso en estas industrias, es como colorante natural de sus productos, siendo utilizado junto con un biopolímero en algunas aplicaciones. Existen estudios que indican que cubrir los carotenoides con polímeros proporciona una protección frente a los procesos de oxidación y degradación (Martín et al. 2007), ya que el β -caroteno es un pigmento que se degrada con la exposición del mismo al calor, luz y oxígeno. Para su utilización como colorante, su mayor problema, es su insolubilidad en agua, y por lo tanto su absorción por el cuerpo es muy baja, por lo que es necesaria la formulación de cristales de β -caroteno (Ribeiro et al. 2008), lo cual, conseguirá mejorar su dispersibilidad en agua, fortalecer su poder colorante e incrementar su biodisponibilidad durante el tránsito gastro-intestinal.

Existe un amplio rango de métodos de precipitación y condensación para la producción de nano-partículas orgánicas en medios acuosos (Horn et al. 2001). Los métodos más utilizados son los de emulsión-evaporación, desplazamiento de solubilidad y homogenización a alta presión.

El proceso de emulsión-evaporación consiste en la formación de una emulsión de un disolvente orgánico, el cual, contiene el producto deseado, en agua, y a continuación, una fase de evaporación del disolvente orgánico, para conseguir una dispersión del producto deseado en agua.

El siguiente proceso, el de desplazamiento de solubilidad, consiste en disolver el producto en un disolvente orgánico, que sea miscible con agua, y filtrar la disolución. Por otro lado se disuelve un polímero en esa fase orgánica, y se introduce, gota a gota a una fase acuosa que contiene un emulsificante, con agitación continua. Tras esto se completa el proceso mediante la evaporación del disolvente orgánico.

Por último, el proceso de homogenización a alta presión consiste en la preparación de emulsiones por efecto de la presión, es decir, primeramente se prepara una disolución del producto en un disolvente orgánico a temperatura moderada, a continuación, se mezcla con una disolución acuosa que contenga un emulsionante, en la proporción que se crea necesaria,

y se aumenta la presión de esa mezcla para conseguir que se homogenice. Algunos experimentos pueden requerir un paso previo a la homogenización por alta presión, consistente en una homogenización de alta velocidad.

Tan et al. (2005) investigaron la preparación de nano-dispersiones de β -caroteno por un proceso de emulsificación y posterior evaporación. Ribeiro et al. (2008) estudiaron la producción de nano-dispersiones de β -caroteno con poli (D, L-ácido láctico) y poli (D, L-ácido láctico coglicólico) por desplazamiento de solubilidad. Chu et al. (2007) utilizaron el mismo método anteriormente citado para conseguir nano-dispersiones de β -caroteno con estabilización proteínica. Yuan et al. (2008) estudiaron la producción de nano-emulsiones de aceite en agua de β -caroteno por homogenización a alta presión. Yin et al. (2009) estudiaron las características de las nano-dispersiones de β -caroteno preparadas con diferentes emulsificadores usando una técnica de desplazamiento de la solubilidad. Este trabajo demostró la importancia de los emulsificadores para determinar las características y la estabilidad de las nano-dispersiones de β -caroteno. Silva et al. (2011) consiguieron nano-emulsiones de β -caroteno usando una técnica de emulsificación y evaporación de alta energía. Los resultados obtenidos mostraron que era posible obtener dispersiones en un rango de las nano-partículas. De Paz et al. (2012) estudiaron la formulación de emulsiones de β -caroteno usando una técnica de precipitación a partir de una emulsión de acetato de etilo-agua presurizada usando almidón modificado como agente encapsulante. La aplicación de fluidos supercríticos para la precipitación de carotenoides se ha investigado ampliamente (Cardoso et al., 2009; Cocero y Ferrero, 2002; Franceschi et al., 2008; Franceschi et al. 2009; He et al., 2006; Martín et al., 2007), en cuyos resultados se muestran tamaños de partículas en el rango de las micras. Para las aplicaciones del β -caroteno como colorante natural, es necesario que las partículas en suspensión acuosa tengan un tamaño menor que 1 micra o en el rango de los nanómetros (Mattea et al. 2009).

El trabajo realizado ha consistido en la formulación de β -caroteno usando un almidón modificado (OSA) refinado a partir de maíz ceroso como agente encapsulante para aplicaciones de coloración natural. En un estudio previo, De Paz et al. (2012) desarrollaron un método basado en la precipitación a partir de emulsiones. Este método consiste en la formación de emulsiones de disolvente orgánico en agua presurizadas. El objetivo de desarrollar el proceso con estas características es mejorar los procesos convencionales basados en la emulsión y evaporación, acelerando las cinéticas de transferencia de materia a la escala de tiempo de los procesos de precipitación. Las características del proceso permiten un fuerte control sobre la precipitación obtenida y al mismo tiempo reduce la exposición del producto a altas temperaturas, las cuales podrían degradarlo. Mediante este método se obtuvieron suspensiones de β -caroteno estables con un tamaño de partícula menor de 400 nm y eficiencias de encapsulación de hasta el 80%. En este trabajo se utilizó el etanol como disolvente orgánico ya que presenta las ventajas de ser menos tóxico que el acetato de etilo y con elevada aplicabilidad en la industria alimentaria, pero presenta ciertas desventajas, como pueden ser su miscibilidad con agua, por lo que no se conseguiría una emulsión, y la baja

solubilidad que presenta el β -caroteno en etanol. En este trabajo se ha estudiado el efecto de los distintos parámetros de proceso como la relación orgánico-agua, concentración de almidón modificado y concentración de la suspensión de β -caroteno, en el tamaño de partícula de la dispersión acuosa de β -caroteno y en la eficiencia de encapsulación.

3. MATERIALES Y METODOS.

3.1. Materiales

El β -caroteno cristalino con una pureza mínima del 99% fue fabricado por Vitatene (León, España) usando un proceso de fermentación. Etanol, con una pureza del 96%, suministrado por Panreac Química (Barcelona, España). El almidón modificado con el grupo OSA, refinado desde maíz ceroso, fue suministrado por el National Starch Group (Hamburgo, Alemania).

3.2. Equipamiento

La Figura 2 muestra el esquema del diagrama de flujo del sistema experimental.

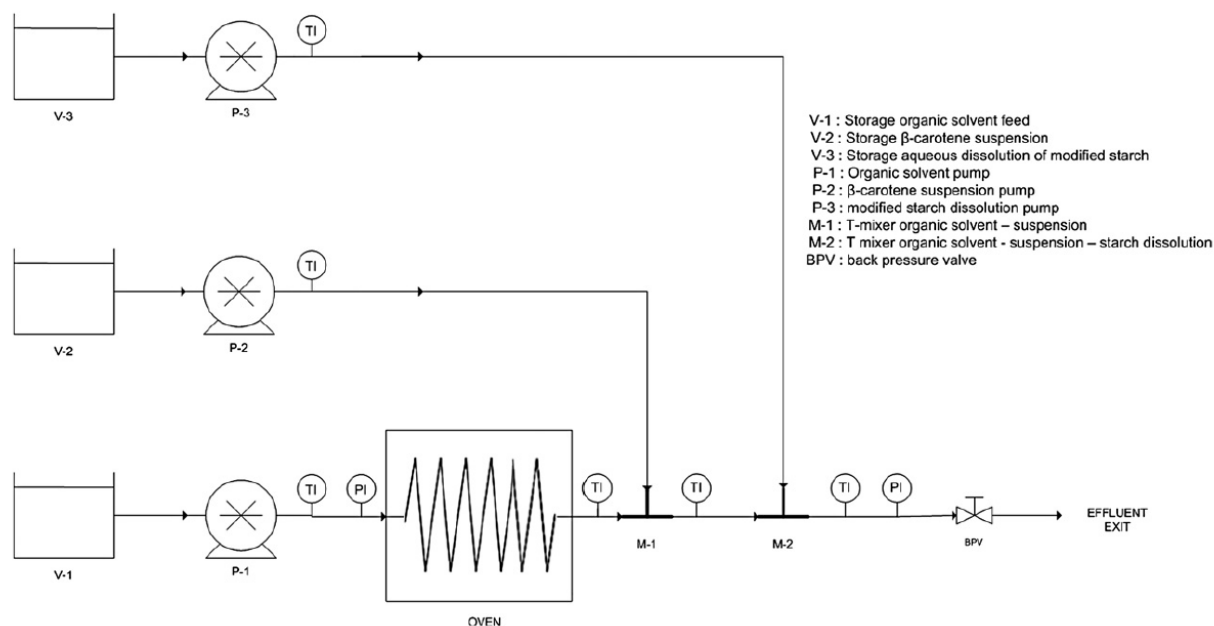


Fig.2. Diagrama de flujo del proceso utilizado para la formulación de β -caroteno.

El equipo experimental consta de tres pequeños recipientes presión atmosférica, que contienen la alimentación del disolvente orgánico puro, la suspensión de β -caroteno en el mismo disolvente orgánico y el último tanque contiene una disolución acuosa con el almidón OSA modificado. La instalación cuenta, también, con tres bombas, dos de ellas de pistón modelo GILSON 305 (flujo máximo: 25 mL min^{-1} ; control de flujo con una precisión de 0.1 mL min^{-1}) que se emplean para alimentar la planta con la disolución acuosa de almidón modificado y la suspensión de beta-caroteno en el disolvente orgánico, la tercera bomba es una bomba de pistón, modelo JASCO PU-2080 plus (flujo máximo : 10 mL min^{-1} ; control de flujo con una precisión de 0.1 mL min^{-1}) usada para bombear el disolvente orgánico puro. La corriente del disolvente orgánico puro se precalienta en un horno cromatográfico (KNK-2000-C series GAS

CHROMATOGRAPH) hasta alcanzar una temperatura de 165 °C, para alcanzar la temperatura de operación especificada de 145°C en el mezclador M-1 (mezclado con la suspensión de β -caroteno). Todas las corrientes se presurizan con las bombas para mantener el estado líquido a la temperatura de operación, siendo la presión seleccionada entre 5.5 y 6 MPa. Esta presión debe ser de 5.5-6 MPa. La suspensión de β -caroteno se precalienta hasta 50 °C, con intención de conseguir una mejor disolución en el disolvente orgánico y por lo tanto, un mejor bombeo. A continuación, se mezcla con la corriente de disolvente orgánico puro, ya precalentado, usando un mezclador en forma de T (M-1), e inmediatamente después se mezcla con la disolución acuosa de almidón modificado, que está a temperatura ambiente en otro mezclador en forma de T (M-2), para conseguir reducir el tiempo de contacto de las partículas de β -caroteno con el disolvente orgánico caliente y evitar la isomerización y la degradación del producto. Los tiempos de residencia estimados entre los dos mezcladores en forma de T son, aproximadamente, de 0.5 a 2 s, dependiendo de los flujos de las corrientes. Con el contacto de la suspensión de las partículas de β -caroteno con la corriente de disolvente orgánico caliente se consigue una completa disolución de β -caroteno, debido a que la solubilidad de β -caroteno se incrementa al aumentar la temperatura (Três et al. 2007). El mezclado en M-2 causa la precipitación de β -caroteno disuelto en etanol por un efecto combinado de antidisolvente y enfriamiento. A continuación, se recoge la muestra y el disolvente orgánico presente en la muestra se elimina mediante un rotavapor (BÜCHI 011-BÜCH 461 Water Bath), consiguiendo de este modo una dispersión acuosa de partículas de β -caroteno estabilizadas con el surfactante. La suspensión obtenida se puede procesar retirando el agua que contiene, produciendo, de este modo, un polvo seco, aunque en este trabajo se decidió no realizar este procedimiento.

La planta cuenta, también, con sensores de presión y temperatura. La temperatura es medida en el punto de inyección de todas las corrientes y en el punto intermedio entre los dos mezcladores, como se muestra en la figura 1. Se usaron unas termo-resistencias Pt-100 con una precisión de 0.1 °C para medir la temperatura. La presión fue determinada usando un medidor de membrana (DESIN TPR-18/V2, precisión 0.01 MPa). Durante la experimentación, la temperatura y la presión de operación oscilaba entre ± 5 °C y ± 0.5 MPa, respectivamente.

3.3. Procedimiento experimental

El primer paso es la preparación de las dos disoluciones que se van a bombear, es decir, la disolución acuosa de almidón modificado y la suspensión de β -caroteno en etanol. Se utilizaron cuatro concentraciones diferentes de suspensión de β -caroteno, 5 g L⁻¹, 2.5 g L⁻¹, 1.5 g L⁻¹ y 1 g L⁻¹, y de la disolución acuosa de almidón también se usaron 4 concentraciones diferentes, 36.7 g L⁻¹, 18.3 g L⁻¹, 11.0 g L⁻¹, 7.3 g L⁻¹. Una vez preparadas las disoluciones, se fijaron los distintos flujos de operación en cada una de las bombas. Para la bomba que trabajaba con la suspensión de β -caroteno en etanol, se estableció un flujo constante de 6 mL min⁻¹ para todas las experiencias, y el flujo de la disolución de almidón se fue variando a tres flujos distintos, 20 mL min⁻¹, 25 mL min⁻¹ y 16.5 mL min⁻¹. El flujo de la bomba de alimentación del disolvente orgánico se modificó a 9 mL min⁻¹ y 8 mL min⁻¹, para conseguir la relación orgánico-agua

deseada, siendo estas 0.60, 0.75 y 0.80. A continuación se procede al encendido de las bombas, se fija la presión de operación del sistema (5.5-6 MPa) bombeando agua con cada bomba, hasta que el sistema alcance la temperatura deseada (145-150 °C). Una vez alcanzada la temperatura en el mezclador M-1, se cambia a la disolución de etanol puro, y se espera a que la temperatura vuelva a estabilizarse. Cuando se alcanza la temperatura en M-1, se cambian las otras dos alimentaciones a la disolución de almidón y a la suspensión de β -caroteno, esta última debe estar con continua agitación para conseguir una perfecta homogenización durante toda la experiencia. El volumen de suspensión utilizado en cada experiencia es de 50 mL. Una vez terminada la experiencia, se extrajo el disolvente orgánico de la muestra utilizando un rota-vapor, por lo que se obtuvo una dispersión acuosa de partículas de β -caroteno libre de disolvente orgánico. Por último, se almacenó la muestra en una cámara frigorífica a 6°C, y envuelta en papel de aluminio, para protegerla de la luz y el calor.

3.4. Caracterización del producto

3.4.1. Porcentaje de β -caroteno encapsulado.

La muestra se analizó por un espectrofotómetro UV/VIS spectrophotometer model UV-2550 SHIMADZU. La longitud de onda seleccionada fue de 456 nm. La absorbancia determinada con este método es proporcional a la cantidad de β -caroteno que se encuentra disperso en la muestra. Las partículas de β -caroteno cristalino no estabilizadas en la suspensión no contribuyen a la absorbancia determinada por este método. El porcentaje de esta concentración, correspondiente a la cantidad de β -caroteno estabilizado en la suspensión, frente a la concentración total de β -caroteno en el producto, se denomina en este trabajo como β -caroteno encapsulado.

3.4.2. Tamaño de partícula.

El análisis del tamaño de partícula se obtuvo por difracción laser (modelo Malvern Mastersizer 2000).

3.4.3. Perfil Trans/cis de β -caroteno con HPLC.

El β -caroteno cristalino que se ha utilizado contiene un 95%wt de β -caroteno trans y un 5%wt de β -caroteno cis. Durante las etapas del proceso a temperatura elevada, se produjo una isomerización del trans al cis β -caroteno. El grado de isomerización se determinó usando un cromatógrafo HPLC Waters Alliance 2695 con un detector PDA modelo 2996 equipado con una columna Vydac 218TP54 5 μ m (4.6 x 250). La fase móvil era metanol + 1% de tetrahidrofurano estabilizado con 50 ppm de ácido ascórbico. La temperatura de la columna era de 30 °C. El disolvente para las muestras era etanol/tetrahidrofurano estabilizado con 50 ppm de ácido ascórbico.

3.4.4. Color

El color de las suspensiones obtenidas se caracterizó por un espectrofotómetro UV/Vis modelo Agilent 8453 operado en un amplio rango de longitudes de onda.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En la tabla 1 se muestra las condiciones de cada experimento, y en la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos. Los parámetros seleccionados para los experimentos han sido la relación orgánico-agua, que se obtiene con los distintos flujos de las bombas, la concentración de la suspensión de β -caroteno, y la concentración de almidón modificado con el grupo OSA en la disolución acuosa. Las concentraciones de β -caroteno y almidón que se han seleccionado en este trabajo son proporcionales a las que se emplearon en un estudio previo realizado por De Paz et al. (2012), en el que se desarrolló la formulación de β -caroteno con la misma técnica empleando acetato de etilo como disolvente orgánico, obteniendo la optimización de los parámetros de proceso. En este caso, el uso de etanol condiciona la concentración de β -caroteno, ya que se necesitan emplear concentraciones mucho más bajas debido a la baja solubilidad β -caroteno en etanol. Los datos de solubilidad de β -caroteno en etanol son de 0,40 mg mL⁻¹ a 30 °C y de 0,70 mg mL⁻¹ a 60 °C, comparándolos con los datos de la solubilidad de β -caroteno en acetato de etilo que son de 1,15 mg mL⁻¹ a 30 °C y de 15,18 mg mL⁻¹ a 60 °C (Três et al. 2007). Debido a estas bajas solubilidades se disminuye la concentración de β -caroteno y también la concentración de almidón, manteniendo una relación proporcional con el estudio previo (De Paz et al. 2012).

Ensayo	C_{β-caroteno} (g L ⁻¹)	C_{almidón} (g L ⁻¹)	F_{orgánico} (mL min ⁻¹)	F_{β-caroteno} (mL min ⁻¹)	F_{almidón} (mL min ⁻¹)	r_{orgánico-} agua	T_{operación} (°C)	P_{operación} (MPa)
E1	5	36.7	9	6	20	0.75	145-155	5.5-6
E2	5	36.7	9	6	25	0.60	145-153	5.5-6
E3	5	36.7	8	6	16.5	0.85	145-160	5.5-6
E4	2.5	18.3	9	6	20	0.75	143-153	5.5-6
E5	2.5	18.3	9	6	25	0.60	143-153	5.5-6
E6	2.5	18.3	8	6	16.5	0.85	147-160	5.5-6
E7	1.5	11.0	9	6	20	0.75	148-162	5.5-6
E8	1.5	11.0	9	6	25	0.60	152-164	5.5-6
E9	1	7.3	9	6	20	0.75	138-170	5.5-6
E10	1	7.3	9	6	25	0.60	137-168	5.5-6
E11	1	7.3	8	6	16.5	0.85	136-171	5.5-6

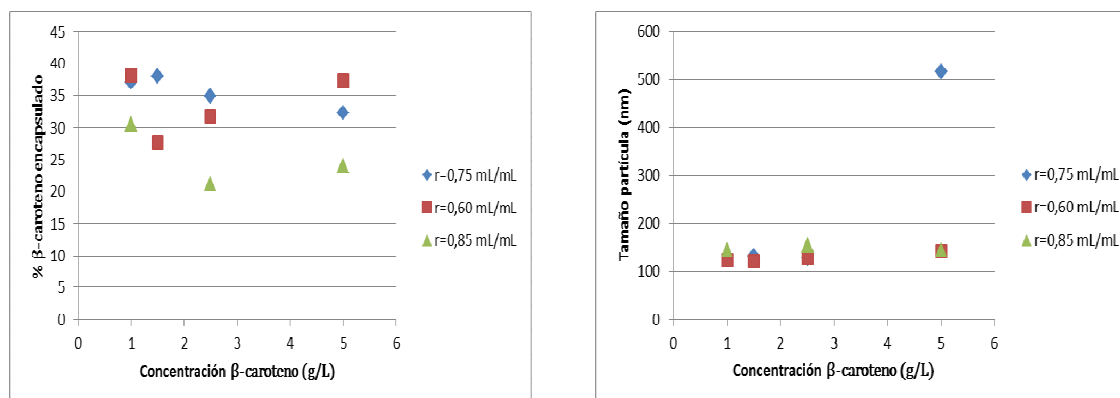
Tabla 1. Resumen de condiciones de operación.

Ensayo	% β -Caroteno en muestra	% β -Caroteno encapsulado	% β -Caroteno Trans-Cis	UV/Vis picos del espectro	Tamaño de partícula (nm)
E1	4,40	32,30	84.96 / 15.04	491 / 532.5	516
E2	3,81	37,30	84.24 / 15.76	456 / 482 / 522.5	142
E3	5,88	24,00	64.14 / 35.86	490.5	144
E4	5,13	34,90	75.17 / 24.83	471.5	127
E5	3,70	31,70	89.31 / 10.69	276 / 424 / 445	130
E6	6,04	21,10	-	-	155
E7	6,26	38,00	75.76 / 24.24	276 / 344	133
E8	3,94	27,60	83.12 / 16.88	276 / 447 / 474	121
E9	5,83	37.03	58.86 / 41.14	280 / 381 / 410	129
E10	6,26	38.20	81.00 / 19.00	282 / 445 / 513	123
E11	6,04	30.50	59.53 / 40.47	281 / 412 / 436	144

Tabla 2. Resumen de resultados experimentales.

4.1. Influencia de la concentración de β -caroteno.

La figura 4 muestra la relación existente entre la concentración de β -caroteno, y el porcentaje encapsulado y el tamaño de partícula para las distintas relaciones orgánico/agua.

Fig.3. Efecto de la concentración de β -caroteno.

En las gráficas se puede observar que no existe una tendencia clara del efecto de la concentración de β -caroteno con respecto al porcentaje de encapsulado. La eficiencia de encapsulación se mantiene en un rango constante entre el 30%-40%. Se observa, del mismo modo, que no existe, prácticamente, variación del tamaño de partícula con la concentración de β -caroteno, manteniéndose constante en un rango entre 100-150 nm.

4.2. Influencia de la relación orgánico/agua.

En la figura 2, se muestra el efecto de la relación orgánico/agua en la eficiencia de encapsulación y en el tamaño de partícula micelar empleando distintas concentraciones de la suspensión de β -caroteno inicial.

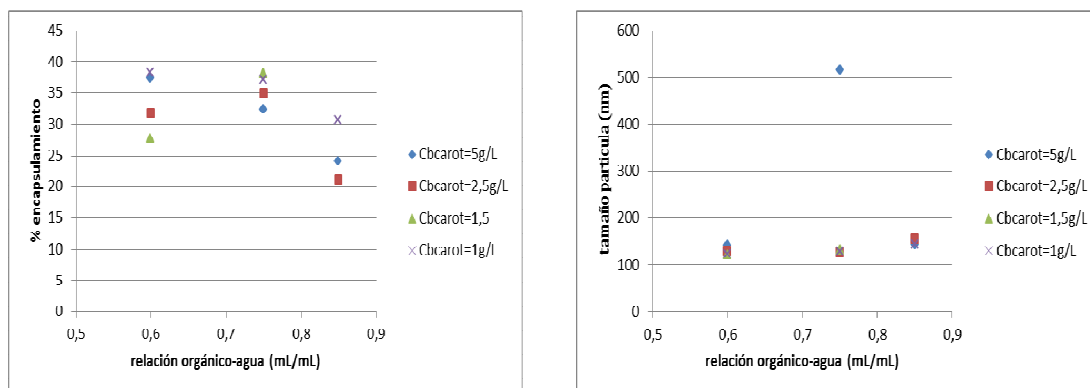


Fig.4. Efecto de la relación orgánico/agua.

Como se puede observar en las gráficas, el porcentaje de β -caroteno encapsulado disminuye considerablemente cuando la relación orgánico-agua aumenta, independientemente de la concentración de β -caroteno empleada. Cuando tenemos una concentración de 5g/L de β -caroteno, la tendencia del comportamiento del porcentaje de encapsulación disminuye cuando aumenta la relación orgánico-agua. En el caso de una concentración de 2,5 g/L, el porcentaje de β -caroteno encapsulado aumenta cuando pasamos de una relación orgánico-agua de 0,6 mL/mL a una de 0,75 mL/mL, pero desciende dramáticamente cuando alcanzamos la relación orgánica-agua de 0,85 mL/mL. La tendencia que se observa para una concentración de 1,5 g/L de β -caroteno es similar a la de la concentración de 2,5 g/L, observándose un aumento en el porcentaje de encapsulación al pasar de una relación de orgánico-agua de 0,6 a 0,75 mL/mL. Por último, para la concentración de 1 g/L, se puede observar una tendencia suave a descender desde la relación orgánico-agua de 0,6 mL/mL a 0,85 mL/mL. En el caso del tamaño de partícula se puede observar que los tamaños son muy similares, obteniéndose tamaños en un rango de 100-150 nm, por lo que se puede determinar que la relación orgánico-agua no afecta al tamaño de partícula.

En el estudio previo realizado con acetato de etilo (De Paz et al. 2012), se obtuvieron porcentajes de eficiencia de encapsulación entre un 70%-80%, mucho mayores que los obtenidos para etanol que se mueve en el rango del 30%, y tamaños de partícula entre 300-600 nm, los cuales son bastantes mayores que los obtenidos con etanol. Para el caso del acetato de etilo el aumento de la relación orgánico-agua provoca el aumento del tamaño de partícula, probablemente porque se forman emulsiones con gotas de mayor tamaño, al utilizarse mayor cantidad de disolvente orgánico. Por otro lado, para el porcentaje de encapsulación no se observa un efecto claro con la relación orgánico-agua, manteniéndose constante en el rango de un 70%-80%. Por lo tanto, se puede concluir que el uso de acetato de etilo consigue mayores eficiencias de encapsulación pero con tamaños de partícula mayores.

4.3. Evaluación resultados de β -caroteno cis/trans.

Los resultados analizados sobre la isomerización de β -caroteno determinan que el porcentaje varía desde un 10% hasta un 25% debido a la exposición del producto a altas temperaturas (en el mezclador T M-1 a 145°C). Se observa un mayor grado de isomerización en tres experimentos, en el rango de un 36-41%, E3, E9 y E11. Esto puede ser debido a que se alcanzaron temperaturas más elevadas en el mezclador M-1.

4.4. Parámetros de color.

El espectro típico para los carotenoides muestra 3 picos bien definidos cerca de 290 nm, 450 nm, y 510 nm. Las muestras en las que se alcanzan estos picos son E2, E10 y E11, presentando el color anaranjado típico de las suspensiones.

5. CONCLUSIONES.

En este trabajo se estudió la formulación de β -caroteno con almidón modificado con el grupo OSA empleando soluciones de etanol en agua presurizadas. Los resultados muestran que es posible obtener una formulación de β -caroteno con un tamaño de partícula entre 120-160 nm y con un porcentaje de encapsulado de hasta un 38%. Se ha demostrado, del mismo modo, que existe una fuerte relación entre el ratio orgánico-agua y el porcentaje de eficiencia de encapsulación, observándose que a altas relaciones orgánico-agua se obtienen menores porcentajes de encapsulado. Para el caso del tamaño de partícula, se determina que es independiente tanto de la relación orgánico-agua como de la concentración de β -caroteno, ya que los tamaños son muy similares en todo el rango estudiado. Se observa que se ha producido una isomerización importante de β -caroteno trans a cis como consecuencia de trabajar a temperaturas elevadas, desde un 10% a un 25%.

6. AGRADECIMIENTOS.

El autor agradece la posibilidad dada por la directora del Grupo de Alta Presión de la Universidad de Valladolid, M^a José Cocero, para realizar los ensayos necesarios para el trabajo fin de máster, en las instalaciones de su grupo y con el personal y material del mismo. Así como, agradece a sus tutores Ángel Martín y Esther De Paz, la ayuda recibida y las indicaciones y adiestramiento dados por ellos dos.

7. REFERENCIAS.

- Cardoso, M. A., Antunes, S., Van Keulen, F., Ferreira, B. S., Geraldés, A., Cabral, J., et al. (2009). Supercritical antisolvent micronisation of synthetic all-trans-b-carotene with tetrahydrofuran as solvent and carbon dioxide as antisolvent. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84, 215 – 222.
- Chu, B. S., Ichikawa, S., Kanafusa, S., & Nakajima, M. (2007). Preparation and characterization of b-carotene nanodispersions prepared by solvent displacement technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6754 – 6760.

- Cocero, M. J., & Ferrero, S. (2002). Crystallization of b-carotene by a GAS process in batch. Effect of operating conditions. *Journal of Supercritical Fluids*, 22, 237 – 245.
- De Paz, E., Martín, Á., Estrella, A., Rodríguez-Rojo, S., Matias, A. A., Duarte, C. M. M., Cocero, M. J. (2012). Formulation of b-carotene by precipitation from pressurized ethyl acetate-onwater emulsions for application as natural colorant. *Food Hydrocolloids*. 26, 17 – 27.
- Franceschi, E., De Cesaro, A. M., Feiten, M., Ferreira, S. R. S., Dariva, C. U., Kunita, M. H., et al. (2008). Precipitation of b-carotene and PHBV and coprecipitation from SEDS technique using supercritical CO₂. *Journal of Supercritical Fluids*, 47, 259 – 269.
- Franceschi, E., De Cesaro, A. M., Ferreira, S. R. S., & Oliveira, J. V. (2009). Precipitation of b-carotene microparticles from SEDS technique using supercritical CO₂. *Journal of Food Engineering*, 95, 656 – 663.
- He, W. Z., Suo, Q. L., Hong, H. L., Li, G. M., Zhao, X. H., Li, C. P., et al. (2006). Supercritical antisolvent micronization of natural carotene by the SEDS process through prefilming atomization. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 45, 2108 – 2115.
- Horn, D., & Rieger, J. (2001). Organic nanoparticles in the aqueous phase-theory, experiment, and use. *Angewandte Chemie International Edition*, 40, 4330 – 4361.
- Martín, A., Mattea, F., Gutiérrez, L., Miguel, F., & Cocero, M. J. (2007). Co-precipitation of carotenoids and bio-polymers with the supercritical anti-solvent process. *Journal of Supercritical Fluids*, 41, 138 – 147.
- Mattea, F., Martín, Á., & Cocero, M. J. Carotenoid processing with supercritical fluids. *Journal of Food Engineering*, 93, 255 – 265.
- Mattea, F., Martín, Á., Matías-Gago, A., & Cocero, M. J. (2009). Supercritical antisolvent precipitation from an emulsion: b-carotene nanoparticle formation. *Journal of Supercritical Fluids*, 51, 238 – 247.
- Restrepo, M. (2007). Sustitución de colorantes en alimentos. *Revista Lasallista de Investigación*, 4, 35 – 39.
- Ribeiro, H. S., Chu, B. S., Ichikawa, S., & Nakajima, M. (2008). Preparation of nanodispersions containing b-carotene by solvent displacement method. *Food Hydrocolloids*, 22, 12 – 17.

Silva, H. D., Cerqueira, M. A., Souza, B. W. S., Ribeiro, C., Avides, M. C., Quintas, M. A. C., et al. (2011). Nanoemulsions of b-carotene using a high-energy emulsificationevaporation technique. *Journal of Food Engineering*, *102*, 130 – 135.

Tan, C. P., & Nakajima, M. (2005). b-Carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. *Food Chemistry*, *92*, 661 – 671.

Três, M. V., Francheschi, E., Borges, G. R., Dariva, C., Corazza, F., Oliveira, J. V., et al. (2007). Effect of temperature on the solubility of b-carotene in organic solvents under ambient pressure. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, *27*, 737 – 743.

Yin, L. J., Chu, B. S., Kobayashi, I., & Nakajima, M. (2009). Performance of selected emulsifiers and their combinations in the preparation of b-carotene nanodispersions. *Food Hydrocolloids*, *23*, 1617 – 162.

Yuan, Y., Gao, Y., Zhao, J., & Mao, L. (2008). Characterization and stability evaluation of b-carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. *Food Research International*, *41*, 61 – 68.