

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO**  
**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**Comportamiento reológico y estructural de  
bebidas lácteas fermentadas conteniendo  
emulsiones aceite-en-agua y agua-aceite- en  
agua formuladas con diferentes agentes  
emulsificantes y estabilizantes**

**TESIS**

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

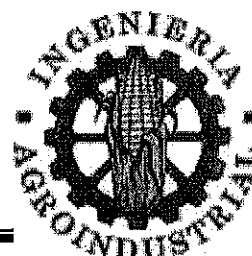
**MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
AGROALIMENTARIA**

**PRESENTA:**

**Maricarmen Thalía Recillas Mota**



**DIRECCION GENERAL ACADEMICA  
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES  
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES**

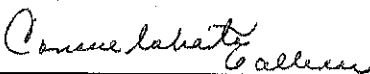


**“COMPORTAMIENTO REOLÓGICO Y ESTRUCTURAL DE BEBIDAS LÁCTEAS  
FERMENTADAS CONTENIENDO EMULSIONES ACEITE-EN-AGUA Y AGUA-  
ACEITE-EN-AGUA FORMULADAS CON DIFERENTES AGENTES  
EMULSIFICANTES Y ESTABILIZANTES”**

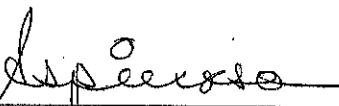
Tesis realizada por MARICARMEN THALÍA RECILLAS MOTA, bajo la  
dirección del Comité asesor Indicado, aprobada por el mismo y aceptada  
como requisito parcial para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria

Directora:

  
Dra. Consuelo Lobato Calleros

Asesor:

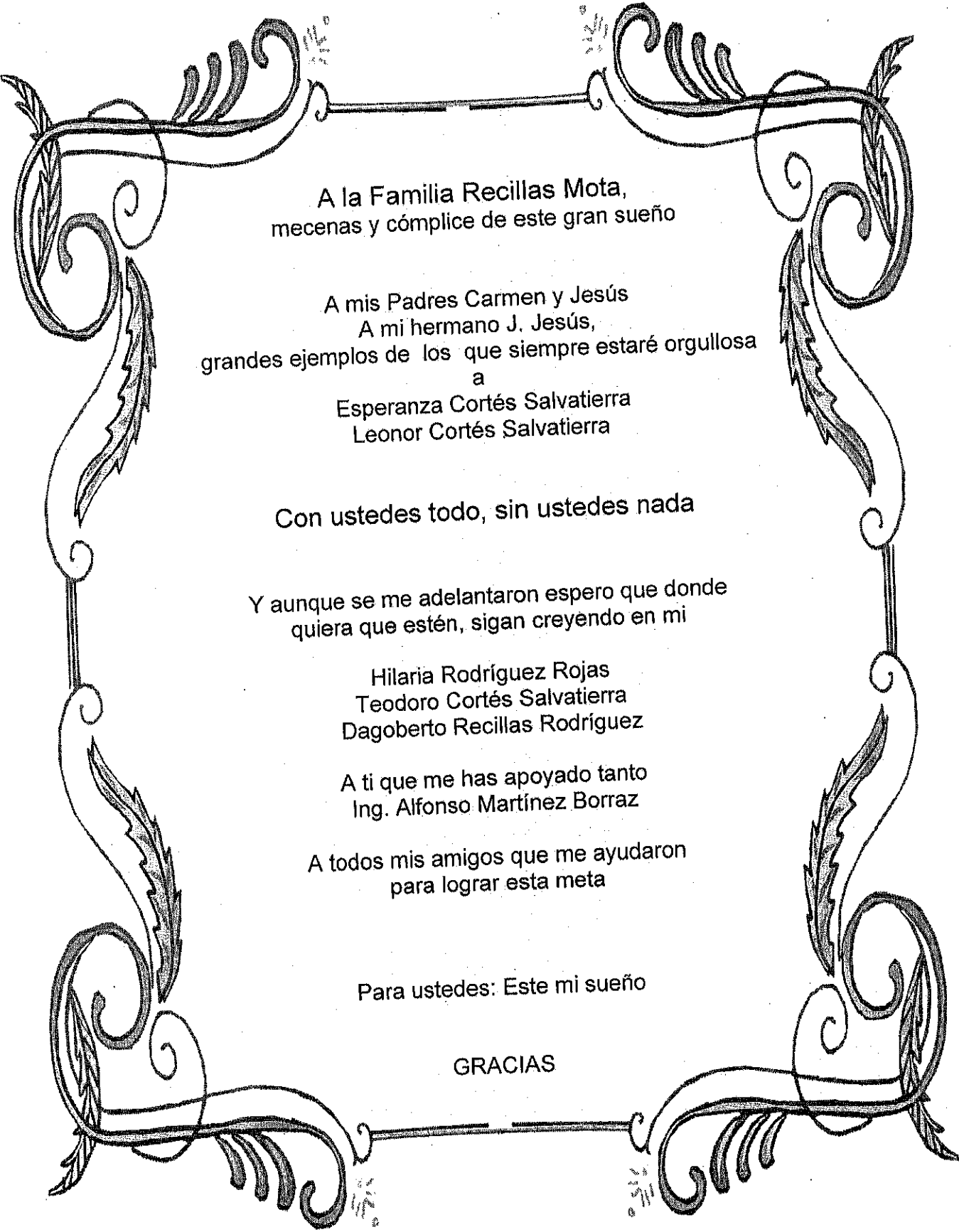
  
Dr. Teodoro Espinosa Solares

Asesor:

  
M. C. Armando Santos Moreno

Asesor:

  
Dr. Amílcar Mejenes Quijano

A decorative border made of stylized floral and leaf motifs, with small star-like symbols at the corners, framing the central text.

A la Familia Recillas Mota,  
mecenas y cómplice de este gran sueño

A mis Padres Carmen y Jesús  
A mi hermano J. Jesús,  
grandes ejemplos de los que siempre estaré orgullosa  
a  
Esperanza Cortés Salvatierra  
Leonor Cortés Salvatierra

Con ustedes todo, sin ustedes nada

Y aunque se me adelantaron espero que donde  
quiera que estén, sigan creyendo en mí

Hilaria Rodríguez Rojas  
Teodoro Cortés Salvatierra  
Dagoberto Recillas Rodríguez

A ti que me has apoyado tanto  
Ing. Alfonso Martínez Borraz

A todos mis amigos que me ayudaron  
para lograr esta meta

Para ustedes: Este mi sueño

GRACIAS

A todos los que tuvieron que ver en la realización de este trabajo.  
A todos aquellos que creyeron y confiaron en mí, aún sin conocerme, y que me enseñaron  
que no importa el color de la camiseta, cuando el objetivo es el mismo:  
HACER MAS GRANDE A MÉXICO

Sobre todo a la Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros  
Por su tiempo, su apoyo incondicional; y por preocuparse siempre por mí como persona.  
Además de compartir sus conocimientos conmigo y verme siempre como igual.

De la UAM Iztapalapa  
Al Dr. Jaime E. Vernon Carter, y Dr. © Juan Pablo Pérez Orozco, por su gran paciencia  
conmigo y todo su apoyo, en el desarrollo y análisis de la parte reológica de este trabajo.

De la Universidad Nacional Autónoma de México  
A la M. C. Yolanda Ornelas Uribe, del Instituto de Limnología y Ciencias del Mar, por todo su  
apoyo y tiempo ocupado para la realización de las microscopías electrónicas de barrido.

A la Dra. Josefa Bernad Bernad, y la Dra. © Lupita Díaz Manclares, de la Facultad de  
Química, Laboratorio de Farmacia, por brindarme el apoyo necesario para el desarrollo de  
las emulsiones, cuando fue necesario.

Del Instituto Tecnológico de Veracruz (UNIDA)  
Al Dr. Hugo Sergio García Galindo y al Dr. © Jorge Ortega, por aceptarme sin reservas a  
trabajar en su laboratorio, por compartir conmigo sus conocimientos y por brindarme siempre  
su apoyo, su tiempo y su amistad.

A mis compañeros y amigos de la Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria.  
A María Liliana Bolaños Carrillo, Juan Reyes Hernández, a Oscar Andrés del Ángel Coronel  
y a Rosa Carmina Romero Vázquez

A mis compañeros del laboratorio de Tecnología de Alimentos en Preparatoria Agrícola:  
Juan Reyes, Antonia Sosa, Juan Rodríguez, Laureano Ramos y a los compañeros de  
servicio.

Al M.C. Eleazar Aguirre Mandujano por su ayuda

Y a todos mis amigos, que me ofrecieron siempre palabras de aliento

A toda las personas del Departamento de Preparatoria Agrícola  
y de Ingeniería Agroindustrial, por su apoyo.

A los maestros revisores de este trabajo

A todos ustedes, sinceramente

¡Gracias!

# **Comportamiento reológico y estructural de bebidas lácteas fermentadas conteniendo emulsiones aceite-en-agua y agua-aceite-en-agua formuladas con diferentes agentes emulsificantes y estabilizantes**

Maricarmen Thaila Recillas Mota<sup>1</sup>, Consuelo Lobato Calleros<sup>2</sup>,  
Armando Santos Moreno<sup>3</sup>, Teodoro Espinosa Solares<sup>4</sup>, Amilcar Mejenes Quijano<sup>5</sup>

## **RESUMEN**

El objetivo de este trabajo fue relacionar la microestructura y las propiedades reológicas de bebidas lácteas conteniendo emulsiones aceite-en-agua (O/W) y agua-en-aceite-en-agua ( $W_1/O/W_2$ ), con la composición en emulsificantes/estabilizantes de las emulsiones y con una bebida láctea control conteniendo 30 g de grasa láctea  $L^{-1}$ . La emulsión O/W se preparó con aceite de canola (AC), leche descremada (LD) y una mezcla de emulsificantes de bajo peso molecular (EBPM). La emulsión interna  $W_1/O$  de las emulsiones múltiples (EM) estuvo constituida por agua, AC y EBPM. La fase externa  $O/W_2$  de las EM contuvo carboximetilcelulosa, pectina de bajo metoxilo o Tween 20, dispersos en LD. Barridos dinámicos de frecuencia (0.01 a 10 Hz, 0.1 % de deformación), curvas de flujo (1 a 300  $s^{-1}$ ) y micrografías electrónicas de barrido, indicaron que los hidrocoloides contribuyeron a la obtención de bebidas con valores altos de módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y de pérdida ( $G''$ ), mostrando comportamiento sólido viscoelástico y reforzamiento de sus redes proteínicas; mientras que Tween y los EBPM, promovieron un comportamiento más fluido de las bebidas y una estructura proteínica más débil. Las bebidas exhibieron comportamiento no Newtoniano, que se ajustó al modelo de Herschel-Bulkley.

**Palabras clave:** Bebidas lácteas fermentadas, emulsiones sencillas, emulsiones múltiples, microestructura, reología, geles

<sup>1</sup>Estudiante y <sup>2</sup>Profesores investigadores de la Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria.

**Rheological and structural behaviour of fermented lactic beverages containing oil in water and water in oil in water emulsions made up different emulsifier and stabilizers agents.**

Maricarmen Thalia Recillas Mota<sup>1</sup>, Consuelo Lobato Calleros<sup>2</sup>,  
Armando Santos Moreno<sup>3</sup>, Teodoro Espinosa Solares<sup>4</sup>, Amilcar Mejenes Quijano<sup>5</sup>

**Summary**

The objective of this work was to relate the microstructure and rheological properties of lactic beverages containing oil-in-water (O/W) or water-in-oil-in-water emulsions ( $W_1/O/W_2$ ) with the emulsifiers/stabilizers composition of the emulsions and with a control lactic beverage containing 30 g of milk-fat  $L^{-1}$ . The oil-in-water emulsion was prepared with canola oil (AC), skim milk (LD) and a blend of low-molecular weight emulsifiers (EBPM). The internal  $W_1/O$  emulsion of the multiple emulsions (EM) was made up with water, AC and EBPM. The external  $O/W_2$  of the EM contained carboxymethylcellulose, low methoxypectin or Tween 20 dispersed LD. Dynamic frequency sweeps (0.01 to 10 Hz, 0.1 % strain), flow curves (1 a 300  $s^{-1}$ ) and scanning electron micrographs indicated that the hydrocolloids contributed to obtain lactic beverages with higher storage modulus ( $G'$ ) and loss modulus ( $G''$ ) values, showing solid viscoelastic behavior and reinforcing of the protein networks, whilst Tween and EBPM promoted fluid behavior of the lactic beverages and a weaker protein network structure. The beverages showed non-Newtonian behavior which was adjusted to the Herschel-Bulkley model.

**Key words:** Fermented lactic beverages, simple emulsions, multiple emulsions, microstructure, rheology, gels.

### **Datos Bibliográficos**

Maricarmen Thalía Recillas Mota, nació en la ciudad de México el 4 de Noviembre de 1974, realizó sus estudios de primaria, secundaria y preparatoria en el colegio Francés Hidalgo, delegación Gustavo A. Madero, D.F., sus estudios de licenciatura los realizó en la universidad Autónoma Chapingo, graduándose de la carrera de Ingeniero Agroindustrial en 1998,

**INDICE**

|                                                   | Página |
|---------------------------------------------------|--------|
| INDICE .....                                      | i      |
| LISTA DE TABLAS.....                              | iii    |
| LISTA DE FIGURAS .....                            | iv     |
| <br>                                              |        |
| INTRODUCCIÓN .....                                | 1      |
| MARCO TEORICO .....                               | 4      |
| Bebidas lácteas fermentadas .....                 | 4      |
| Sustitución de grasa .....                        | 5      |
| Propiedades mecánicas .....                       | 7      |
| Medición de propiedades reológicas .....          | 7      |
| Pruebas mecánicas .....                           | 9      |
| Microestructura .....                             | 10     |
| MATERIALES Y METODOS .....                        | 11     |
| Formulación de emulsiones .....                   | 11     |
| Preparación de emulsiones .....                   | 11     |
| Evaluación de emulsiones .....                    | 13     |
| Tratamientos de bebidas lácteas fermentadas ..... | 14     |

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| Formulación base de las bebidas lácteas fermentadas .....               | 14 |
| Proceso de elaboración de las bebidas lácteas fermentadas .....         | 15 |
| Análisis de composición química proximal .....                          | 15 |
| Observación microestructural .....                                      | 15 |
| Mediciones reológicas dinámicas .....                                   | 16 |
| Análisis estadístico .....                                              | 17 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....                                            | 18 |
| Morfología y tamaño de los glóbulos grasos .....                        | 18 |
| Comportamiento reológico y microestructura de las bebidas lácteas ..... | 33 |
| Caracterización de curvas de flujo .....                                | 49 |
| CONCLUSIONES .....                                                      | 58 |
| BIBLIOGRAFIA .....                                                      | 60 |

**LISTA DE TABLAS.**

|                                                                                                                                                                  | Página |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>Tabla 1.</b> Diámetro volumétrico superficial medio de los glóbulos de las emulsiones utilizadas para preparar las bebidas lácteas                            | 18     |
| <b>Tabla 2.</b> Diámetro medio de los glóbulos grasos de las bebidas lácteas en dos períodos de almacenamiento.                                                  | 21     |
| <b>Tabla 3.</b> Valores de variables obtenidas del modelo Herschel-Bulkley, para el flujo de bebidas lácteas fermentadas a diferentes tiempos de almacenamiento. | 51     |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                   | Página |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>FIGURA 1.</b> Micrografía de los glóbulos grasos contenidos en leche entera en polvo reconstituida a 24 horas después de elaboradas (Magnificación 100 X. Barra de escala a 10 $\mu\text{m}$ )                 | 19     |
| <b>FIGURA 2.</b> Micrografía de los glóbulos grasos contenidos en la bebida control (BGL), después de 7 días de almacenamiento (Magnificación 100 X. Barra de escala a 10 $\mu\text{m}$ )                         | 20     |
| <b>FIGURA 3.</b> Micrografía de los glóbulos grasos contenidos en la bebida control (BGL), después de 14 días de almacenamiento (Magnificación 100 X. Barra de escala a 10 $\mu\text{m}$ )                        | 21     |
| <b>FIGURA 4.</b> Micrografía de los glóbulos grasos contenidos en emulsión sencilla (ES), a 24 horas después de elaboradas (Magnificación 100 X. Barra de escala a 10 $\mu\text{m}$ )                             | 23     |
| <b>FIGURA 5.</b> Micrografía de los glóbulos grasos contenidos en la bebida con emulsión sencilla (BES), después de 7 días de almacenamiento (Magnificación 100 X. Barra de escala a 10 $\mu\text{m}$ )           | 25     |
| <b>FIGURA 6.</b> Micrografía de los glóbulos grasos contenidos en la bebida con emulsión sencilla (BES), después de 14 días de almacenamiento (Magnificación 100 X. Barra de escala a 10 $\mu\text{m}$ )          | 25     |
| <b>FIGURA 7.</b> Micrografía de los glóbulos grasos contenidos en emulsión primaria agua en aceite W <sub>1</sub> /O, a 24 horas después de elaboradas (Magnificación 100 X. Barra de escala a 10 $\mu\text{m}$ ) | 26     |
| <b>FIGURA 8.</b> Micrografía de los glóbulos grasos contenidos en emulsión múltiple CMC (EMC), a 24 horas después de elaboradas (Magnificación 100 X. Barra de escala a 10 $\mu\text{m}$ )                        | 27     |
| <b>FIGURA 9.</b> Micrografía de los glóbulos grasos contenidos en la bebida con emulsión múltiple CMC (BEMC), después de 7 días de almacenamiento (Magnificación 100 X. Barra de escala a 10 $\mu\text{m}$ )      | 28     |

- FIGURA 10.** Micrografía de los glóbulos grasos contenidos en la bebida con emulsión múltiple CMC (BEMC), después de 14 días de almacenamiento (Magnificación 100 X. Barra de escala a 10  $\mu\text{m}$ ). 30
- FIGURA 11.** Micrografía de los glóbulos grasos contenidos en emulsión múltiple Tween 20 (EMT), a 24 horas después de elaboradas (Magnificación 100 X. Barra de escala a 10  $\mu\text{m}$ ) 31
- FIGURA 12** Micrografía de los glóbulos grasos contenidos en la bebida con emulsión múltiple Tween 20 (BEMT), después de 7 días de almacenamiento (Magnificación 100 X. Barra de escala a 10  $\mu\text{m}$ ) 31
- FIGURA 13.** Micrografía de los glóbulos grasos contenidos en la bebida con emulsión múltiple Tween 20 (BEMT), después de 14 días de almacenamiento (Magnificación 100 X. Barra de escala a 10  $\mu\text{m}$ ) 32
- FIGURA 14.** Micrografía de los glóbulos grasos contenidos en emulsión múltiple Pectina (EMP), a 24 horas después de elaboradas (Magnificación 100 X. Barra de escala a 10  $\mu\text{m}$ ) 32
- FIGURA 15.** Micrografía de los glóbulos grasos contenidos en la bebida con emulsión múltiple Pectina (BEMP), después de 7 días de almacenamiento (Magnificación 100 X. Barra de escala a 10  $\mu\text{m}$ ) 33
- FIGURA 16.** Micrografía de los glóbulos grasos contenidos en la bebida con emulsión múltiple pectina (BEMP), después de 14 días de almacenamiento (Magnificación 100 X. Barra de escala a 10  $\mu\text{m}$ ) 33
- FIGURA 17.** Diagrama de amplitud en el que se representan  $G'$  y  $G''$  de todos los tratamientos a las 24 horas de elaborados. Frecuencia 1Hz. 34
- FIGURA 18.** Comportamiento de los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y de pérdida ( $G''$ ) de los tratamientos a las 24 horas de elaborados 37

|                   |                                                                                                                                                          |    |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>FIGURA 19.</b> | Comportamiento de $G''/G'$ a las 24 horas de elaboradas                                                                                                  | 38 |
| <b>FIGURA 20.</b> | Micrografía electrónica de barrido de la bebida control (BGL).<br>Magnificación 4,000 X. Barra de escala = 5 $\mu\text{m}$ .                             | 39 |
| <b>FIGURA 21.</b> | Micrografía electrónica de barrido de la bebida control (BGL).<br>Magnificación 4,000 X. Barra de escala = 5 $\mu\text{m}$ .                             | 40 |
| <b>FIGURA 22.</b> | Micrografía electrónica de barrido de BEMC. Magnificación<br>4,000 X. Barra de escala = 5 $\mu\text{m}$ .                                                | 41 |
| <b>FIGURA 23.</b> | Micrografía electrónica de barrido de la BEMP. Magnificación<br>4,000 X. Barra de escala = 5 $\mu\text{m}$ .                                             | 42 |
| <b>FIGURA 24.</b> | Micrografía electrónica de barrido de la BEMP. Magnificación<br>16,000 X. Barra de escala = 1 $\mu\text{m}$ .                                            | 43 |
| <b>FIGURA 25.</b> | Micrografía electrónica de barrido de BEMT. Magnificación<br>4,000 X. Barra de escala = 5 $\mu\text{m}$ .                                                | 45 |
| <b>FIGURA 26.</b> | Micrografía electrónica de barrido de la BES. Magnificación<br>4,000 X. Barra de escala = 5 $\mu\text{m}$ .                                              | 45 |
| <b>FIGURA 27.</b> | Comportamiento de los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y de<br>pérdida ( $G''$ ) de los tratamientos a los 7 días de elaborados                        | 46 |
| <b>FIGURA 28.</b> | Valores de Tangente de $\delta$ a las bebidas lácteas a 7 días de<br>elaboradas                                                                          | 47 |
| <b>FIGURA 29.</b> | Comportamiento de los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y de<br>pérdida ( $G''$ ) de los tratamientos a los 14 días de elaborados                       | 48 |
| <b>FIGURA 30.</b> | Valores de Tangente de $\delta$ a las bebidas lácteas a 14 días de<br>elaboradas                                                                         | 49 |
| <b>FIGURA 31.</b> | Comportamiento del esfuerzo cortante ( $\sigma$ ), en función de la<br>velocidad de cizalla ( $\gamma$ ), de las bebidas a las 24 horas de<br>elaboradas | 50 |
| <b>FIGURA 32.</b> | Comportamiento del esfuerzo cortante ( $\sigma$ ), en función de la<br>velocidad de cizalla ( $\gamma$ ), de las bebidas a los 7 días de elaboradas      | 52 |
| <b>FIGURA 33.</b> | Comportamiento del esfuerzo cortante ( $\sigma$ ), en función de la<br>velocidad de cizalla ( $\gamma$ ), de las bebidas a los 14 días de                | 53 |

elaboradas

- FIGURA 34.** Comportamiento de la viscosidad aparente a las 24 horas de elaboradas las bebidas, los rangos de velocidad de cizalla utilizados son de 1 a 300 s<sup>-1</sup> 55
- FIGURA 35.** Comportamiento de la viscosidad aparente a los 7 días de elaboradas las bebidas, los rangos de velocidad de cizalla utilizados son de 1 a 300 s<sup>-1</sup> 56
- FIGURA 36.** Comportamiento de la viscosidad aparente a los 14 días de elaboradas las bebidas, los rangos de velocidad de cizalla utilizados son de 1 a 300 s<sup>-1</sup> 57

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han incrementado considerablemente los problemas en la salud de los mexicanos, derivados en gran parte, de sus hábitos alimenticios, y sedentarismo. Cabe resaltar que entre las causas de mortalidad, las enfermedades cardiovasculares ocupan el primer lugar (INEGI, 2002). Lo anterior ha generado un creciente interés de la población hacia el consumo de alimentos bajos en grasa, sobre todo aquella de tipo saturada y esto ha creado la necesidad de investigaciones que conlleven a la satisfacción de tal demanda.

La reducción y/o sustitución de grasa de tipo saturada por la de tipo insaturada no ha sido una tarea sencilla, ya que la grasa contribuye a la calidad final de los productos alimenticios y su reducción y/o sustitución altera notablemente las cualidades de los mismos, siendo las de tipo sensorial, además de las nutritivas, las más afectadas. Entre las cualidades sensoriales que sufren deterioro al disminuir o sustituir la grasa de los alimentos, destacan las de dureza, cohesividad, elasticidad, apariencia, recubrimiento bucal y sabor, influyendo esto notablemente en su aceptación por el consumidor (Keogh y O'Kennedy, 1998; Truswell, 1995; Shaker *et al.*, 2000).

Desarrollos recientes en tecnología alimentaria presentan el uso de emulsiones, sencillas o múltiples, como una alternativa para el desarrollo de nuevos productos más afines a las necesidades de los consumidores. La aplicación de emulsiones en alimentos ofrece ventajas tecnológicas, principalmente la referente a su capacidad de encapsular, en sus gotas internas, compuestos lábiles; por ejemplo, compuestos nutraceuticos – que aportan un beneficio a la salud y bienestar más allá de los requerimientos nutricionales – los cuales se encuentran protegidos del medio y pueden ser lentamente liberados (Muguet *et al.*, 2001).

Adicionalmente, las emulsiones pueden ser formuladas con ingredientes que presenten una composición de ácidos grasos saludables (de tipo insaturado) y aún mejor, para el caso de emulsiones múltiples (agua-en-aceite-en-agua), éstas se pueden incorporar en cantidades similares al componente graso a sustituir, pero aportarán menor cantidad de componente graso. Los glóbulos de una emulsión múltiple pueden mostrar tamaños similares a los de

los glóbulos grasos de la leche, por ejemplo, pero al estar constituidos por diminutas gotas de agua inmersas en la fase oleosa, aportarán menor cantidad de componente graso. Los glóbulos de emulsiones pueden conferir a derivados lácteos en los que se encuentren incorporados, propiedades mecánicas semejantes a aquellas proporcionadas por los glóbulos de grasa láctea en el producto tradicional (Garti, 1997; Lobato-Calleros *et al.*, 2003).

Entre los derivados lácteos, destacan las bebidas fermentadas, debido a su amplia aceptación por los consumidores. Además las bebidas fermentadas son reconocidas como sistemas acarreadores de bacterias lácticas pro-bióticas, (v.g. *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum*), las cuales se desarrollan adecuadamente en éstas y permanecen viables hasta llegar al intestino (Lourens-Hattingh, A. y Viljoen, B. 2001).

Una bebida láctea fermentada se comporta como un gel débil, mostrando comportamiento viscoelástico, bajo esfuerzos oscilatorios pequeños y bajas deformaciones. El gel de las bebidas lácteas fermentadas está formado por la agregación de micelas de caseína, quedando el lactosuero y los glóbulos de grasa láctea atrapados en el interior de la red proteínica (Shaker, R., *et al.*, 2000).

Existen dos vías para la formación de un gel lácteo, por acidificación, como en el yogur y las bebidas lácteas fermentadas y por la actuación de enzimas (queso). Ambos tipos de geles poseen características mecánicas diferentes. Cualquier cambio en la composición de la leche y en las condiciones de elaboración de geles lácteos, alteran su estructura y propiedades mecánicas, como resultado de modificaciones en las interacciones de sus componentes (glóbulos de grasa-glóbulos de grasa, proteína-proteína, glóbulos de grasa-proteína, etc.). Por ejemplo, modificaciones en el componente graso de la leche, originados por procesos de homogenización o por su sustitución por otro tipo de partículas grasas, altera la capacidad de interacción de los mismos con la red proteínica. Los glóbulos grasos de leches homogeneizadas muestran mayor interacción con la matriz proteínica del gel, a través de enlaces entre las lactoproteínas que se adsorben a la nueva membrana del glóbulo graso y la caseína de la red. Este fenómeno es producido como resultado de la alteración

mecánica y en composición de la membrana original de los glóbulos grasos. También se ha informado de complejos  $\kappa$ -caseína y  $\beta$ -lactoglobulina formados después de un tratamiento térmico severo (Haque, *et al.*, 2001).

Bebidas lácteas fermentadas en las que fueron utilizados sustitutos de grasa, exhibieron menor tensión y firmeza que aquellas completas en grasa, como resultado de la disminución en el número de glóbulos grasos, actuando como promotores de estructura de la red proteínica (Sandoval-Castilla *et al.*, 2004).

Cabe hacer mención que el estudio de geles lácteos por Microscopía Electrónica de Barrido, para determinar sus características estructurales y relacionarlas con su comportamiento mecánico, es muy difícil debido a que la alta proporción de agua presente obstaculiza la deshidratación de la muestra sin que la estructura proteínica se colapse (Aguilera y Stanley, 1999), por ello es necesario probar técnicas innovadoras de preparación de muestras de bebidas que aseguren la observación correcta de sus características estructurales.

Con base en todo lo antes expuesto, en esta investigación se planteó como objetivo estudiar la relación entre la microestructura y las propiedades reológicas de bebidas lácteas fermentadas conteniendo emulsiones, aceite-en-agua o agua-en-aceite-en-agua, con los agentes emulsificantes/estabilizantes usados en la preparación de estas últimas.

## REVISION DE LITERATURA

### Bebidas lácteas fermentadas

El proceso de elaboración de bebidas lácteas como el yogur involucra tres pasos principales:

- a) **Estandarización.** Es el ajuste de sólidos grasos y no grasos, para asegurar la consistencia final del producto.
- b) **Tratamiento Térmico.** El calentamiento de la leche con temperaturas superiores a los 80 °C por períodos de tiempo prolongados. Este tratamiento desnaturaliza las proteínas de lactosuero causando una interacción con la  $\kappa$ - caseína a fin de ser integrada en la matriz proteica.
- c) **Fermentación.** La leche usualmente es inoculada con un cultivo láctico mixto (v.g. *Streptococcus salivarius* ss. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus*), e incubada por períodos de 3 a 5 horas. Provocándose una gelación a partir del consumo de lactosa de la leche, generando ácido láctico el cual disminuye el pH del sistema, que provoca la parcial desestabilización de las micelas de caseína hasta que éstas se agregan. Dicha agregación continua hasta que la red del gel atrapa el suero dentro de su matriz (Steventon, *et al.* 1990).

En la actualidad, se ha incrementado el uso de bebidas lácteas como acarreadoras de microorganismos probióticos, ya que se conocen interrelaciones entre los organismos del intestino y algunos beneficios a la salud, se ha reconocido en la actualidad que un adecuado balance en la población microbiana en el intestino se asocia con una buena nutrición y salud. Los microorganismos relacionados con este balance son *Lactobacillus* y *Bifidobacteria* (Lourens-Hattingh, A. y Viljoen, B. 2001).

En años recientes bacterias probióticas han sido incorporadas más comúnmente en productos alimenticios, uno de los productos lácteos más populares en los cuales se adicionan este tipo de microorganismo viables, son las bebidas fermentadas. A este tipo de

microorganismos se les atribuyen numerosos beneficios a la salud, tales como: control de infecciones intestinales, reducir la intolerancia a la lactosa, reducir los niveles de colesterol en el suero sanguíneo y actividad anticarcinogénica (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001).

### **Sustitución de grasa**

Las bebidas lácteas fermentadas bajas en grasa pueden ser producidas por el reemplazo parcial del contenido graso de la leche por ingredientes bajos en calorías conocidos como sustitutos de grasa (Sandoval- Castilla, *et al.*, 2004).

La sustitución de la grasa láctea por emulsiones sencillas (aceite en agua, O/W, por sus siglas en inglés, oil in water) o múltiples (agua aceite en agua, W<sub>1</sub>/O/W<sub>2</sub>, por sus siglas en inglés, water in oil in water), por partículas similares a los glóbulos grasos lácteos, puede proporcionar una bebida láctea fermentada exenta de grasa láctea con un comportamiento mecánico comparable al exhibido por la bebida conteniendo grasa láctea; con ventajas como un balance de ácidos grasos saturados/insaturados más saludable.

Sin embargo, es necesario estudiar el efecto de las emulsiones sencillas y múltiples, sobre el arreglo interno de los componentes y en consecuencia sobre sus características mecánicas percibidas por el consumidor (Malone, M., *et. al.*, 2003).

Los componentes de una emulsión se distribuyen de acuerdo a su polaridad y concentración en el sistema, constituyendo tres regiones principales: fase interna, fase continua y la interfase; en esta última se localizan las moléculas amfifílicas que actúan como agentes emulsificantes y/o estabilizantes (Dickinson y Stainsby, 1982,; McClements, 1999). La protección conferida por estos sistemas a los principios activos incluidos en su fase dispersa es función de la estabilidad de la emulsión así como de las propiedades de barrera de los agentes emulsificantes y/o estabilizantes usados en su preparación (Garti, 1997). Aun cuando la emulsión se encuentra en equilibrio, existe intercambio continuo de moléculas entre las diferentes regiones, más aún cuando existe alguna alteración en el medio

(temperatura, presión, agitación mecánica); modificando así, la estabilidad de las emulsiones (Dickinson y Stainby, 1982; McClements, 1999).

Para el caso de las emulsiones sencillas, existen dos tipos posibles, dependiendo cual fase esté dispersa en la otra; en una emulsión aceite en agua (O/W), el aceite es disperso en forma de gotas en la fase continua que es el agua y el fenómeno contrario ocurre en una emulsión agua en aceite (W/O). Las emulsiones múltiples o dobles son denominadas “emulsiones de emulsiones”, debido a que son sistemas de emulsión donde las gotas de la fase dispersa contienen dentro de ellas otras gotas pequeñas dispersas. Cada glóbulo disperso en una emulsión múltiple forma una estructura vesicular con un comportamiento simple o múltiple separado por una capa de aceite o de agua. Un tipo de emulsión múltiple es aquella constituida por agua en aceite en agua ( $W_1/O/W_2$ ) (Garti, 1997).

La formación de una emulsión sencilla puede realizarse en presencia de emulsificantes de bajo peso molecular y biopolímeros, tales como las proteínas lácteas (Lobato-Calleros *et al.*, 2002). Para la preparación de una emulsión  $W_1/O/W_2$ , primero se forma una emulsión primaria ( $W_1/O$ ) mediante el uso de emulsificantes de bajo peso molecular, en cuya fase acuosa u oleosa se encuentra solubilizado el principio activo. Posteriormente, la emulsión múltiple  $W_1/O/W_2$  es obtenida, a través de la dispersión de la emulsión primaria en una solución acuosa de biopolímeros con actividad superficial (Musashino *et al.*, 2001; Allouche *et al.*, 2003). Los polisacáridos son usualmente añadidos a la fase acuosa de emulsiones alimenticias aceite-en-agua para mejorar la estabilidad al cremado de las emulsiones. Su eficiencia depende de la concentración del polímero en la fase acuosa así como también de características estructurales del polímero en sistema acuoso. La formación de una estructura de gel débil del polímero en la fase continua, causa altas viscosidades en el rango de bajo estrés e imparte propiedades elásticas adicionales al sistema completo, así el cremado de la emulsión es fuertemente inhibido (McClements, 2000).

Dickinson y Houg (1996), informaron que conforme se incrementa la relación molar emulsificante hidrofílico (Tween 20, monolaurato de sorbitán polioxietileno): proteína, en geles de proteínas de lactosuero conteniendo gotas de aceite emulsionadas, más proteína de

la interfase es desplazada, lo cual reduce el módulo elástico del gel. Los autores antes citados, atribuyen este comportamiento a una reducción en la extensión de las interacciones entre las gotas de emulsión con la red proteínica.

### **Propiedades Mecánicas**

Una mejor descripción del comportamiento del sistema y su efecto en la estructura, puede ser el adquirir datos de la viscosidad aparente en función de la velocidad de cizalla.

Lobato-Calleros (1987), define a las características mecánicas de un material, como el grupo de características físicas que surgen de la forma en la cual sus componentes estructurales están arreglados en una macro y microestructura, además, están relacionadas a la deformación, la desintegración y el flujo de un material, bajo una fuerza, y se miden objetivamente a través de funciones de masa, tiempo y distancia (Giese, 2003).

Los alimentos se acompañan de un amplio rango de propiedades organolépticas que están ligadas a su microestructura. El cómo se comporta en la boca durante su consumo, es decir, cómo es que es percibido por el consumidor, es lo que hace preferirlo sobre otro, por ello el entendimiento de los factores físico-químicos, microestructurales y fisiológicos que gobiernan en tiempo real la percepción, el aroma y el sabor, durante la acción de comer es muy importante, sobre todo la gran necesidad de entender la influencia de la microestructura de un alimento y su comportamiento mecánico (Malone *et al.* 2003).

### **Medición de propiedades reológicas**

Los fluidos a base de leche muestran un comportamiento reológico complejo dependiendo principalmente de la concentración de sólidos, la temperatura, y el estado físico de sus grasas y proteínas. En leche que no ha sido calentada, los glóbulos de grasa son los que mayormente contribuyen a la reología de un producto, sin embargo, durante la elaboración de bebidas lácteas fermentadas, donde se somete a la leche a un sobre calentamiento, la estructura cuaternaria de las proteínas cambia, y se producen re-arreglos que dan como resultado la formación de un gel compuesto por una compleja red de proteínas, que domina

las propiedades reológicas resultantes (Steventon, *et al.*, 1990). La acidificación de la fase acuosa de la leche convierte a la dispersión coloidal de la leche (comportamiento líquido), en un agregado suave de comportamiento sólido (Dickinson, 2001).

La estructura del gel contribuye enormemente a sus características de textura, que es una característica sensorial muy importante que percibe el consumidor. El gel es, sin embargo, altamente susceptible a los esfuerzos cortantes y su reología es altamente dependiente de la cantidad de procesos mecánicos que recibe el producto en su elaboración (Steffe, 1996).

La percepción de la consistencia de un producto líquido depende casi enteramente del esfuerzo cortante que es percibido en la boca. En contraste con los sistemas Newtonianos simples, muchos alimentos fluidos, incluyendo particularmente aquellos que incorporan polisacáridos, no tienen una viscosidad única ni invariable, pero muestran un marcado descenso en la viscosidad ( $\eta$ ) incrementando la velocidad de cizalla. Por lo que escoger apropiadamente el régimen de corte es un punto central de atención para relacionar la viscosidad definitiva de un alimento a aquella percibida en la boca (Rao, 1999).

Muchos productos alimenticios predominantemente viscosos, muestran una disminución drástica en su viscosidad cuando la velocidad de corte aumenta. Los geles son diferenciados de otros sistemas estructurados, en los que pequeñas porciones de sólidos están dispersos en relativamente una alta proporción de líquido. Este es un coloide en el que la fase que forma la estructura de gel inmoviliza el líquido y le confiere propiedades de un sólido. Mientras se encuentra en reposo, las cadenas poliméricas (proteínas y polisacáridos) mantienen un orden interno irregular, al aplicar una velocidad de cizalla las partículas suspendidas del suero se orientarán en dirección al flujo, disminuyendo la viscosidad (Tabilo-Munizaga y Barbosa-Cánovas 2005).

Los materiales dilatantes son aquellos que aumenta su viscosidad al incrementar la velocidad de corte, no es común que este tipo de comportamiento se encuentre en materiales alimenticios, pero puede encontrarse en alimentos que fueron adicionados con hidrocoloides (Hegedusic, *et al.*, 2000).

## Pruebas Dinámicas

Debido a que los geles son materiales viscoelásticos, se utilizan pruebas dinámicas para evaluar las propiedades de los sistemas como los geles. De una prueba en la región viscoelástica lineal se obtienen los Módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y de pérdida ( $G''$ ), así como la  $\tan \delta$  ( $G''/G'$ ) o factor de pérdida.

El rango viscoelástico lineal, es el rango de amplitud en el cual  $G'$  es constante. Al seleccionar grandes valores de esfuerzos y deformaciones, este rango de viscoelasticidad lineal queda fuera, y la muestra es deformada a tal grado que las uniones secundarias de las moléculas son destruidas. Este rango puede determinar a través de muestras de barridos de esfuerzos o deformaciones, y la información recabada sirve para realizar otro tipo de análisis, como las pruebas de frecuencia (Steffe, 1996; Gunasekaran, y Mehmet 2000).

El módulo de almacenamiento ( $G'$ ), es una medida de la energía de deformación almacenada en la muestra durante el proceso de corte y representa el comportamiento elástico de la muestra. Por el contrario, el módulo de pérdida ( $G''$ ), es el valor que mide la energía de deformación usada en la muestra durante el corte y representa el carácter viscoso de la muestra (Tabilo-Munizaga, y Barbosa-Canovas, 2005; Rao, 1999; Steffe, 1996). Por lo que si  $G'$  es más grande que  $G''$ , el material se comportará más como un sólido, esto es, las deformaciones pueden ser esencialmente elásticas o recuperables, sin embargo, si  $G''$  es mucho mayor a  $G'$ , la energía usada para deformar el material es disipada por el flujo y el material se comporta como viscoso (Rao, 1999).

En la formulación de sistemas emulsificantes, normalmente se distinguen dos tipos de ingredientes, los emulsificantes y los estabilizantes. Es una sola especie química (o mezcla de especies) que promueve la formación de emulsiones y una estabilización rápida debida a una acción interfacial. Los estabilizantes son generalmente macromoléculas (polímeros), como proteínas o polisacáridos. La principal vía de estabilización es por la modificación en

la viscosidad de un sistema o gelación de la fase continua, Las proteínas tienen un alta tendencia a ser adsorbidas en las interfases aceite-agua (Dickinson, 2003).

Una emulsión estable es aquella que no tiene cambios notables en el tamaño y forma de sus gotas, en su estado de agregación o en el arreglo espacial a través de un tiempo de almacenamiento (Dickinson, 2001 y 2003).

### **Microestructura**

Mediante la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), es posible detectar diferencias sutiles en el arreglo interno de las componentes de un alimento, originadas por alteraciones en su composición química.

La microestructura de una bebida láctea como el yogur consiste en micelas de caseína unidas unas con otras o enlazadas en largas cadenas, las cuales muy frecuentemente aparecen en agregados que mantienen su forma globular, donde se encuentran bacterias lácticas. Dentro de la matriz proteica se encuentran grandes espacios libres. Las bacterias lácticas son fácilmente distinguibles de las micelas de caseína a partir de 2000 aumentos (Kalab, y Sargent, 1975).

## **Materiales y Métodos**

### **Formulaciones de emulsiones**

Se formuló una emulsión sencilla aceite-agua (O/W), constituida por 20 % (p/p) de aceite de canola (Capullo®, Unilever de México, S.A. de C.V.), 80 % (p/p) de leche descremada (Lactomix®, DILAC, S.A. de C.V. México) reconstituida ( $90 \text{ g L}^{-1}$ ) y una mezcla de emulsificantes comerciales de bajo peso molecular ( $3 \text{ g L}^{-1}$  de emulsión): monoestearato de sorbitán polioxietileno (P), monoestearato de sorbitán (S) y monoestearato de glicerol (G) (Canamex, S.A. de C.V., México); estos últimos en proporciones en peso de 0.5:0.2:0.3, respectivamente. El emulsificante P de carácter hidrofílico y los emulsificantes S y G de carácter lipofílico.

Adicionalmente se formularon tres emulsiones múltiples agua-aceite-agua ( $W_1/O/W_2$ ), cuya composición varió en el emulsificante/estabilizante usado en la formación de la emulsión externa aceite-agua ( $O/W_2$ ): pectina de bajo metoxilo (Genu Pectin®, CP Kelco, México), carboximetil celulosa (CMC® CEROL 50 000, Grupo Dermet, S.A. de C.V. México) o monolaurato de sorbitán polioxietileno (Tw) (Canamex, S.A. de C.V., México), en concentraciones de 0.1, 0.05 y  $0.2 \text{ g L}^{-1}$  de emulsión, respectivamente. La emulsión interna de las emulsiones múltiples ( $W_1/O$ ), estuvo constituida por 20 % (p/p) de agua destilada, 80 % (p/p) de aceite de canola y una mezcla de emulsificantes comerciales ( $0.8 \text{ g L}^{-1}$  de emulsión): monoricinoleato de glicerol (Grinsted® PGPR 90, Danisco, México) de carácter lipofílico y monoglicérido esterificado con ácido tartárico diacetilado (Panodan® SD K Datem, Danisco, México) de carácter hidrofílico, en proporciones en peso de 0.8:0.2, respectivamente.

### **Preparación de las emulsiones**

La leche descremada a utilizar en la preparación de la emulsión sencilla aceite-agua (O/W), se reconstituyó en agua destilada a  $40^\circ\text{C}$ , manteniendo esta temperatura y agitación

continua durante 2 h. Posteriormente, la leche reconstituida se calentó en baño de agua hasta alcanzar una temperatura de 50 °C. Por separado, el aceite de canola adicionado con la mezcla emulsificantes se calentó en baño de agua con agitación continua, hasta alcanzar una temperatura de 50 °C. La fase oleosa se adicionó gota a gota a la fase acuosa (leche descremada reconstituida) con la ayuda de un homogenizador X530 CAT (Ingenieurbüro CAT, Zipperer GMBH, Alemania) operado a 11 000 rpm; la agitación se continuó durante 3 min después de añadir la última gota de la fase oleosa.

La preparación de las emulsiones múltiples ( $W_1/O/W_2$ ) se llevó a cabo por el método de dos etapas (Musashino *et al.*, 2001; Allouche *et al.*, 2003). En la primera etapa se formó una emulsión interna  $W_1/O$ , a través de la incorporación de la fase acuosa (agua destilada) a la fase oleosa adicionada con los emulsificantes de bajo peso molecular y el aceite de pescado; ambas fases se mantuvieron a una temperatura de  $20 \pm 2$  °C durante todo el proceso de emulsificación, mediante el uso de baño de hielo. La adición de la fase acuosa a la oleosa, se realizó gota a gota con la ayuda de un homogenizador operado a 15 000 rpm; la agitación se continuó durante 3.5 min después de añadida la última gota de la fase acuosa.

La segunda etapa comprendió la re-emulsificación de la emulsión interna ( $W_1/O$ ) en una fase acuosa externa ( $W_2$ ) que contuvo uno de los agentes emulsificantes/estabilizantes estudiados, resultando de esta manera la formación de emulsiones de tipo  $W_1/O/W_2$ . El procedimiento incluyó la preparación de dispersiones de pectina de bajo metoxilo, carboximetil celulosa y monolaurato de sorbitán polioxietileno en leche descremada ( $20 \pm 2$  °C), la cual previamente se reconstituyó bajo las condiciones descritas en el punto de preparación de la emulsión sencilla aceite-agua. Para obtener completa hidratación de la pectina de bajo metoxilo y de la carboximetil celulosa, sus dispersiones se sometieron a agitación continua, manteniendo la temperatura de  $20 \pm 2$  °C, durante 3 h. La dispersión del monolaurato de sorbitán polioxietileno únicamente se agitó durante 3 min, debido al bajo peso molecular y carácter hidrofílico de este emulsificante. Las dispersiones antes mencionadas conformaron tres fases acuosas externas ( $W_2$ ) de distinta composición, en las

que se incorporó la emulsión interna, gota a gota, con la ayuda de un homogenizador operado a 11 000 rpm, a una temperatura de  $20 \pm 2$  °C; la agitación se continuó durante 3 min después de añadir la última gota de emulsión interna.

Para la preparación de las emulsiones se aplicó un diseño experimental completamente al azar.

### Evaluación de las emulsiones

En la emulsión sencilla aceite-agua (O/W) se determinó el diámetro volumétrico-superficial medio ( $D_{3,2}$ ) de las gotas de aceite usando un equipo analizador de tamaño de partícula y gota Malvern serie 2600 (Malvern Instruments, Malvern, Worcs., Reino Unido).

El diámetro de los glóbulos acuosos presentes en la emulsión interna ( $W_1/O$ ) usada para la preparación de las emulsiones múltiples  $W_1/O/W_2$ , se determinó usando un Microscopio Olympus BX45, equipado con un analizador de imágenes (cámara digital y software Imagen-Pro Plus versión 4.5) (Media Cybernetics Inc. EUA).

Se analizó el diámetro promedio volumétrico de los glóbulos de las emulsiones en función del tiempo.

El diámetro promedio se puede definir como:

$$D_{3,2} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad \text{Diámetro promedio volumétrico superficial}$$

$$D_{4,3} = \sqrt[3]{\frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i}} \quad \text{Diámetro promedio volumétrico}$$

donde  $n_i$  es la gota  $i$ , y  $d_i$  es el diámetro de la gota  $i$ .

A las emulsiones múltiples se les midió el diámetro volumétrico-superficial medio ( $D_{3,2}$ ), así como el diámetro volumétrico medio ( $D_{4,3}$ ) de las gotas  $W_1/O$ , usando un equipo analizador de tamaño de partícula y gota Malvern serie 2600. Adicionalmente se analizó la morfología de las emulsiones múltiples, para caracterizar su tipo en A, B o C, en función de la distribución de sus glóbulos internos de emulsión  $W_1/O$  (Garti, 1997), en un Microscopio Olympus BX45, equipado con un analizador de Imágenes (cámara digital y software Imagen-Pro Plus versión 4.5).

Para todos los casos, las emulsiones se sometieron a las evaluaciones antes señaladas, a las 24 h de haber sido preparadas.

### **Tratamientos de bebidas lácteas fermentadas**

Los tratamientos de bebidas lácteas fermentadas incorporadas con emulsiones, fueron 4: una bebida (BES) conteniendo la emulsión sencilla (O/W) y tres bebidas conteniendo emulsiones múltiples con los siguientes agentes emulsificantes/estabilizantes: pectina de bajo metoxilo (BEMP), carboximetilcelulosa (BEMC) y monolaurato de sorbitán polioxietileno (BEMT). Adicionalmente, se preparó una bebida láctea fermentada como control, a partir de leche entera reconstituida (BGL)

### **Formulación base de las bebidas lácteas fermentadas**

La formulación base de las bebidas lácteas conteniendo emulsiones, para 1 kg, comprendió: 880.4 g de leche descremada (Lactomix®, DILAC, S.A. de C.V. México) reconstituida ( $90 \text{ g L}^{-1}$ ), 52 g de azúcar de mesa, 30 g de emulsión sencilla (O/W) o múltiple ( $W_1/O/W_2$ ), 35 g de jugo de piña comercial (Boing®, Sociedad Cooperativa Pascual, México), 2.6 g de esencia de coco (Deiman S.A. de C.V. México) y cultivo láctico termófilo ( $0.03 \text{ g kg}^{-1}$ ) constituido por *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium* BB-12, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (ABY-1, Chr Hansen, Horsholm, Dinamarca). En el caso de la bebida láctea fermentada control, se utilizó leche

entera en polvo (NIDO®, Nestle, S.A. de C.V. México), reconstituida ( $120 \text{ g L}^{-1}$ ) en una concentración de  $910.4 \text{ g kg}^{-1}$ ; el resto de los ingredientes, a excepción de la emulsión sencilla o las múltiples, fueron los mismos y se usaron en igual concentración que en las bebidas conteniendo emulsiones.

### **Proceso de elaboración de las bebidas lácteas fermentadas**

La leche descremada en polvo se reconstituyó en agua a  $40^\circ\text{C}$ , como se describió en el punto de preparación de la emulsión sencilla (O/W); posteriormente la leche fue adicionada con el azúcar, aplicando agitación continua durante 10 min y manteniendo la temperatura en  $40 \pm 1^\circ\text{C}$ ; pasado este tiempo, se incorporó a la leche la emulsión sencilla o múltiple, según el caso, con agitación suave y se pasteurizó ( $85 \pm 1^\circ\text{C}$ , 10 min). Después del tratamiento térmico la leche se enfrió a  $45 \pm 1^\circ\text{C}$  y se inoculó con el cultivo láctico. La fermentación de la leche se llevó a cabo a  $45 \pm 1^\circ\text{C}$ , hasta obtener una acidez titulable de 75-80 °D. Una vez obtenida la acidez requerida en la leche, se procedió a su enfriamiento a  $4^\circ\text{C}$  y a su almacenamiento bajo refrigeración a la misma temperatura, por 12 h. Se retiró la leche de refrigeración y se le incorporaron el jugo de piña y la esencia de coco, mediante agitación suave, después de lo cual la bebida se sometió a refrigeración hasta su caracterización química, microestructural y reológica. La elaboración de las bebidas correspondientes se aplicó un diseño experimental completamente aleatorio.

### **Análisis de composición química proximal**

A las bebidas lácteas fermentadas, a las 24 h de haber sido preparadas, se les determinó proteína (método de Kjeldahl), grasa (método de Gerber) y humedad (por secado en estufa) (AOAC, 1995).

### **Observación microestructural**

Muestras de alrededor de 1 mL de las bebidas fueron tomadas del centro del recipiente contenedor y se colocaron en tubos de plástico para microcentrífuga, modificados de la

siguiente manera: a los tubos se les cortó el fondo y se les perforó la tapa en forma circular; tanto el fondo como la perforación de la tapa, se cubrieron con malla. Sobre la malla que sustituyó el fondo de los tubos, se colocó la muestra de la bebida. Estos tubos a su vez, se colocaron en forma vertical, con la tapa hacia arriba, en un recipiente de vidrio conteniendo una solución de glutaraldehído al 2 % en buffer de fosfatos (0.1 M, pH 7.2), usada para fijar las proteínas (Kalab *et al.*, 1995). El recipiente de vidrio seleccionado fue tal, que impidió que los tubos flotarán o se voltearan. Las muestras permanecieron sumergidas en la solución de glutaraldehído a  $4 \pm 2$  °C, por 2 h. Después de este tiempo, los tubos se retiraron del recipiente con glutaraldehído y se virió en su interior, a través de la malla colocada en la tapa, solución de buffer de fosfatos para enjuagar la muestra; entonces los tubos se volvieron a sumergir en solución de glutaraldehído, donde permanecieron por 24 h más (4 °C) (McManus *et al.*, 1993). Las muestras se volvieron a lavar con la solución de buffer de fosfatos y se post-fijaron en una solución de tetraóxido de osmio al 1 % en buffer de fosfatos por 2 h, para estabilizar los lípidos insaturados (Kalab *et al.*, 1995). Las muestras post-fijadas se lavaron con la solución de buffer de fosfatos y se deshidrataron mediante su inmersión en soluciones de etanol (30, 50, 70, 80 y 90 %, permaneciendo 1 h en cada una) y en etanol absoluto por 24 h. Posteriormente, las muestras se colocaron en acetona por 2 h y se secaron a punto crítico en un equipo Technics CPA II Critical Point Dryer (Tousimis, Rockville, MD), en dióxido de carbono, sin ser retiradas del tubo que las contuvo desde el inicio de su preparación. Las muestras secas se montaron en los soportes de aluminio con cinta adhesiva doble, usados para Microscopía Electrónica de Barrido y se cubrieron con oro en un equipo Fine Coat Jeol-JFC-1100 (Jeol Ltd., Akishima, Japón). La microestructura de las bebidas se examinó con un microscopio electrónico de barrido de alto vacío Jeol JSM-035 (Jeol Ltd., Akishima, Japón) a 20 kV y magnificaciones de 700 y 4000  $\times$ .

### **Mediciones reológicas dinámicas**

En un reómetro de corte dinámico Physica MCR 301 Dynamic Shear Rheometer (Physica Messtechnik, Stuttgart, Alemania), con una geometría cono-plato y cono rotatorio de 50

mm de diámetro con un ángulo de  $1^\circ$ , se realizaron barridos de amplitud, barridos de frecuencia y pruebas de flujo, fijando un gap de 0.05 mm. Todas las pruebas se realizaron por triplicado a  $4^\circ\text{C}$  manteniendo esta temperatura gracias a un sistema de medición y control de temperatura Physica TEK 150P (Physica Messtechnik, Stuttgart, Alemania). Para todos los casos las muestras de las bebidas (0.5 mL), se colocaron cuidadosamente sobre el plato, dejándole reposar por 30 min para la recuperación de la estructura y la homogenización de la temperatura. Los períodos de medición fueron a 1, 7 y 14 días.

Los barridos de amplitud se realizaron en un intervalo de deformación de 0,05 hasta 5 % a una frecuencia constante de 1 Hz. El análisis de los datos generados nos permitió fijar los parámetros de viscoelasticidad lineal que se aplicarían para los barridos de frecuencia. Dichas condiciones fueron las siguientes: intervalo de frecuencia a utilizar de 10 a 0.01 Hz con una deformación constante de 0.1 %.

Además se realizaron pruebas rotatorias de flujo en las cuales se aplicaron velocidades de cizalla de 1 hasta  $300\text{ s}^{-1}$ . Los datos generados en las curvas de flujo (velocidad de cizalla contra viscosidad y velocidad de cizalla contra esfuerzo cortante) de las bebidas lácteas fermentadas, se analizaron con el paquete Rheoplus.

### **Análisis estadístico**

Los datos se sometieron a Análisis de Varianza de clasificación simple ( $\alpha \leq 0.05$ ); en caso de existir deferencias significativas de las variables respuesta, se aplicó la prueba de Tukey de comparación de medias ( $\alpha \leq 0.05$ ). el análisis de datos se efectuó con el paquete estadístico Statgraphics versión 7 (Statistical Graphics Corp. Manugistic), (Inc. M.A., EUA).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Morfología y tamaño de los glóbulos grasos

En la Tabla 1 se presentan los tamaños de estos glóbulos, a través de sus diámetros: volumétrico-superficial medio ( $D_{3,2}$ ) y volumétrico medio ( $D_{4,3}$ ). Los valores del parámetro volumétrico-superficial medio, están relacionados con el área superficial de los glóbulos grasos expuesta a la fase continua; esto es, entre menor es el diámetro de los glóbulos, mayor es la superficie total de fase dispersa en contacto con la fase continua. Los valores del parámetro volumétrico medio, corresponden al tamaño volumétrico medio de los glóbulos grasos (McClements, 1999) y proporciona información sobre el número de glóbulos presentes en la emulsión.

**Tabla 1. Diámetro volumétrico-superficial medio de los glóbulos de las emulsiones utilizadas para preparar las bebidas lácteas.**

| Código de emulsión | Tipo general de emulsión | $D_{3,2}$<br>( $\mu\text{m}$ ) | $D_{4,3}$<br>( $\mu\text{m}$ ) |
|--------------------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| GL                 | O/W                      | 0.55 a<br>(0.4)                | 0.55 a<br>(0.3)                |
| ES                 | O/W                      | 2.33 b<br>(0.1)                | 2.78 c<br>(0.1)                |
| EMT                | $W_1/O/W_2$              | 2.39 b<br>(0.1)                | 2.85 c<br>(0.1)                |
| EMP                | $W_1/O/W_2$              | 3.00 c<br>(0.2)                | 3.39 d<br>(0.2)                |
| EMC                | $W_1/O/W_2$              | 2.27 b<br>(0.1)                | 2.34 b<br>(0.1)                |

ES: emulsión sencilla; EMT: emulsión múltiple conteniendo Tween 20; EMP: emulsión múltiple conteniendo pectina de bajo metoxilo; EMC: emulsión múltiple conteniendo carboximetilcelulosa; GL: Grasa Láctea. Medias en una misma columna con letras distintas, son diferentes significativamente ( $\alpha \leq 0.05$ ). Valores en paréntesis corresponden a desviación estándar.

Los glóbulos de grasa láctea a los que se determinó su tamaño (Tabla 1) y morfología (Fig. 1), estuvieron contenidos en leche entera en polvo reconstituida, la cual fue usada para la elaboración de la bebida láctea control (BGL). Los glóbulos de grasa láctea presentaron forma esférica y tamaños muy pequeños, menores ( $p \leq 0.05$ ) a aquellos correspondientes a los glóbulos grasos de las emulsiones sencilla y múltiples preparadas (Tabla 1). También pudo apreciarse que los glóbulos de grasa láctea se encontraron distribuidos individualmente y rodeados por proteínas lácteas con las que estuvieron estrechamente

asociados (Figura 1). La leche fluida para ser deshidratada, generalmente es sometida a calentamiento (pre-concentración y secado por aspersión) y homogenización (leche concentrada), procesos que modifican tanto el tamaño, como la composición química de la película interfacial de los glóbulos de grasa láctea. Se ha informado que el calentamiento de leche cruda, resulta en desnaturalización parcial y reorganización estructural de las proteínas de la membrana y depósito de material proteínico proveniente del lactosuero (micelas de caseína y proteínas de lactosuero) sobre la superficie de los glóbulos grasos. Sin embargo, el efecto más pronunciado en la reorganización estructural de la película interfacial aceite-agua y estabilización de los glóbulos grasos, es originada por el proceso de homogenización. Conforme los tamaños de los glóbulos decrecen durante la homogenización, se incrementa el área superficial de la fase grasa, convirtiéndose en más extensa que aquella en el producto original, por lo que algunos glóbulos grasos coalescen durante este proceso. Parte del material de la membrana es removido de la superficie de los glóbulos grasos, formándose una nueva película interfacial compuesta predominantemente por material activo superficialmente, el cual llega a la interfase proveniente del suero de la leche: micelas de caseína más o menos deformadas y proteínas de lactosuero (Sharma y Dalgleish, 1993; Lee y Sherbon 2002).

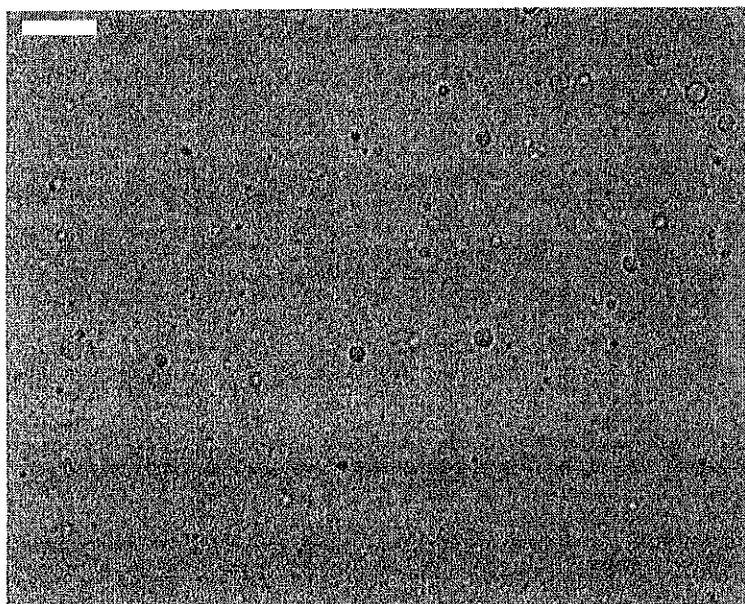


Figura 1. Micrografía de los glóbulos grasos contenidos en la leche entera en polvo reconstituida 24 h después de elaboración. (Magnificación 100×). Barra escala 10  $\mu$ m.

Durante el tiempo de almacenamiento de las bebidas lácteas, se realizó un seguimiento de la morfología y el tamaño de sus glóbulos grasos, usando un microscopio óptico y un software para análisis de imágenes. El tamaño de los glóbulos grasos es expresado como su diámetro medio en la Tabla 2. Los glóbulos de grasa láctea (Figs. 2 y 3) conservaron su morfología y distribución durante el almacenamiento de la bebida control (BGL).

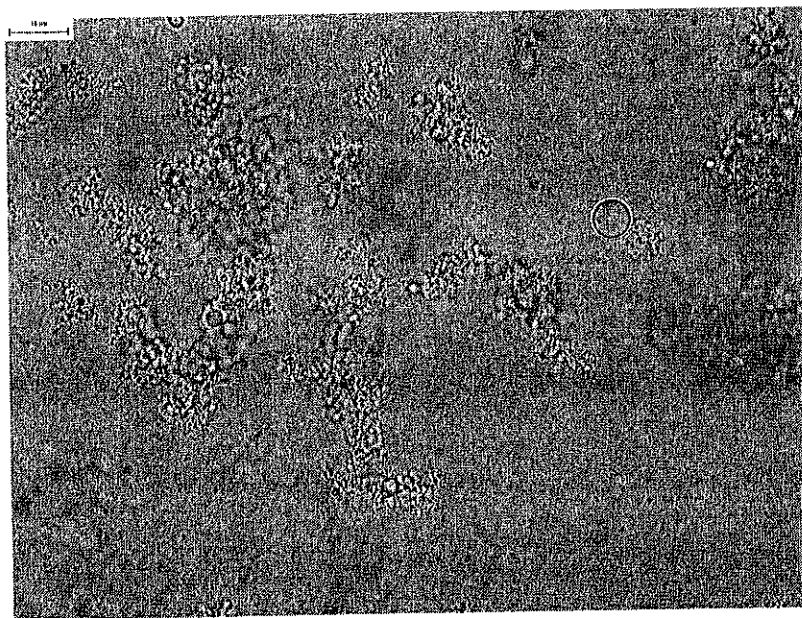


Figura 2. Micrografía de los glóbulos grasos contenidos en la bebida control (BGL) después de 7 días de almacenamiento (Magnificación 100×). Barra escala 10  $\mu\text{m}$ .

Aparentemente, existe una gran diferencia entre el tamaño de los glóbulos de grasa láctea en la leche entera reconstituida, con los tamaños encontrados en la BGL a los 7 y 14 días de almacenamiento; no obstante, la explicación a tal aparente diferencia, puede residir en los métodos usados para la determinación del tamaño medio de los glóbulos, en la leche y en la bebida. En el primer caso, se determinaron los parámetros  $D_{3,2}$  y  $D_{4,3}$  de los glóbulos grasos en leche fluida usando un equipo analizador de tamaño de partícula de alta resolución y en el segundo caso, se determinó el diámetro medio de los glóbulos grasos en una estructura gelificada usando un microscopio óptico y un analizador de imágenes. La limitada magnificación del microscopio óptico probablemente impidió la observación de glóbulos grasos muy pequeños y en consecuencia la determinación de su diámetro; además, como puede observarse en las figuras 2 y 3, los glóbulos grasos aparecen cubiertos por restos de red proteínica que impidieron su correcta visualización y determinación de sus diámetros.

Al comparar los diámetros de los glóbulos de grasa láctea, correspondientes a los 7 y 14 días de almacenamiento, puede apreciarse que mantuvieron sus tamaños (Tabla 2), debido a la estabilización conferida por la proteína láctea depositada en su superficie y por la estructura de gel formada por la caseína en la bebida.

**Tabla 2. Diámetro medio de los glóbulos grasos de las bebidas lácteas en dos periodos de almacenamiento.**

| Código de bebida | D (7 d)<br>( $\mu\text{m}$ ) | D (14 d)<br>( $\mu\text{m}$ ) |
|------------------|------------------------------|-------------------------------|
| BES              | 3.3 b<br>(0.9)               | 3.03 a<br>(1.7)               |
| BEMT             | 2.95 ab<br>(1.5)             | 3.10 a<br>(1.1)               |
| BEMP             | 4.51 c<br>(2.0)              | 5.73 b<br>(2.2)               |
| BEMC             | 2.41 a<br>(1.6)              | 2.60 a<br>(1.1)               |
| BGL              | 3.05 abc<br>(2.0)            | 3.24 a<br>(1.1)               |

BES: Bebida con emulsión sencilla; BEMT: Bebida adicionada con emulsión múltiple conteniendo Tween 20; BEMP: Bebida con emulsión múltiple conteniendo pectina de bajo metoxilo; EMC: emulsión múltiple conteniendo carboximetilcelulosa; BGL: Bebida con Grasa Láctea. Medias en una misma columna con letras distintas, son diferentes significativamente ( $\alpha \leq 0.05$ ). Valores en paréntesis corresponden a desviación estándar.

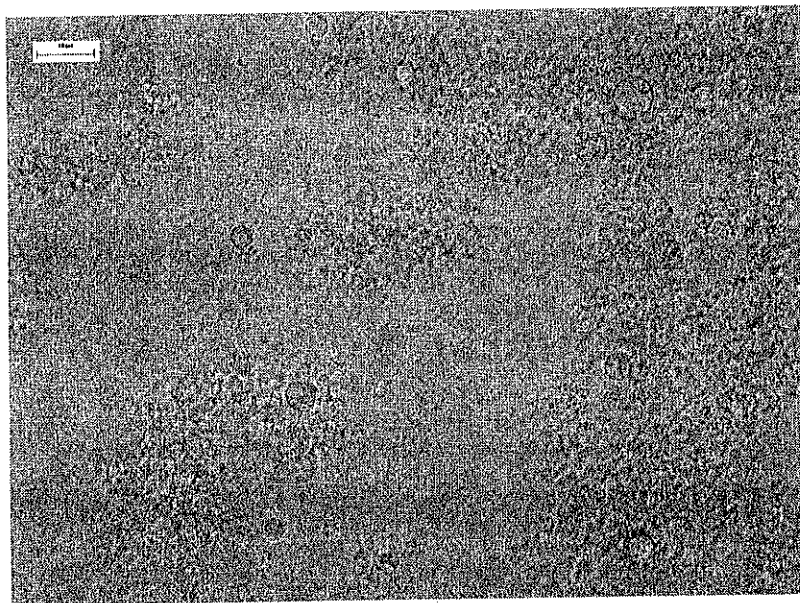


Figura 3. Micrografía de los glóbulos grasos contenidos en la bebida control (BGL) después de 14 días de almacenamiento (Magnificación 100 $\times$ ). Barra escala 10  $\mu\text{m}$ .

La emulsión sencilla y las múltiples después de 24 h de preparadas, mostraron glóbulos grasos que variaron ( $p \leq 0.05$ ) en sus tamaños (valores  $D_{3,2}$  y  $D_{4,3}$ ) (Tabla 1), en función de

la naturaleza y las propiedades funcionales de los agentes emulsificantes/estabilizantes usados en su elaboración. El tamaño de los glóbulos de la fase dispersa de una emulsión, es determinado por los dos procesos fundamentales que ocurren durante su preparación: la fragmentación de la fase dispersa en glóbulos pequeños y la coalescencia de estos últimos. Estos dos procesos se desarrollan concurrentemente y las velocidades relativas de ambos determinan el tamaño final de gota o glóbulo. Los agentes emulsificantes/estabilizantes tienen efectos sobre ambos procesos (a) reduciendo la tensión superficial y la energía interfacial, promoviendo así la ruptura de la fase dispersa y (b) proporcionando una barrera a la coalescencia vía interacciones entre las capas adsorbidas sobre dos gotas que colisionen (Lobo y Svereika, 2003).

La emulsión sencilla ES consistió de glóbulos grasos esféricos (Fig. 4), de tamaño heterogéneo, distribuidos predominantemente en forma individual, existiendo sólo algunos de ellos formando grupos o "racimos"; esto último indica la ocurrencia de un estado débil de floculación. El fenómeno de floculación se origina cuando dos o más partículas coloidales forman agregados relajados, flexibles y reversibles, debido a que la energía libre de interacción entre las mismas es apreciablemente negativa a cierto grado de separación. Los dos factores motores para la agregación de glóbulos grasos son el movimiento Browniano y el flujo de corte (Dickinson, 1992). El valor  $D_{3,2}$  de los glóbulos grasos de la ES fue comparable ( $p > 0.05$ ) a aquellos presentados por los glóbulos de emulsión interna o grasos obtenidos en las emulsiones múltiples EMT y EMC y menor ( $p \leq 0.05$ ) al mostrado por los glóbulos grasos contenidos en la emulsión múltiple EMP (Tabla 1). El valor  $D_{4,3}$  de los glóbulos grasos de la ES fue también comparable ( $p > 0.05$ ) al exhibido por los glóbulos de emulsión interna o grasos de la EMT y menor ( $p \leq 0.05$ ) al observado en los glóbulos grasos de la EMP. El tamaño y la morfología de los glóbulos grasos de la ES son resultado de las condiciones de homogenización, así como de la acción de los emulsificantes de bajo peso molecular (EBPM) usados en su preparación. Estos últimos influyeron en la tensión interfacial y en la estabilización de los glóbulos grasos formados durante el proceso de homogenización. Lobato-Calleros *et al.* (2003), utilizaron la misma mezcla de EBPM para la preparación de emulsiones de aceite de canola-en-leche descremada, obteniendo glóbulos

grasos de tamaño y morfología similares a las observadas en la ES. Estos autores encontraron que aumentos en la proporción en peso del emulsificante monoestearato de sorbitán polioxietileno (P), de carácter hidrofílico, sobre las proporciones en peso de los emulsificantes monoestearato de sorbitán (S) y monoestearato de glicerol (G), de carácter lipofílico, resultó en la formación de glóbulos grasos de menor tamaño, como resultado de las propiedades tensoactivas del primero en la interfase aceite-agua y que la mezcla formada por P, S y G en proporciones en peso de 0.5-0.2-0.3, igual a la que se usó en la preparación de la ES, fue la que rindió los glóbulos grasos de menor tamaño y buena estabilidad.

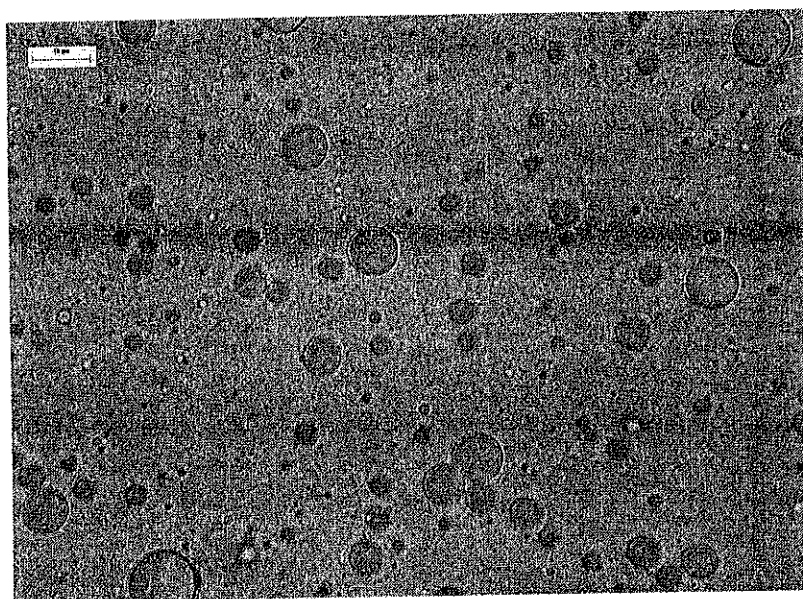


Figura 4. Micrografía de los glóbulos grasos contenidos en la emulsión sencilla (ES) 24 horas después de su elaboración. (Magnificación 100×). Barra escala 10 µm.

El tamaño de los glóbulos grasos en la BES no varió durante el tiempo de almacenamiento (Tabla 2), mostrando estabilidad adecuada. En la estabilidad de los glóbulos grasos intervinieron los EBPM y las lactoproteínas presentes en la fase dispersante (leche descremada). La estabilización de emulsiones aceite-en-agua por moléculas pequeñas de emulsificantes, es limitada y se basa principalmente en fuerzas repulsivas de hidratación (Fisher y Parker, 1988) que retardan la floculación y la coalescencia de los glóbulos grasos (Lobato-Calleros, *et al.*, 2003). La repulsión por hidratación es una fuerza que decae exponencialmente en un corto rango de sólo unos pocos nanómetros (Dickinson, 1992). Con base en lo antes expuesto, se ha sugerido el uso de macromoléculas, tales como las

proteínas para la estabilización a largo plazo de las emulsiones. El efecto de estabilización proporcionado por la capa proteínica de carácter polimérico, es conocido como “estabilización estérica” (Garti, 1997). En la preparación de emulsiones en presencia de lactoproteínas y EBPM, estos compiten por su adsorción en la interfase (Euston *et al.*, 1995). Los EBPM hidrosolubles, como P, desplazan más proteína de la interfase que aquellos liposolubles, como S y G; los primeros proyectan la mayor parte de sus moléculas hacia la fase acuosa continua, mientras que los EBPM liposolubles se localizan predominantemente en la fase oleosa de la interfase, haciendo posible que una monocapa lipídica coexista con la proteína adsorbida en la fase acuosa (Dickinson, 1992; Dickinson y Tanai, 1992). Lobato-Calleros *et al.* (2003), informaron que aunque P desplaza más proteína de la interfase que S y G, la proteína remanente adsorbida se rearregla en una configuración más compacta formando una capa más densa alrededor de los glóbulos grasos, la cual contribuye a su estabilidad.

Las figuras 5 y 6, muestran micrografías representativas de los glóbulos grasos contenidos en la BES, después de 7 y 14 d de almacenamiento. Los glóbulos grasos, en general, conservaron forma esférica y se encontraron distribuidos predominantemente en forma individual, encontrándose sólo algunos de ellos a distancias muy cortas entre sí (Fig. 5). Estos últimos glóbulos mostraron compresión o “achatación” de las capas adsorbidas, pero no interpenetración. Dickinson (1992) establece que cuando dos glóbulos cubiertos por polímeros se aproximan pueden experimentar compresión de sus capas poliméricas adsorbidas, generándose una contribución elástica y repulsiva fuerte entre glóbulos. En la figura 6, puede apreciarse un glóbulo graso totalmente cubierto por proteína, fundamentalmente caseína, lo cual parece indicar que hubo cierto grado de interacción entre los glóbulos grasos atrapados en la red proteínica con esta última.

La preparación de las emulsiones múltiples ( $W_1/O/W_2$ ) involucró dos pasos; el primero consistió en la formación de una emulsión interna ( $W_1/O$ ) utilizando en exceso un emulsificante hidrofóbico (monoricinoleato de glicerol) en relación a un emulsificante hidrofílico (monoglicérido esterificado con ácido tartárico diacetilado), en proporciones en peso de 0.8:0.2, respectivamente. La actividad superficial de estos emulsificantes, aunada al

enérgico proceso de homogenización (15 000 rpm), permitió la obtención de glóbulos de agua muy pequeños (Fig. 7) dispersos en la fase oleosa (Garti, 1997). El diámetro medio de las gotas de emulsión interna ( $W_1/O$ ) de las emulsiones múltiples fue de  $0.11 \pm 0.01 \mu\text{m}$ .

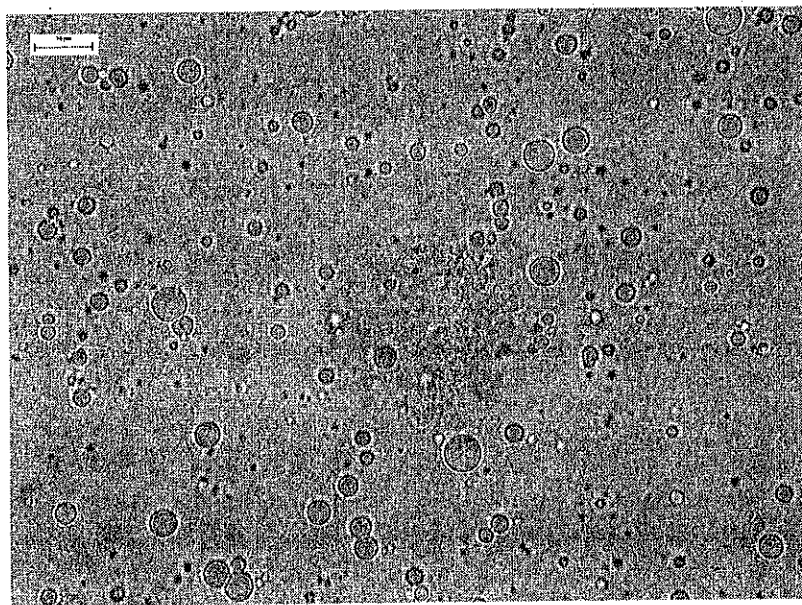


Figura 5. Micrografía de los glóbulos grasos contenidos en BES después de 7 días de almacenamiento (Magnificación 100×). Barra escala 10  $\mu\text{m}$ .

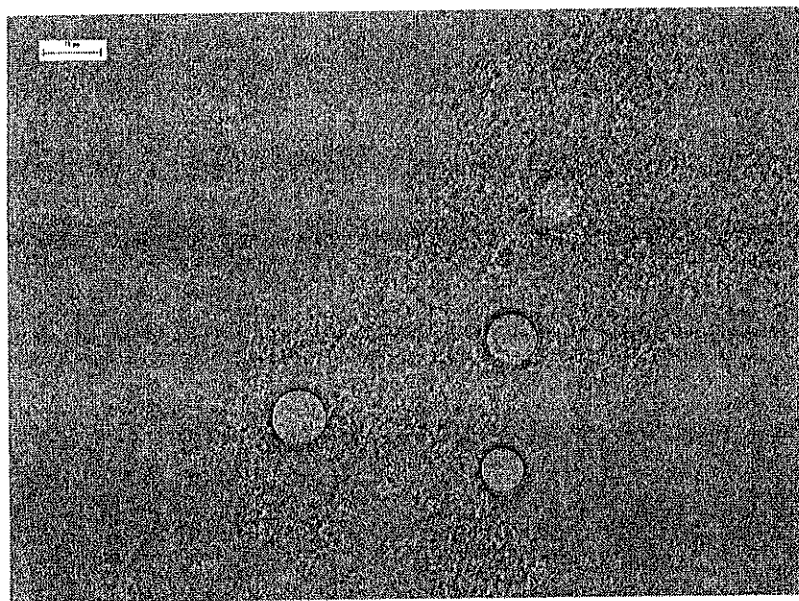


Figura 6. Micrografía de los glóbulos grasos contenidos en la bebida BES después de 14 días de almacenamiento (Magnificación 100×). Barra escala 10  $\mu\text{m}$ .

El segundo paso para la preparación de las emulsiones múltiples, consistió en la incorporación de la emulsión interna ( $W_1/O$ ) a leche descremada ( $W_2$ ) conteniendo diferentes agentes emulsificantes/estabilizantes (Tabla 1), mediante agitación moderada (11 000 rpm).

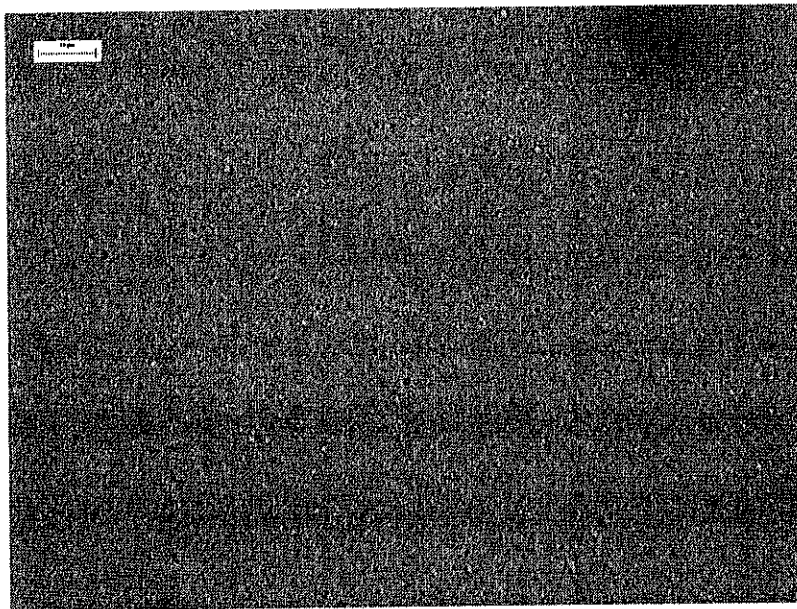


Figura 7. Micrografía de los glóbulos acuosos contenidos en la emulsión primaria agua en aceite  $W_1/O$  a 24 horas de su elaboración (Magnificación 100 $\times$ ). Barra escala 10  $\mu$ m.

Todas las emulsiones múltiples resultantes (Figs. 8 a 16), presentaron glóbulos de emulsión interna de estructura vesicular, en cuyo interior se encontraron numerosos glóbulos de agua o compartimentos acuosos, los cuales estuvieron separados de la fase acuosa externa mediante la fase oleosa en forma de glóbulos de diversos tamaños. La morfología mostrada por los glóbulos de emulsión interna, permitió su clasificación en emulsiones múltiples de tipo C. Cuando los glóbulos de emulsión interna contienen sólo una gota de fase dispersa, se trata de emulsiones múltiples del tipo A; cuando estos glóbulos de emulsión interna contienen pocos glóbulos de fase dispersa, las emulsiones múltiples se consideran del tipo B y cuando los glóbulos de emulsión interna contienen numerosos glóbulos de fase dispersa, las emulsiones múltiples se clasifican en tipo C (Garti, 1997).

La emulsión múltiple EMC (Fig. 8) estuvo constituida por glóbulos de emulsión interna de tamaño heterogéneo, predominando aquellos de tamaño pequeño, distribuidos en la fase

acuosa individualmente y en grupos floculados poco numerosos. El diámetro  $d_{3,2}$  de los glóbulos grasos de la EMC fue comparable a los valores observados en los glóbulos grasos de la ES y la EMT ( $p \geq 0.05$ ), pero menor ( $p < 0.05$ ) al mostrado por los glóbulos de la EMP (Tabla 1). El diámetro  $d_{4,3}$  de los glóbulos grasos de la EMC fue menor ( $p \leq 0.05$ ) que aquellos observados en los glóbulos grasos de las emulsiones ES, EMT y EMP, indicando la existencia de un mayor número de glóbulos grasos en EMC, en comparación con los contenidos en las emulsiones ES, EMT y EMP, debido al volumen menor de los primeros (Tabla 1).

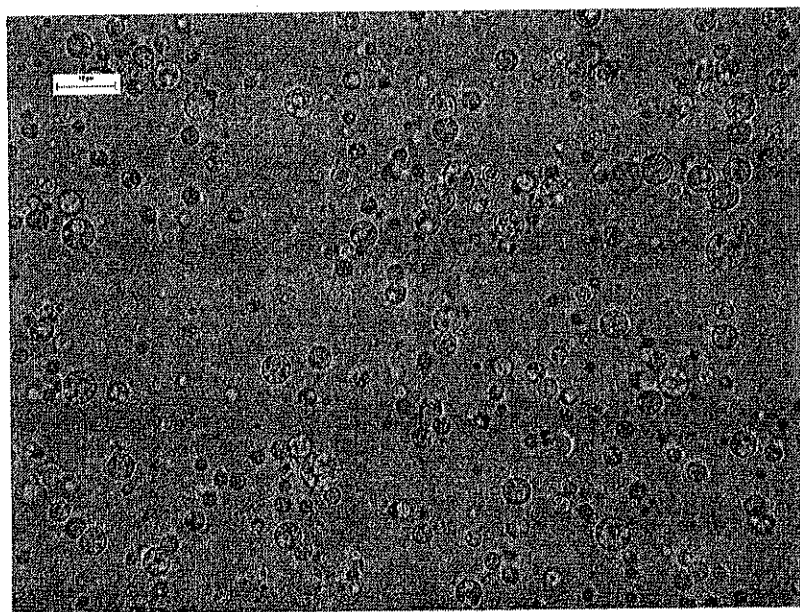


Figura 8. Micrografía de los glóbulos grasos contenidos en la emulsión múltiple (EMC) a 24 horas de su elaboración (Magnificación 100×). Barra escala 10  $\mu$ m.

Todas las emulsiones múltiples fueron preparadas a partir de la misma emulsión interna, por lo que variaciones en el tamaño de sus glóbulos grasos, se deben a los agentes emulsificantes/estabilizantes utilizados para la reemulsificación de la emulsión interna en la fase continua constituida por leche descremada. La naturaleza química, propiedades funcionales e interacciones entre las moléculas de los agentes emulsificantes/estabilizantes entre sí y con moléculas del resto de los componentes de las emulsiones, afectaron el tamaño de los glóbulos grasos. Con base en lo antes expuesto, se deduce que la carboximetilcelulosa contribuyó a la obtención de una emulsión, la cual después de 24 h,

presentó glóbulos grasos de menor volumen y en mayor número que los encontrados en el resto de las emulsiones preparadas. La carboximetilcelulosa (CMC) es uno de los polisacáridos que puede ser añadido a la fase acuosa de emulsiones alimenticias para incrementar su viscosidad y mejorar su estabilidad. La tasa a la que procede la floculación puede ser controlada por manipulación de la frecuencia de colisión de los glóbulos grasos y una de las formas para reducir dicha frecuencia en una emulsión no agitada, consiste en incrementar la viscosidad de la fase continua (McClements, 1999). Quintana *et al.* (2002) informaron que la adición de agentes espesantes (goma de xantana, almidón de papa y goma guar) mejoró la estabilidad de emulsiones aceite-en-agua. El efecto espesante de CMC, aunado a la inmovilización del lactosuero por la estructura proteínica, contribuyó a que los glóbulos grasos contenidos en la BCMC (Figs. 9 y 10) conservaran su tamaño pequeño, distribución y morfología tipo C, durante el almacenamiento.

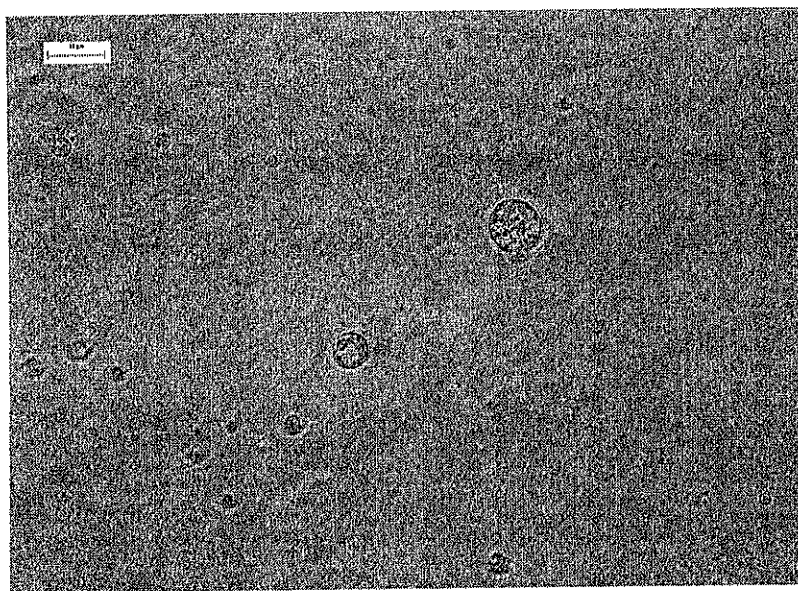


Figura 9. Micrografía de los glóbulos grasos contenidos en la bebida (BEMC) después de 7 días de almacenamiento (Magnificación 100×). Barra escala 10  $\mu\text{m}$ .

La emulsión EMT (Fig. 11) a las 24 h de elaborada, estuvo constituida por pequeños glóbulos de emulsión interna o grasos, predominantemente dispersos en forma individual en la fase acuosa externa. Las moléculas de Tween 20, de carácter hidrofílico, dispersas en la fase acuosa externa, tienen la capacidad de difundirse rápidamente a la interfase aceite-agua proyectando su mayor parte hacia la fase acuosa, causando una gran disminución en la

tensión interfacial, mayor aún a la provocada por las lactoproteínas, con la consecuente formación de glóbulos grasos muy pequeños (Dickinson, 1992). Lobato-Calleros *et al.* (2003), informaron que a mayores valores de balance hidrofílico-lipofílico (HLB) del agente emulsificante usado en la elaboración de emulsiones sencillas aceite de canola - en-leche descremada, menor fue el diámetro de los glóbulos grasos, debido a su actividad superficial. No obstante, esta emulsión presentó signos de inestabilidad en la bebida BEMT con el tiempo de almacenamiento, los cuales fueron apreciados mediante microscopía óptica. Al comparar la morfología de los glóbulos grasos en BEMT durante el almacenamiento (Figs. 12 y 13) con la correspondiente de los glóbulos grasos de la EMT a las 24 h de elaborada, se observa que no hubo cambio en su tamaño (Tabla 2), pero sí cierto número de los glóbulos grasos en la BEMT, sufrieron pérdida de microgotas de agua contenidas originalmente en el interior de la emulsión interna ( $W_1/O$ ), debido a su migración hacia la fase acuosa externa ( $W_2$ ). Los cambios en la morfología de los glóbulos grasos en la BEMT sugieren que en la interfase, predominaron las moléculas del EBPM sobre las de las lactoproteínas, debido al poder de desplazamiento de las primeras sobre las segundas (Euston *et al.*, 1995). Se ha informado que los emulsificantes monoméricos, como Tween 20, tienen algunas limitaciones en la estabilización de emulsiones múltiples, en contraste con aquellos de tipo polimérico, como las gomas y proteínas. Omotosho *et al.* (1989), encontraron que surfactantes con valores elevadores de HLB, como el Tween 20, usados como emulsificantes secundarios (en la fase  $W_2$ ), incrementaron la tasa de liberación de metotrexate incluido en la fase interna de emulsiones  $W_1/O/W_2$ . Kita *et al.* (1978) han sugerido dos mecanismos posibles para la permeación de la fase acuosa interna hacia la fase acuosa externa, a través de la fase oleosa; el primero vía transporte micelar reverso y el segundo por difusión a través de una lamela muy delgada de la fase surfactante formada en áreas donde la capa de aceite es muy delgada. En la figura 13, puede observarse la agregación de gotas de agua en una área muy cercana a la película interfacial aceite-en-agua, en la cual el grosor de la capa oleosa es menor que en resto del glóbulo.

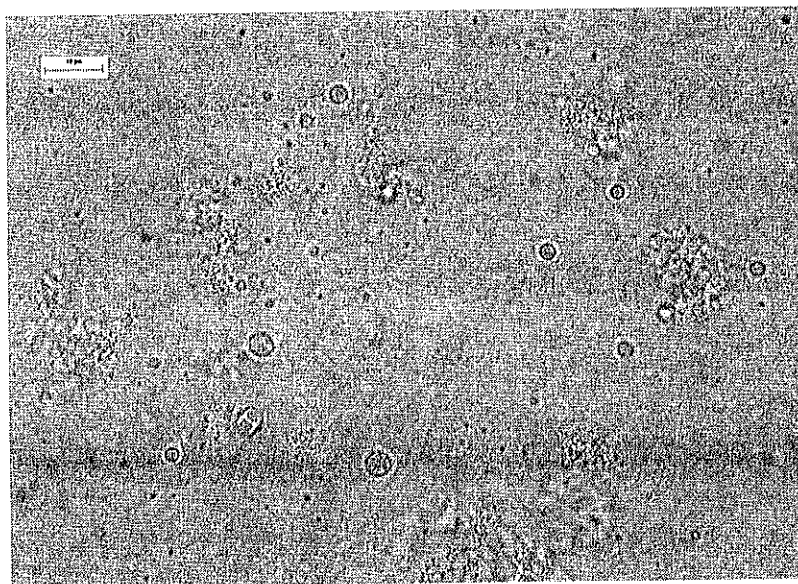


Figura 10. Micrografía de los glóbulos grasos contenidos en la bebida (BEMC) después de 14 días de almacenamiento (Magnificación 100×). Barra escala 10  $\mu$ m.

Los glóbulos grasos de la emulsión EMP mostraron valores de  $D_{3,2}$  y  $D_{4,3}$  mayores ( $p < 0.05$ ) a los exhibidos por los glóbulos del resto de las emulsiones (Tabla 1); también estos glóbulos mostraron tamaños muy heterogéneos a las 24 h de elaborada la emulsión (Fig. 14), algunos de ellos se encontraron en estado floculado y otros más en proceso de coalescencia. Durante el almacenamiento de la bebida BEMP, el tamaño de los glóbulos grasos se incrementó (Tabla 2), no obstante la fase acuosa  $W_1$ , en términos generales, se conservó atrapada en la emulsión interna ( $W_1/O$ ) en forma de pequeñísimas gotas (Figs. 15 y 16). Lo antes expuesto, sugiere que la migración de la fase acuosa interna hacia la fase acuosa externa, a través de la fase oleosa, fue limitada por la presencia de pectina de bajo metoxilo en dicha fase acuosa externa, pero no así la coalescencia entre glóbulos. En este caso, el uso de pectina de bajo metoxilo, altamente reactiva a los iones  $Ca^{+2}$ , favoreció la floculación y coalescencia de los glóbulos grasos, pero impidió la migración de  $W_1$  hacia  $W_2$ . La proteína asociada con las pectinas desempeña un papel importante en la formación y estabilización de emulsiones, pues es a través de esta fracción proteínica adsorbida en la interfase aceite-agua, que las cadenas de pectina rodean y estabilizan los glóbulos de aceite, orientándose sus cadenas hacia la fase acuosa. No obstante, la asociación de cadenas de

pectina en presencia de iones  $\text{Ca}^{+2}$  rinde glóbulos grasos de mayor tamaño, como resultado de procesos de floculación (Leroux, *et al.*, 2003).

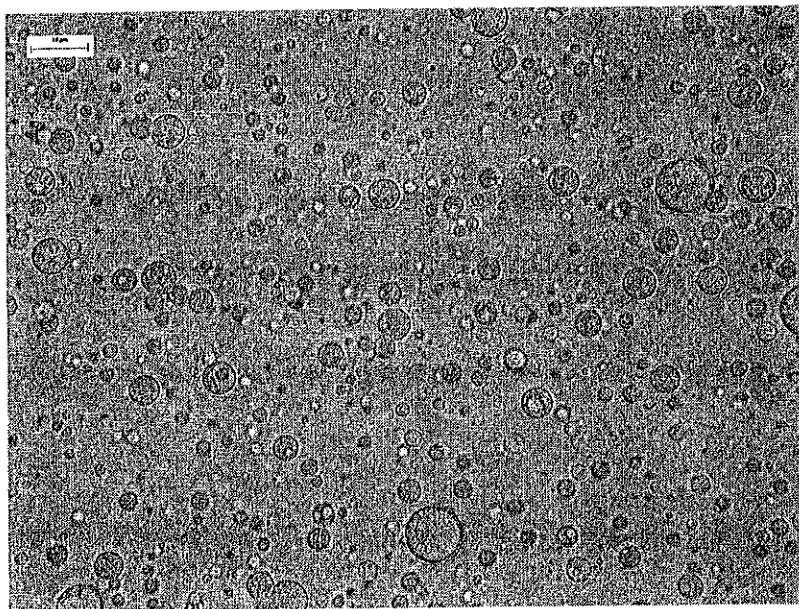


Figura 11. Micrografía de los glóbulos grasos contenidos en la emulsión múltiple (EMT) a 24 horas de elaboración (Magnificación 100×). Barra escala 10  $\mu\text{m}$ .

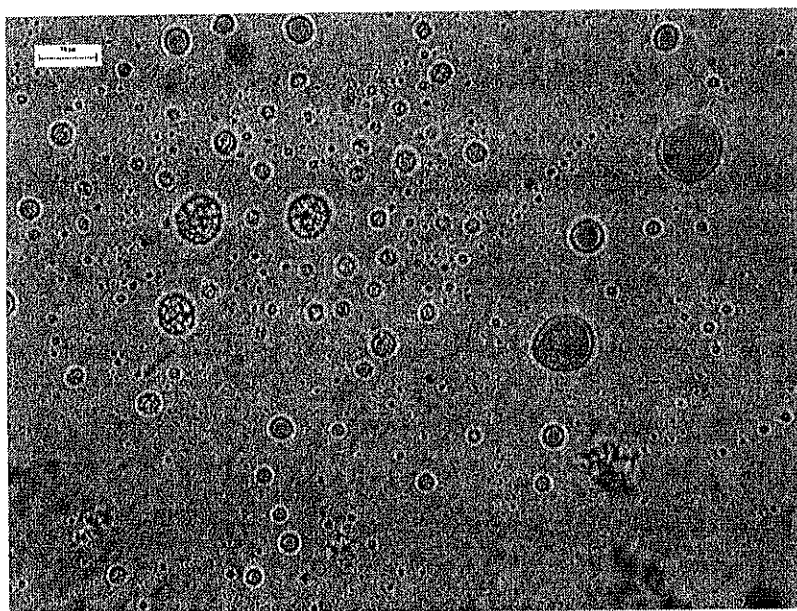


Figura 12. Micrografía de los glóbulos grasos contenidos en la bebida (BEMT) después de 7 días de almacenamiento (Magnificación 100×). Barra escala 10  $\mu\text{m}$ .

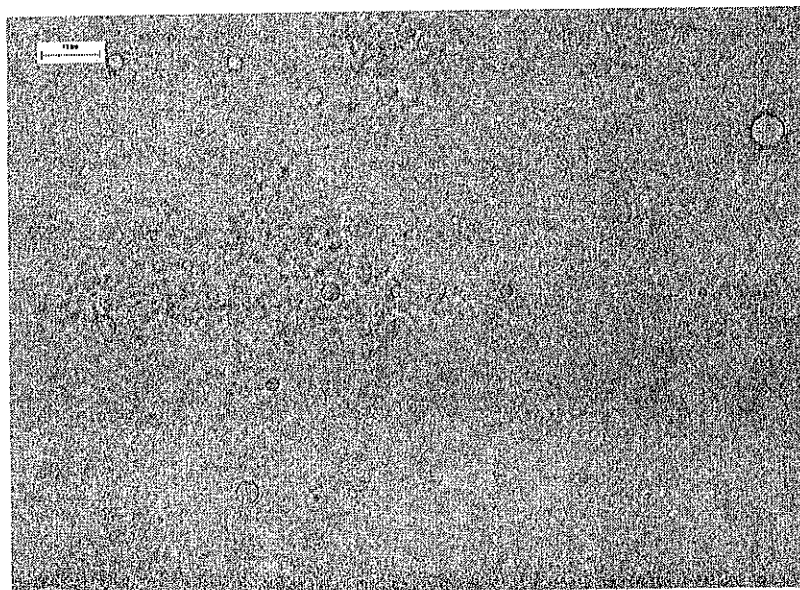


Figura 13. Micrografía de los glóbulos grasos contenidos en la bebida (BEMT) después de 14 días de almacenamiento (Magnificación 100×). Barra escala 10  $\mu\text{m}$ .

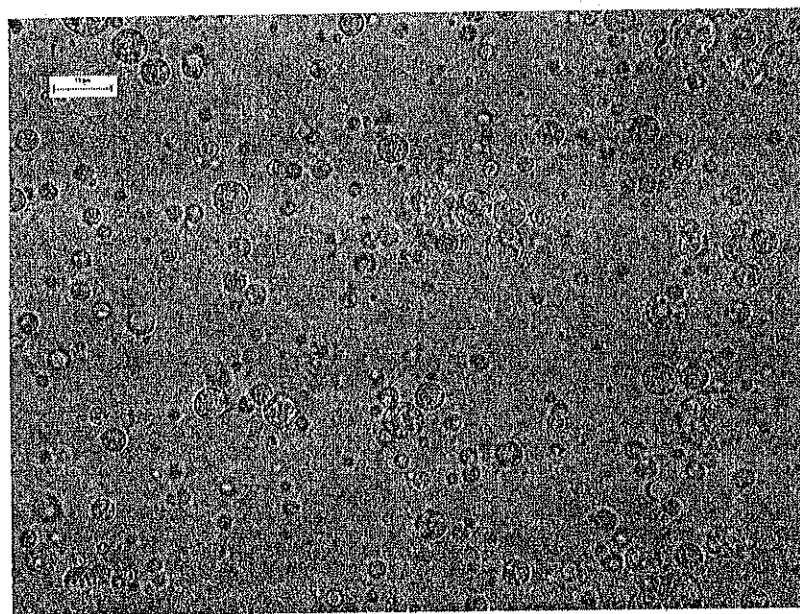


Figura 14. Micrografía de los glóbulos grasos contenidos en la emulsión múltiple Pectina (EMP) a 24 horas de su elaboración (Magnificación 100×). Barra escala 10  $\mu\text{m}$ .

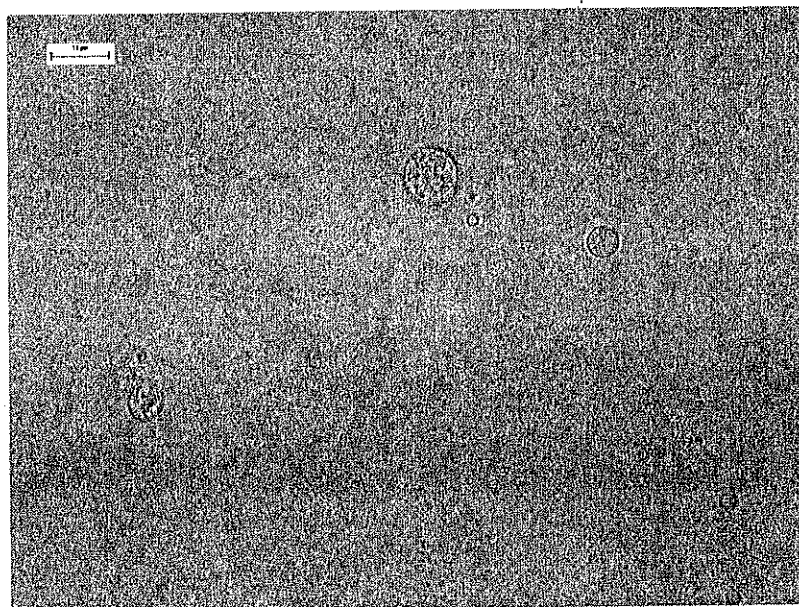


Figura 15. Micrografía de los glóbulos grasos contenidos en la bebida (BEMP) después de 7 días de almacenamiento (Magnificación 100×). Barra escala 10  $\mu\text{m}$ .

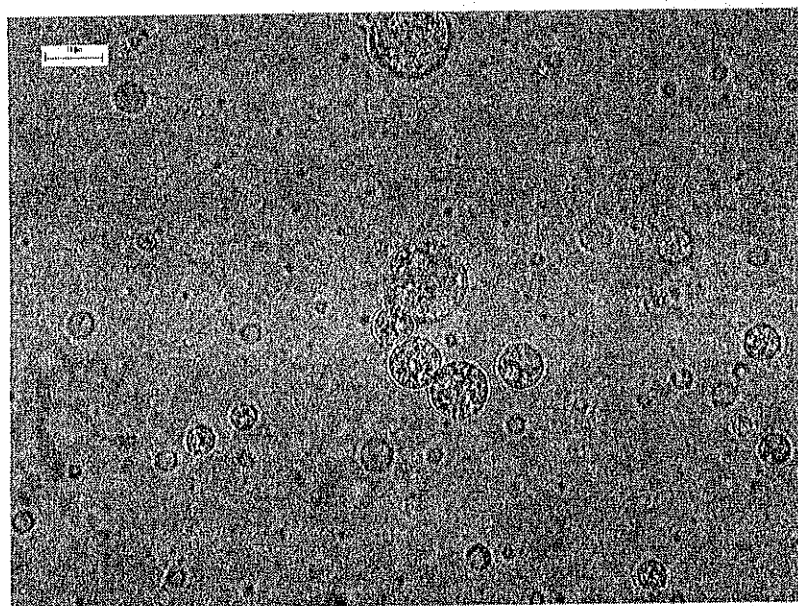


Figura 16. Micrografía de los glóbulos grasos contenidos en la bebida (BEMP) después de 14 días de almacenamiento (Magnificación 100×). Barra escala 10  $\mu\text{m}$ .

### **Comportamiento reológico y microestructura de las bebidas lácteas**

La figura 17 muestra los valores de los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y de pérdida ( $G''$ ) de las distintas bebidas, al aplicarles un barrido de amplitud (0.05 a 5 % de deformación), a

las 24 h de elaboradas.  $G'$  y  $G''$ , presentaron valores prácticamente constantes, adquiriendo sus curvas la forma de una meseta, en el intervalo de 0.05 a 1 % de deformación de las muestras de bebida. Los datos antes expuestos indican que las bebidas tuvieron comportamiento viscoelástico lineal cuando fueron deformadas hasta un límite de 1 %. A deformaciones mayores, los valores de  $G'$  y  $G''$  decayeron, tendiendo a traslaparse al final del barrido de amplitud, como resultado de su degradación. En todo el rango de deformación estudiado, las bebidas exhibieron comportamiento predominantemente elástico, inferido por los valores de  $G'$  mayores que los de  $G''$ . El punto de cedencia (traslape de las curvas de  $G'$  y  $G''$ ) de la estructura de las bebidas no fue alcanzado, puesto que la deformación aplicada fue menor a la requerida para su fluidez; no obstante, puede observarse que la estructura de los geles de las bebidas fueron muy débiles, puesto que a deformaciones tan bajas como 5 %, presentaron degradación severa (Steventon *et al.*, 1990).

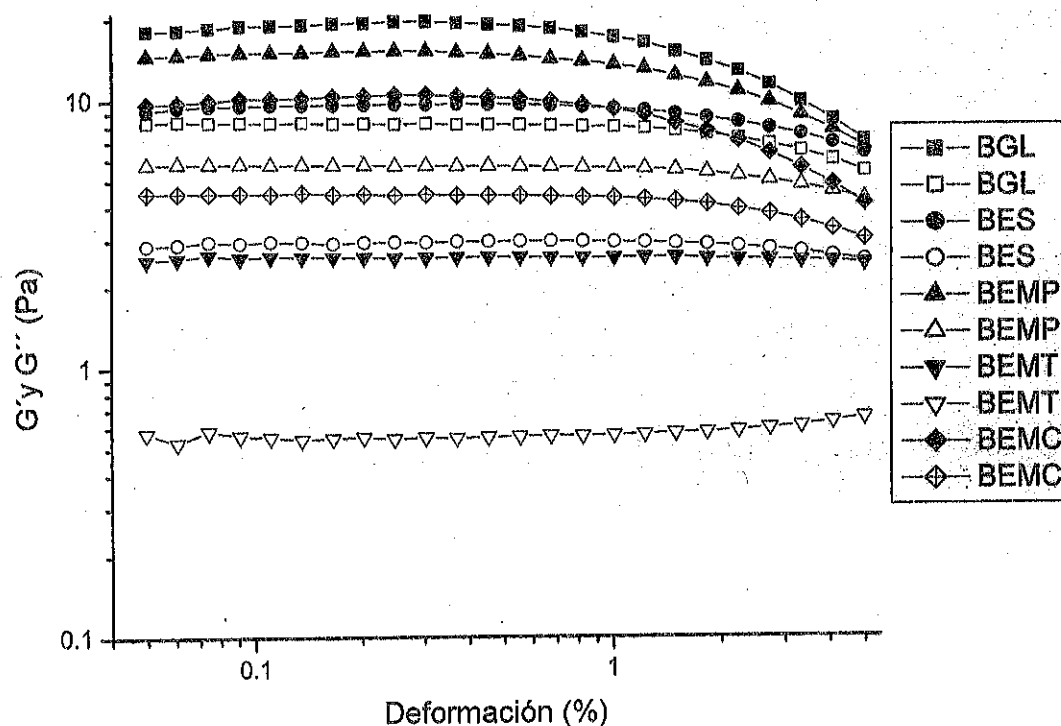


Figura 17. Diagrama de amplitud en la que se representan  $G'$  y  $G''$  de todos los tratamientos a 24 h de elaborados. Frecuencia 1 Hz

Las estructuras de las bebidas BGL, BEMP, BEMC y BES fueron más elásticas que la bebida BEMT, presentando las primeras valores mayores de  $G'$  que la última (Fig. 17). La explicación a diferencias en el comportamiento reológico de las bebidas en función de su composición y estructura se describe a continuación.

La figura 18 muestra el comportamiento a las 24 h de almacenamiento, del módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y del módulo de pérdida ( $G''$ ) en función de la frecuencia, de la bebida láctea control (BGL) y de aquellas conteniendo emulsiones sencilla y múltiples. De acuerdo al comportamiento de  $G'$  y  $G''$ , las bebidas pueden clasificarse en dos grupos, uno (a) formado por BGL, BEMP y BEMC: con valores de  $G'$  y  $G''$  elevados, que no se igualaron o traslaparon (traslape de sus curvas) en el rango de frecuencia estudiado y el otro, (b) formado por BEMT y BES, con valores de  $G'$  y  $G''$  menores, que tendieron a igualarse (con traslape de sus curvas) a valores bajos y altos de frecuencia. Los resultados antes expuestos indican que BGL, BEMP y BEMC, con valores  $G' > G''$ , exhibieron comportamiento sólido predominante en todo el rango de frecuencia estudiado; mientras que BEMT y BES mostraron comportamiento fluido predominante a frecuencias en las que  $G'' > G'$ . La relación  $G''/G'$  o  $\tan \delta$  (Fig. 18) muestra claramente la diferencia en las variaciones de los valores de  $G'$  y  $G''$  entre los dos grupos de bebidas antes señalados. Los valores de  $\tan \delta$ , en las bebidas BEMT y BES alcanzaron valores cercanos y/o mayores a la unidad a bajas y altas frecuencias; en contraste, los valores de  $\tan \delta$  de las bebidas BGL, BEMP y BEMC, fueron menores de la unidad en todo el rango de frecuencia estudiado.

Las propiedades viscoelásticas de las bebidas fueron afectadas por el tipo de glóbulos grasos contenidos en las mismas, así como por los agentes emulsificantes/estabilizantes usados en su emulsificación. La contribución de los glóbulos grasos a las propiedades reológicas de geles de emulsiones aceite-en-agua depende de la concentración, las propiedades mecánicas e interacciones de los glóbulos grasos con la red o matriz proteínica (Chen *et al.*, 2000).

En la figura 18, puede observarse que la BGL mostró los valores más elevados de  $G'$  y  $G''$  en comparación con el resto de las bebidas, siendo los valores de  $G'$  mucho más grandes que los valores de  $G''$  en el rango de frecuencia estudiado (Fig. 19), indicando ello una respuesta de la estructura predominantemente de tipo sólido. Ambos módulos ( $G'$  y  $G''$ ) fueron relativamente independientes de la frecuencia (tasa de deformación), comportamiento acorde al informado para una red elástica (Morris, 1993). Estos resultados indican que la BGL a las 24 h de elaborada, exhibió la estructura de gel más elástica que las correspondientes al resto de las bebidas. La microestructura de la BGL (Fig. 20), consistió de una red proteínica compuesta por cadenas y agregados fusionados de micelas de caseína, cuya forma globular es todavía apreciada, en cuyo interior se encontraron embebidos lactobacilos y estreptococos. Glóbulos de grasa láctea (Fig. 21) cubiertos por proteínas de lactosuero y caseínas, como resultado de la homogenización y el calentamiento de la leche (Kalab, *et al* 1985), pudieron interaccionar con las micelas de caseína de la red proteínica (Sandoval-Castilla *et al.*, 2004), reforzando la estructura de esta última (Everett y Olson, 2000).

Las otras dos bebidas que mostraron valores elevados de  $G'$  y  $G''$  fueron la BEMC y la BEMP (Fig. 18), aun cuando los glóbulos de grasa láctea fueron sustituidos por glóbulos de agua-en-aceite-en-agua. Las bebidas BEMC y BEMP, al igual que la BGL, mostraron el comportamiento típico de un gel; es decir  $G'$  dominó a  $G''$  en todo el rango de frecuencia estudiado (Fig. 19) (Steventon *et al.*, 1990). Lo anterior, indica cierto reforzamiento de la red proteínica de BEMC y BEMP, por la incorporación de los glóbulos grasos de las emulsiones múltiples agua-en-aceite-en-agua y este reforzamiento debió darse mediante la interacción de las moléculas que cubrieron la superficie de los glóbulos de las emulsiones y las cadenas de caseína de la red proteínica

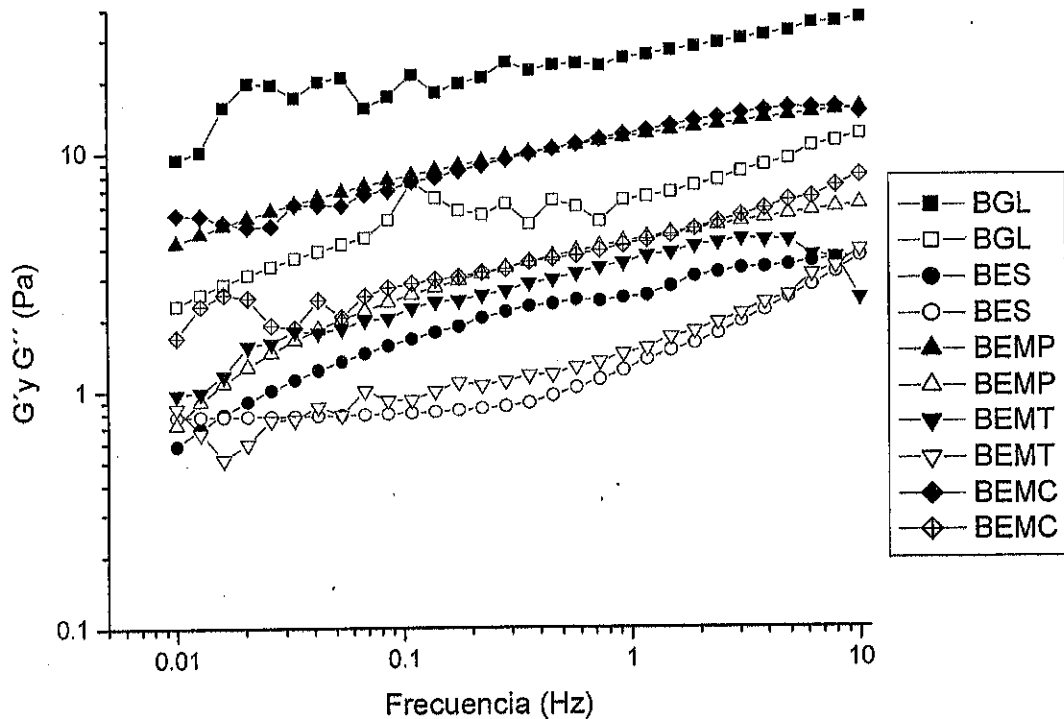


Figura 18. Comportamiento de los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y de pérdida ( $G''$ ) de los tratamientos a las 24 h de elaboradas.  $G'$ : -■-;  $G''$ : -□-.

En la BEMC, la carboximetilcelulosa pudo interaccionar con las lactoproteínas adsorbidas en la superficie externa de los glóbulos de la EM, debido a su carácter iónico (Coffey et al. (1995). La interacción entre polisacáridos dispersos en la fase continua con las proteínas adsorbidas en la superficie de los glóbulos grasos y con las cadenas de caseína de la red proteínica, probablemente coadyuvó al reforzamiento del gel. La microestructura de la BEMC (Fig. 22) estuvo conformada por cadenas de micelas de caseína, con pequeños espacios intercadenales, de apariencia un poco menos compacta que la observada en la BGL (Fig. 19). Los valores menores de  $G'$  y  $G''$  de la BEMC respecto a los de la BGL (Fig. 18) pueden atribuirse al estado líquido del aceite de canola en comparación con el estado semi-sólido de la grasa láctea (Lobato-Calleros, *et al.*, 2003). Fue posible apreciar la presencia de lactobacilos y estreptococos (Fig. 22) atrapados en la red proteínica de la BEMC y en aquellas del resto de las bebidas lácteas.

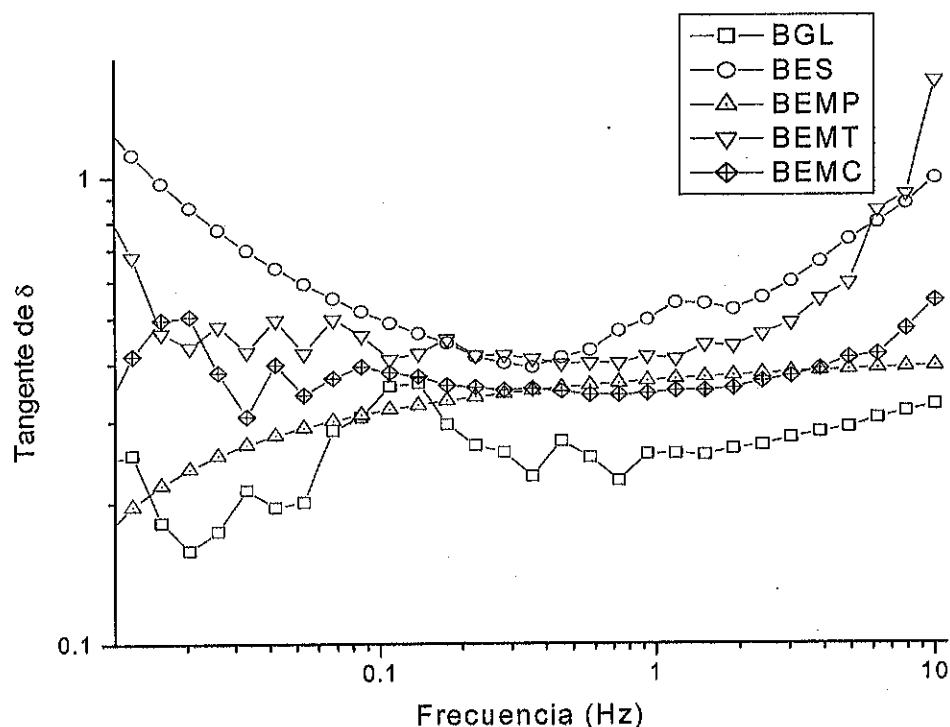


Figura 19. Comportamiento de  $G''/G'$ , de las bebidas a las 24 h de elaboradas

La pectina de bajo metoxilo contribuyó a la formación de una estructura de gel en la BEMP (Fig. 23), constituida por agregados de cadenas de micelas de caseína, similares a los observados en la BGL (Fig. 20), aunque de menor tamaño. En la agregación de las micelas de caseína en la BEMP, posiblemente intervinieron los glóbulos grasos, a través de lactoproteínas y de moléculas de pectina adsorbidas en la interfase externa aceite-en-agua ( $O/W_2$ ). Las moléculas de pectina adsorbidas sobre la superficie de un glóbulo, pueden interaccionar, en la presencia de  $Ca^{+2}$ , con moléculas de pectina adsorbidas en la superficie de otro glóbulo graso (Leroux, *et al.*, 2003), actuando así los glóbulos grasos como agentes “cementantes” o estructurantes de la red proteínica. Asimismo la pectina tiene la habilidad de formar partículas gelificadas de pectato de calcio (Tromp, *et al.*, 2004), las cuales confirieron un comportamiento elástico adicional a la red proteínica de la BEMP. En la figura 24, pueden observarse los microorganismos lácticos involucrados en la elaboración de las bebidas, uno de ellos es el *Lactobacillus bifidus*, al que se le atribuyen propiedades funcionales para el mejoramiento y conservación de la salud humana (Baron, M., *et al* 2000).

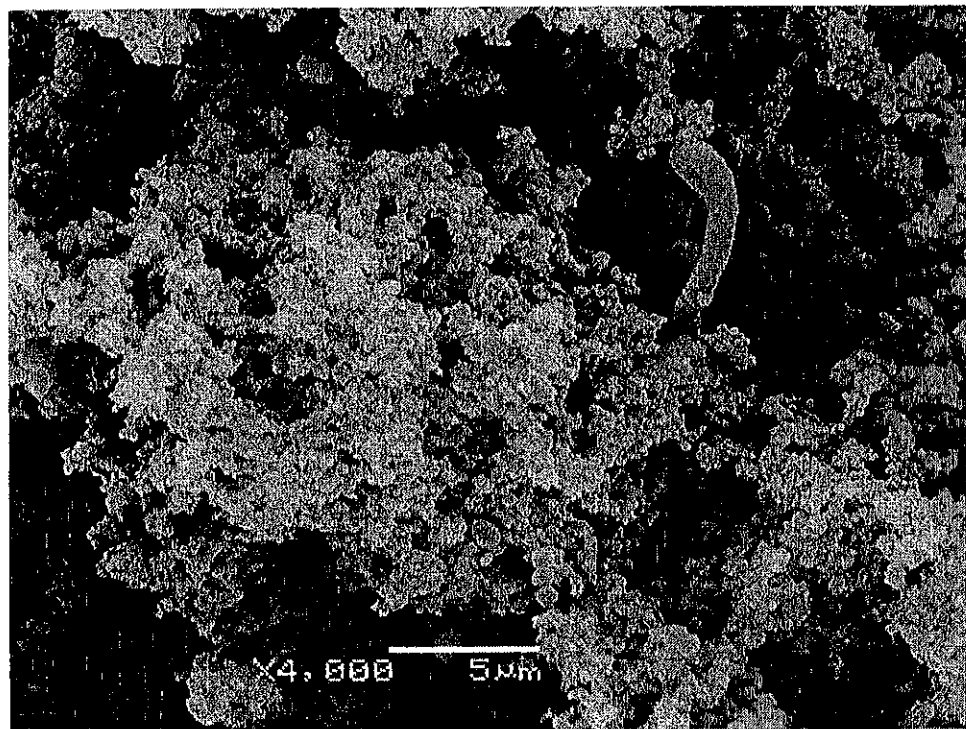


Figura 20. Micrografía Electrónica de Barrido de la bebida control (BGL). Magnificación 4.000X. Barra de escala = 5 µm

Las bebidas BEMT y BES, conteniendo gotas de emulsión múltiple y gotas de emulsión sencilla, respectivamente, mostraron los valores más bajos de  $G'$  y  $G''$ , que el resto de las bebidas lácteas (Fig. 18). Los valores de  $G''$  tendieron a traslaparse con los de  $G'$  a frecuencias bajas y altas; pudiendo observarse inclusive que en ciertas regiones, los valores de  $G''$  sobrepasaron a los de  $G'$  (Figs. 18 y 19). Lo anterior, indica que a ciertas frecuencias, las bebidas después de 24 h de preparadas, tuvieron predominantemente comportamiento fluido o viscoso. Raymundo *et al.* (1999), encontraron que emulsiones estabilizadas con EBPM exhiben una región pseudo-terminal a bajas frecuencias, que muestra una tendencia de ambas funciones viscoelásticas ( $G'$  y  $G''$ ) a traslaparse (inicio de la región viscosa); en contraste, emulsiones estabilizadas con biopolímeros muestran una región meseta o plana, al igual que las presentadas por BGL, BEMC y BEMP (Fig. 18). La aparición de una región plana en el espectro mecánico ha sido previamente relacionada a la formación de estructuras entretejidas entre moléculas poliméricas (Ferry, 1980) que forman una red tridimensional de moléculas que interactúan o se entretajan y que atrapan en su

interior las gotas de emulsiones aceite-en-agua (Dickinson, 1992). La preparación de las emulsiones contenidas en BEMT y BES, involucró el uso de emulsificantes de bajo peso molecular (EBPM), los cuales tendieron a desplazar proteína de la interfase (Dickinson y Tanai, 1992), limitando así la interacción glóbulos de emulsión-red proteínica y el reforzamiento de la estructura del gel. Glóbulos grasos cubiertos por monocapas de EBPM hidrosolubles, funcionan sólo como ocupadores de espacios, pero no toman parte mecánicamente en la construcción de la red proteínica de emulsiones gelificadas (Chen *et al.*, 2000).

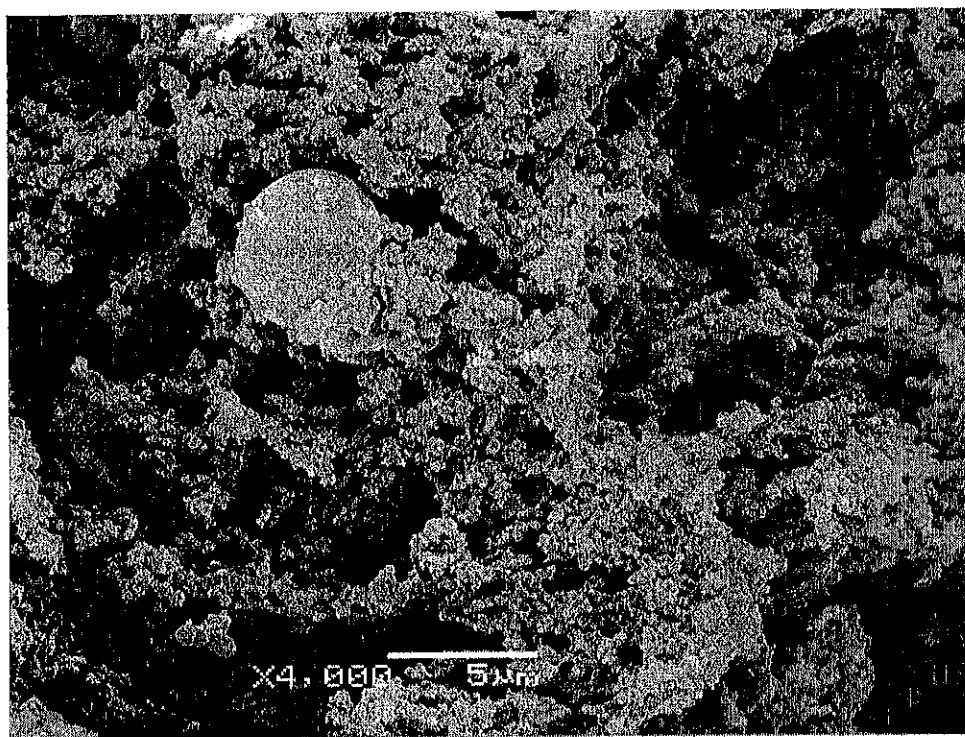


Figura 21. Micrografía Electrónica de Barrido de la bebida control (BGL). Magnificación 4.000X. Barra de escala = 5  $\mu$ m

Se observó una ligera diferencia en los valores de  $G'$  y  $G''$  de la BEMT y de la BES, a las 24 h de elaboradas, siendo en general mayores los correspondientes a la BEMT (Fig. 18). Estos resultados pueden explicarse con base en la habilidad de Tween 20 para formar un complejo con moléculas de  $\beta$ -lactoglobulina. Cuando Tween 20 es adicionado a geles de emulsiones estabilizadas con  $\beta$ -lactoglobulina, el comportamiento elástico de estos geles es

complejo y depende de la relación molar proteína: emulsificante (R); cuando  $R=1$ , el módulo elástico del gel se incrementa, luego decrece a valores mayores de 1 y vuelve a aumentar cuando  $R \geq 4$ . Para este último caso, se ha propuesto la formación de micelas mixtas de proteína y de Tween que refuerzan el gel (Dickinson y Hong, 1996). En la BEMT, aproximadamente hubo 2.0 g de  $\beta$ -lactoglobulina (Alais, 1986) y 0.6 g de Tween 20 en 1 L.

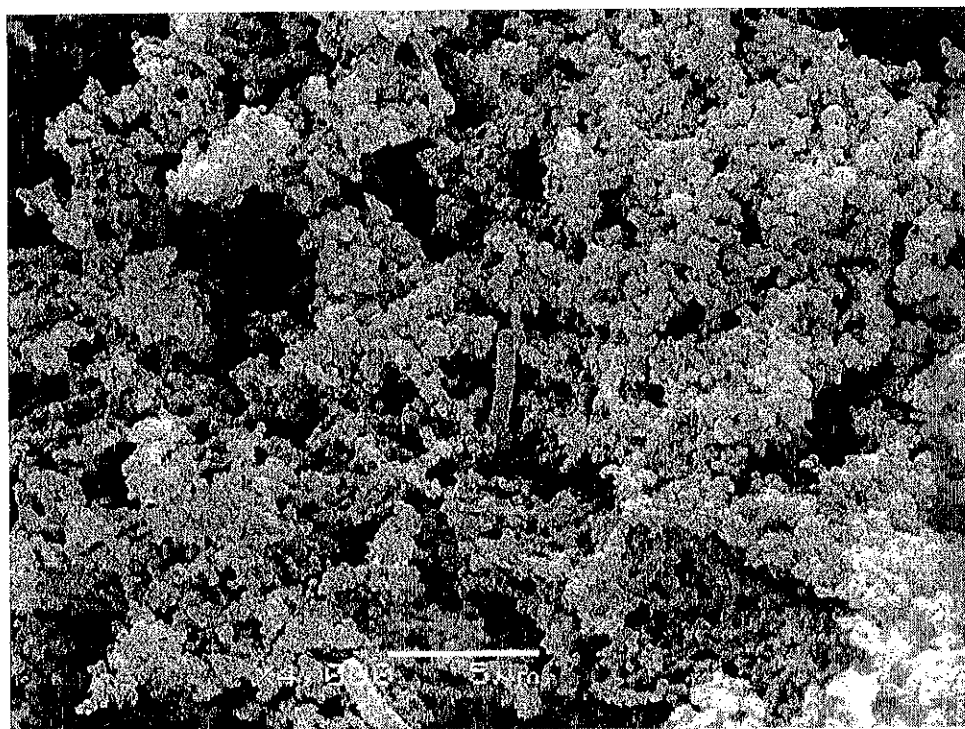


Figura 22. Micrografía Electrónica de Barrido de BEMC. Magnificación 4,000X.  
Barra de escala = 5  $\mu$ m

La microestructura de la BEMT (Fig. 25) consistió de una red de proteína, formada por cadenas de micelas de caseína con bajo grado de fusión y cuya compactación fue limitada por la existencia de numerosos espacios vacíos (originalmente ocupados por los glóbulos grasos de la EM). La baja compactación de la estructura en BEMT, pudo ser debida a la poca interacción entre la capa de EBPM que cubrió los glóbulos grasos y las micelas de caseína que conformaron la red proteínica. La estructura de la BES (Fig. 26) consistió de regiones de apariencia densa, en la que predominaron agregados de micelas de caseína, pero también de regiones en las que se observan espacios vacíos relativamente grandes, estos últimos atribuidos a canales de lactosuero y algunos glóbulos grasos retenidos originalmente en la red proteínica.

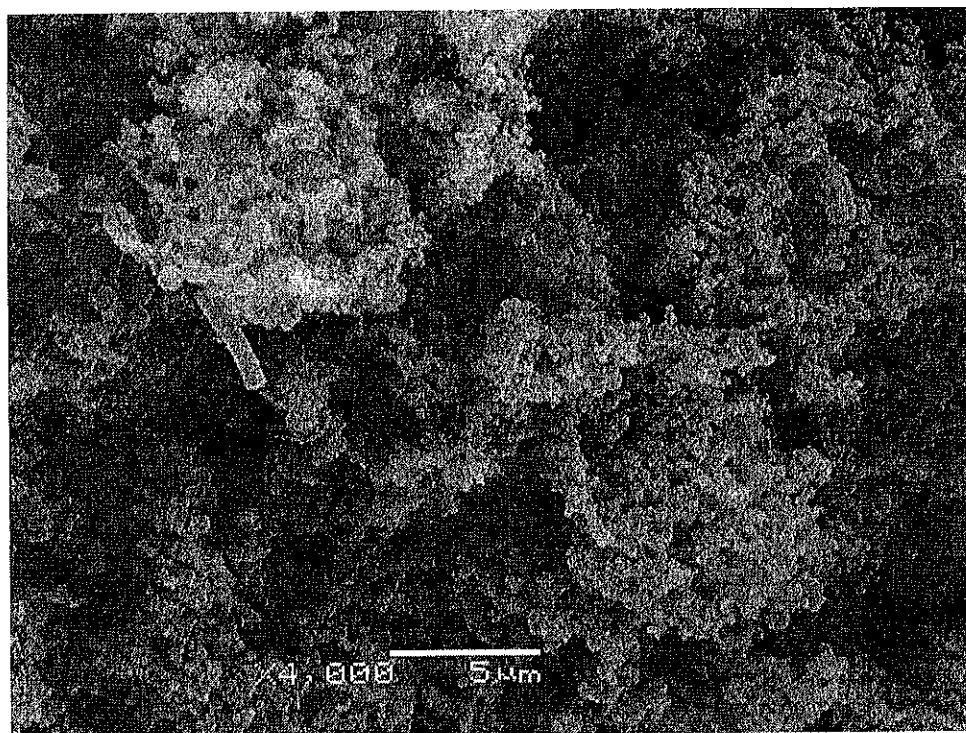


Figura 23. Micrografía Electrónica de Barrido de BEMP Magnificación 4.000X. Barra de escala = 5  $\mu$ m

Durante el tiempo de almacenamiento, hubo variaciones en los valores de  $G'$  y  $G''$  de las bebidas; sin embargo, dichas variaciones conservaron las tendencias generales en el comportamiento viscoelástico de las bebidas; esto es, BGL, BEMC y BEMP siguieron mostrando los valores más elevados de estos módulos, en comparación con las bebidas BEMT y BES (Figs. 27 y 28).

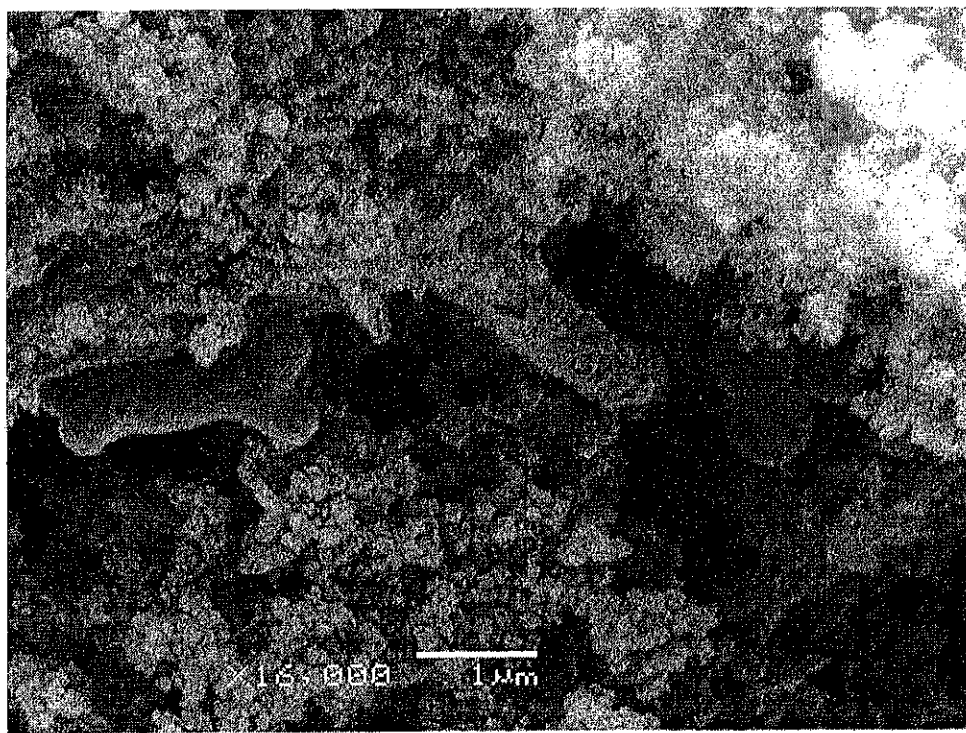


Figura 24. Micrografía Electrónica de Barrido de BEMP Magnificación 16.000X . Barra de escala = 1  $\mu$ m

Los módulos  $G'$  y  $G''$  de BGL tendieron a disminuir durante el almacenamiento (Figs. 27 y 28); al mismo tiempo los valores de  $\tan \delta$  aumentaron a bajas frecuencias (Figs. 29 y 30), siendo este último efecto más acentuado a los 14 días de almacenamiento. Estos resultados indican una desestabilización o pérdida de estructura de la estructura de gel de la BGL con el tiempo de almacenamiento. Afonso y Maia (1999), al monitorear cambios estructurales de yogurt durante su almacenamiento, mediante el estudio de sus propiedades reológicas, informan que hubo disminución en los valores de los módulos  $G'$  y  $G''$  del yogurt con el tiempo y atribuyen estas variaciones a una degradación severa de la estructura del yogurt debida a fenómenos enzimáticos, tales como post-acidificación y proteólisis. Disminuciones en el pH de las bebidas fueron observadas durante su almacenamiento, variando de aproximadamente un valor de 5.0 a las 24 h de preparadas a un valor de 4.7 después de 14 días de almacenamiento, lo que indica que ocurrió una reducida, pero no completamente inhibida, post-acidificación de las bebidas, a través de la actividad enzimática de los cultivos lácticos. Reducciones en el pH inducen interrupción en las

interacciones proteína-proteína, acompañada de sinéresis y desmineralización, todo ello contribuye a degradación de la estructura proteínica. La expulsión de suero durante el almacenamiento, puede explicar la disminución en los valores de  $G'$  de la BGL a muy bajas frecuencias; esto es, a tiempos de prueba prolongados. Adicionalmente, la proteólisis pudo contribuir a la degradación de la estructura de gel de la BGL (Afonso y Maia, 1999).

Las bebidas BEMP y BEMC, mostraron un comportamiento reológico durante su almacenamiento, distinto al de BGL. Los valores de  $G'$  y  $G''$  de estas bebidas aumentaron del primero al séptimo día (Figs. 18 y 27), mientras que los valores de  $\tan \delta$  disminuyeron ligeramente (Figs. 19 y 29). Del séptimo al 14° día las bebidas BEMC y BEMP exhibieron un comportamiento diferente, los valores de  $G'$  y  $G''$  de la BEMC continuaron incrementándose, mientras que los de BEMP disminuyeron (Figs. 27 y 28), al mismo tiempo los valores de  $\tan \delta$  disminuyeron en BEMC y aumentaron ligeramente en la BEMP, sin alcanzar la unidad (Figs. 29 y 30). La disminución en los valores de  $G'$  y  $G''$  de BEMP pudieron estar relacionados con el aumento en el tamaño de sus glóbulos grasos (Tabla 2), discutido antes. Incrementos en el tamaño de los glóbulos grasos han sido relacionados con la formación de redes proteínicas con menor resistencia a la deformación (Lobato-Calleros *et al.*, 2003).

Los resultados antes expuestos, indican un efecto positivo de pectina y CMC sobre la estabilidad de la estructura de gel de las bebidas en el tiempo, el cual fue más acentuado en el caso de CMC. La funcionalidad de CMC y pectina probablemente evitó la formación de agregados floculados de micelas de caseína, principal causa de inestabilidad en bebidas lácteas ácidas (Parker *et al.*, 1993) y la consecuente expulsión de lactosuero y pérdida de iones calcio. CMC interacciona con la caseína en un rango de pH de 3.0 a 5.5, formando un complejo estable altamente viscoso, que estabiliza productos conteniendo leche a condiciones ácidas que normalmente precipitarían a la caseína (Asano, 1970). La viscosidad del complejo caseína-CMC aumenta conforme el pH disminuye de 6 a 4.5 (Hercules Inc., 2002), razón por la que al disminuir el pH de la BEMC durante el almacenamiento, sus valores de  $G'$  y  $G''$  incrementaron (Figs. 18, 27 y 28).

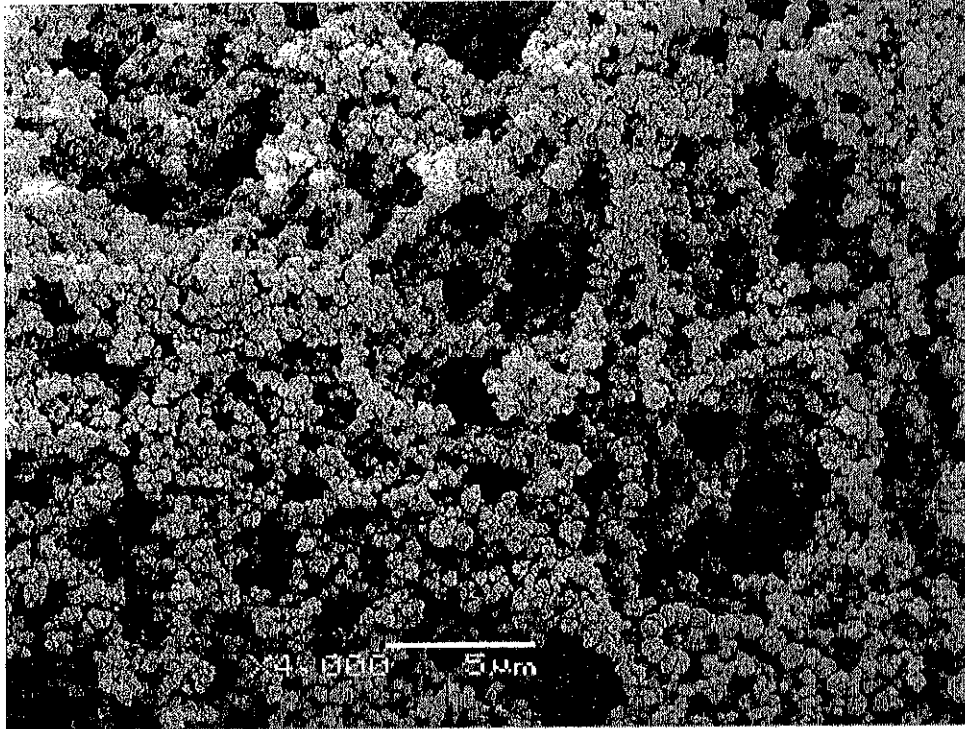


Figura 25. Micrografía Electrónica de barrido de BEMT, Magnificación 4.000X. Barra de escala 5μm

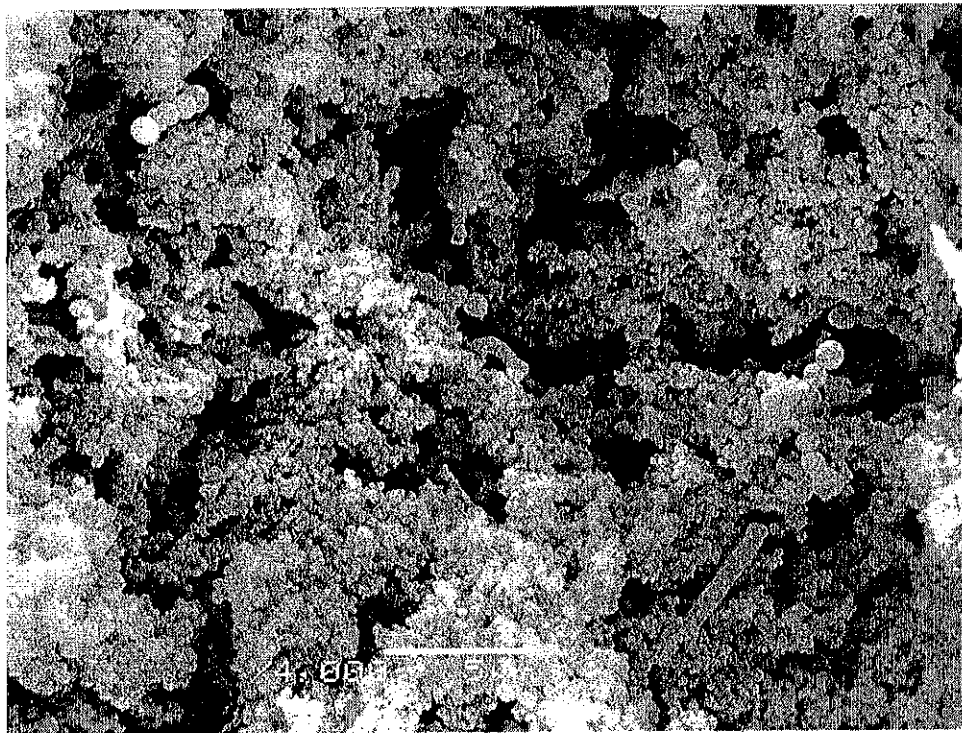


Figura 26. Micrografía Electrónica de barrido de BES, Magnificación 4.000X. Barra de escala 5μm

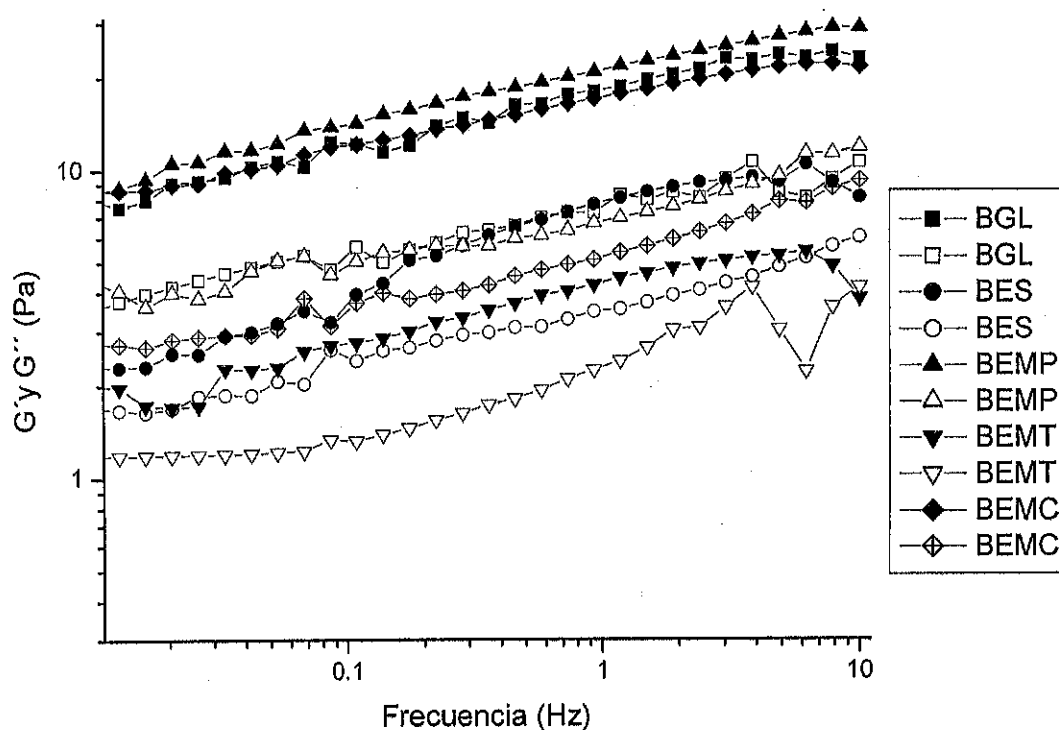


Figura 27. Comportamiento de los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y de pérdida ( $G''$ ) de las bebidas lácteas a los 7d de elaboradas.  $G'$ : - ■ -;  $G''$ : - □ -.

La pectina puede adsorberse, al igual que CMC, a los flóculos de caseína mediante interacciones electrostáticas, vía sus grupos carboxilato negativos, los cuales interaccionan con los grupos positivos en la superficie de los flóculos. La pectina adsorbida forma una barrera contra la interacción entre partículas de caseína y las protege de floculación, principalmente por repulsión estérica (Parker *et al.*, 1993). Tanto CMC (Hegedusic *et al.*, 2000), como la pectina (Rolin, 1993) interaccionan con iones  $\text{Ca}^{+2}$ , por lo que quizás también uno de sus efectos en la estructura del gel de las bebidas, consistió en la retención de iones calcio y en la disminución de sinéresis o expulsión del suero, esto último como resultado de su elevada capacidad ligante de agua. Los bajos valores de  $\tan \delta$  de BEMC y BEMP (Figs. 20, 29 y 30) a frecuencias bajas, refuerzan la idea de menor grado de sinéresis en estas bebidas.

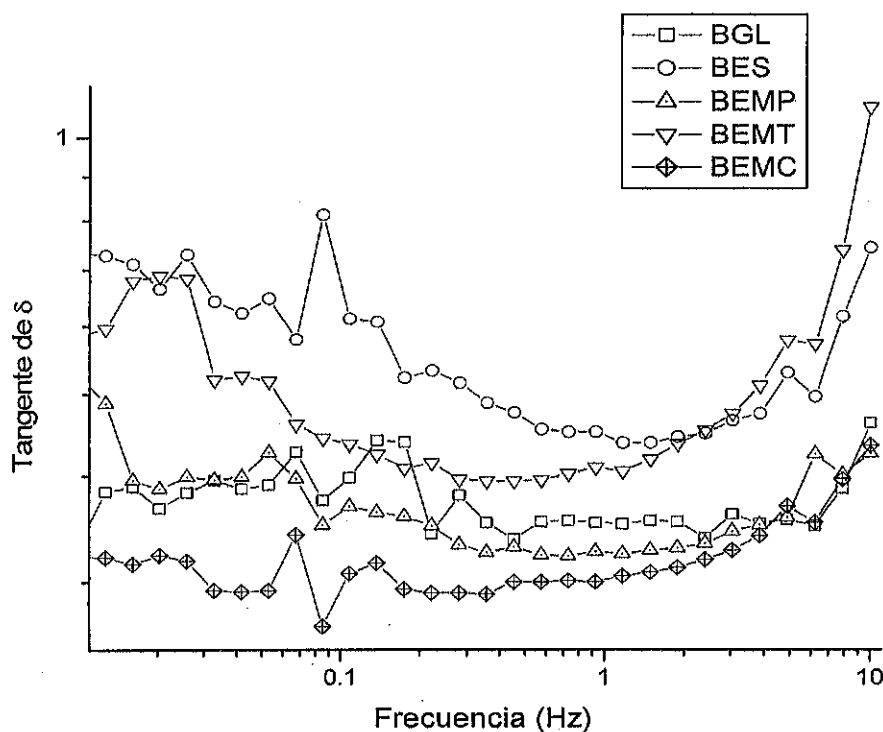


Figura 28. Valores de Tangente de  $\delta$  en las bebidas lácteas a 7 días de elaboración

Los valores de  $G'$  y  $G''$  de BEMT permanecieron casi estables del primero al séptimo día, disminuyendo drásticamente al 14° día (Figs. 18, 27 y 28). Estos resultados indican que la estructura de BEMT sufrió degradación severa con el tiempo de almacenamiento, de manera similar a aquella de BGL. El emulsificante Tween 20 aparentemente no contribuyó en la estabilización del gel de la BEMT, debido a que su funcionalidad radica básicamente en su poder emulsificante y hasta cierto punto protector de los glóbulos grasos. La gran variabilidad en los valores de  $\tan \delta$  a frecuencias bajas (Figs. 19, 29 y 30) puede estar relacionada con sinéresis de las muestra de bebida durante el tiempo de prueba; esta variabilidad fue más evidente a los 14 días de almacenamiento (Fig. 30).

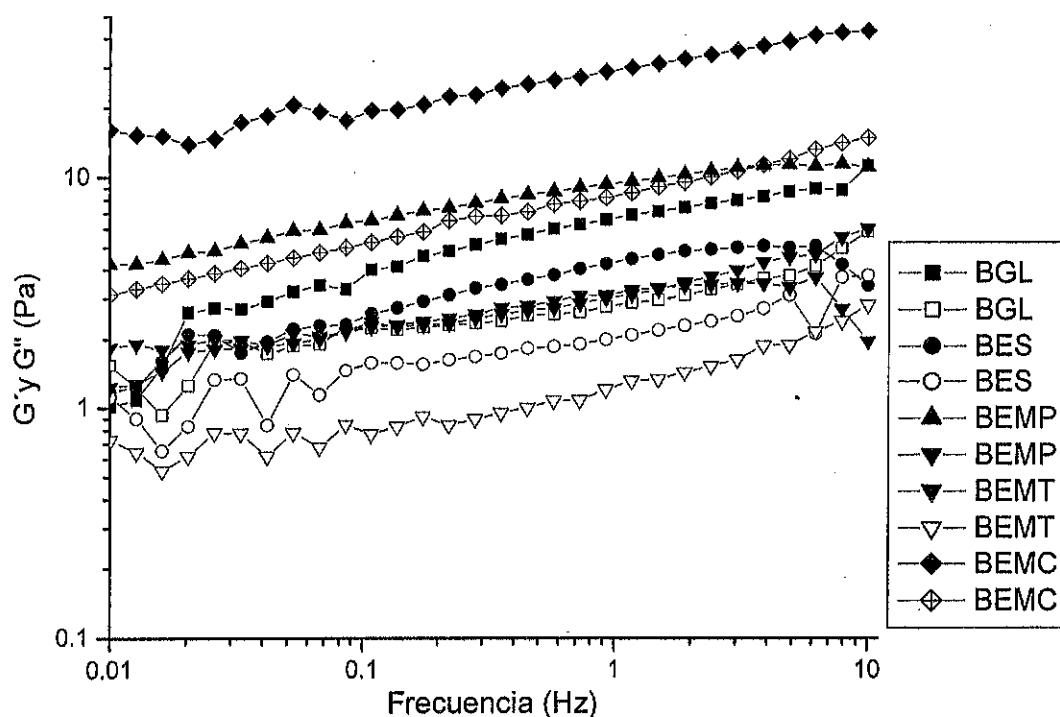


Figura 29. Comportamiento de los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y de pérdida ( $G''$ ) de las bebidas lácteas los 14 días de elaboradas.  $G'$ : - ■ -;  $G''$ : - □ -.

Los valores de  $G'$  y  $G''$  de BES aumentaron del primero al séptimo día, pero disminuyeron del 7° al 14° día (Figs. 18, 27 y 28), comportamiento relacionado con reducciones en los valores de  $\tan \delta$  del primero al séptimo día y aumentos en los mismos en el 14° día (Figs. 19, 29 y 30). El incremento en el carácter elástico de la red de BES, del primero al 7° día de almacenamiento, pudo deberse a un re-arreglo de las proteínas lácteas que no fueron desplazadas de la superficie de los glóbulos grasos por los EBPM, en una configuración más compacta y más elástica. Lobato-Calleros *et al.* (2003), informaron que aunque el emulsificante P desplazó proteína de la superficie de glóbulos de una emulsión de aceite de canola-en-leche descremada, algunas moléculas de proteína permanecieron adsorbidas en la interfase y se re-arreglaron en una capa más compacta, la cual confirió propiedades elásticas a redes de proteína de queso tipo Manchego.

Conforme el tiempo de almacenamiento transcurrió, los procesos de post-acidificación y proteólisis influyeron en la degradación de la estructura proteínica de la BES, rindiendo valores más bajos de  $G'$  y  $G''$  y más altos de  $\tan \delta$ .

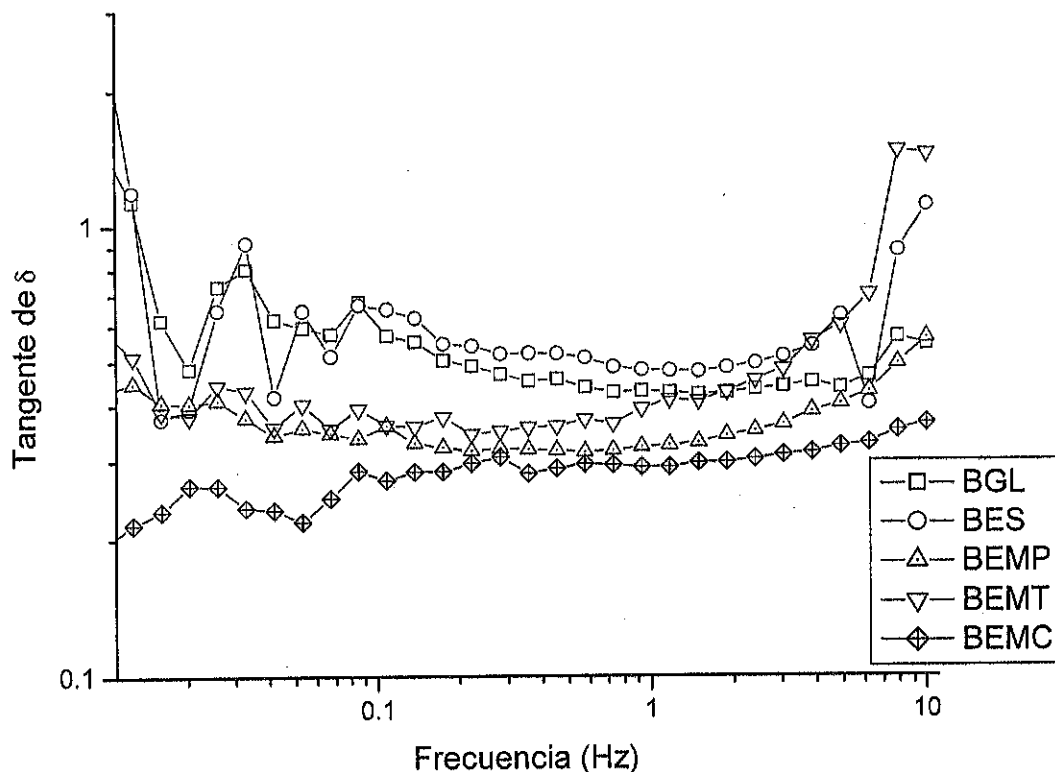


Figura 30. Valores de Tangente de  $\delta$  en las bebidas lácteas a 14 días de elaboración

### Caracterización de curvas de flujo

Las figuras 31 a 33 muestran las curvas esfuerzo cortante-velocidad de cizalla exhibidas por las bebidas durante su almacenamiento, observándose en ellas valores de esfuerzo de fluencia; esto es, valores mínimos de esfuerzo cortante que debieron ser rebasados antes de que sus estructuras sólidas comenzaran a mostrar un comportamiento líquido. Este tipo de flujo es a menudo encontrado en alimentos y es conocido como plástico. Aunque en la actualidad existe mucha controversia acerca de la existencia de un verdadero esfuerzo de fluencia, sin embargo, fines prácticos este parámetro es ampliamente usado. (Barnes, 1999). Más allá del esfuerzo de fluencia, las curvas esfuerzo cortante-velocidad de cizalla,

tendieron a ser cóncavas, indicando esto que las bebidas tuvieron un comportamiento de tipo pseudoplástico con esfuerzo de fluencia (Bourne, 2002; Rao, 1999). También es posible observar cierta linealidad entre esfuerzo cortante-velocidad de cizalla, a bajos valores de esta última. Muchos fluidos pseudoplásticos exhiben este régimen Newtoniano (Bourne, 2002).

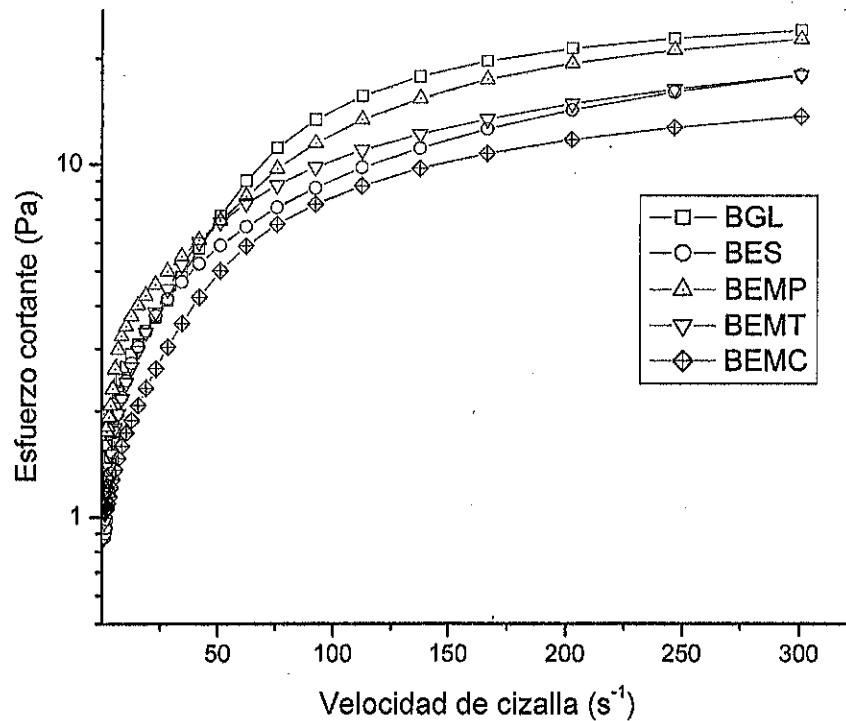


Figura 31. Comportamiento del esfuerzo cortante ( $\sigma$ ) en función de la velocidad de cizalla ( $\dot{\gamma}$ ), de las bebidas a las 24 horas de elaboradas

Los datos de esfuerzo cortante-velocidad de cizalla de las bebidas, se sometieron a varios modelos reológicos (Newtoniano, Casson y Herschel Bulkley), encontrándose que las curvas de flujo tuvieron un ajuste adecuado ( $R^2 \geq 0.98$ ) al modelo de Herschel-Bulkley, en el rango de velocidad de cizalla estudiado ( $1$  a  $300 s^{-1}$ ). El modelo de Herschel-Bulkley es útil para describir el comportamiento de fluidos pseudoplásticos con esfuerzo de fluencia y es representado como (Steffe, 1996):

$$\sigma = K(\dot{\gamma})^n + \sigma_0$$

Donde:  $\sigma$  es el esfuerzo cortante (Pa);  $\dot{\gamma}$  es la velocidad de cizalla ( $s^{-1}$ );  $K$  es el coeficiente de consistencia ( $Pa\ s^n$ );  $n$  es el índice de comportamiento de flujo (adimensional) y  $\sigma_0$  es el esfuerzo de fluencia (Pa).

Tabla 3 Valores de variables obtenidas del Modelo de Herschel - Bulkley

| Código | Día 1                 |                       |                       | Día 7                 |                       |                   | Día 14            |                    |                   |
|--------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
|        | k                     | n                     | $\sigma_0$            | k                     | n                     | $\sigma_0$        | k                 | n                  | $\sigma_0$        |
| BGL    | 0.264<br>(0.00) a     | 0.815<br>(0.00)<br>ab | 0.680<br>(0.00)<br>ab | 0.353<br>(0.02) a     | 0.739<br>(0.01)<br>ab | 1.025<br>(0.16) b | 0.425<br>(0.29) a | 0.624<br>(0.09) a  | 0.476<br>(0.16) a |
| BES    | 0.326<br>(0.03) a     | 0.653<br>(0.06) a     | 0.683<br>(0.01) b     | 0.347<br>(0.09) a     | 0.549<br>(0.05) a     | 0.365<br>(0.09) a | 0.255<br>(0.04) a | 0.5329<br>(0.03) a | 0.216<br>(0.08) a |
| BEMC   | 0.511<br>(0.05) a     | 0.761<br>(0.04) a     | 1.279<br>(0.18) a     | 0.034<br>(0.01) b     | 1.008<br>(0.04) a     | 1.320<br>(0.21) a | 0.013<br>(0.01) b | 1.178<br>(0.22) a  | 1.239<br>(0.15) a |
| BEMT   | 0.660<br>(0.00) b     | 0.489<br>(0.03) a     | 0.556<br>(0.13) a     | 0.894<br>(0.08)<br>ab | 0.146<br>(0.08) b     | 1.385<br>(0.44) b | 0.902<br>(0.03) a | 0.130<br>(0.16) b  | 0.326<br>(0.13) a |
| BEMP   | 0.260<br>(0.08)<br>ab | 0.790<br>(0.05) b     | 1.133<br>(0.13)<br>ab | 0.215<br>(0.03) a     | 0.736<br>(0.05) b     | 1.370<br>(0.25) b | 0.364<br>(0.03) b | 0.583<br>(0.02) a  | 0.608<br>(0.15) a |

$K$ , es el coeficiente de consistencia,  $n$  el índice de comportamiento de flujo y  $\sigma_0$  es el esfuerzo de fluencia. Medias en una misma columna con letras distintas, son diferente significativamente ( $\alpha \leq 0.05$ ). Valores en paréntesis corresponden a desviación estándar.

En la tabla 3 se presentan los valores de los parámetros reológicos de las bebidas, al 1, 7 y 14 d, aplicando el modelo de Herschel – Bulkley. Los valores de índice de flujo diferentes a la unidad, indicaron que las bebidas exhibieron comportamiento no-newtoniano, en general de tipo pseudoplástico ( $n < 1$ ). Las bebidas lácteas al presentar pseudoplasticidad, exhibieron valores de viscosidad aparente dependientes de la velocidad de cizalla (Figs. 34 a 36), los cuales disminuyeron con incrementos en la velocidad de cizalla aplicada, indicando un comportamiento adelgazante con el esfuerzo o “shear thinning”. Resultados similares han sido informados para bebidas lácteas en las que se incorporaron diferentes niveles de carragenina y de sólidos totales (Penna *et al.*, 2003) y para bebidas lácteas de diferentes marcas comerciales (Penna *et al.*, 2001; Lucey, 2001). Disminuciones en viscosidad de las bebidas pueden estar asociados con la disgregación de los aglomerados de proteína dispersos (van Marle *et al.*, 1999)

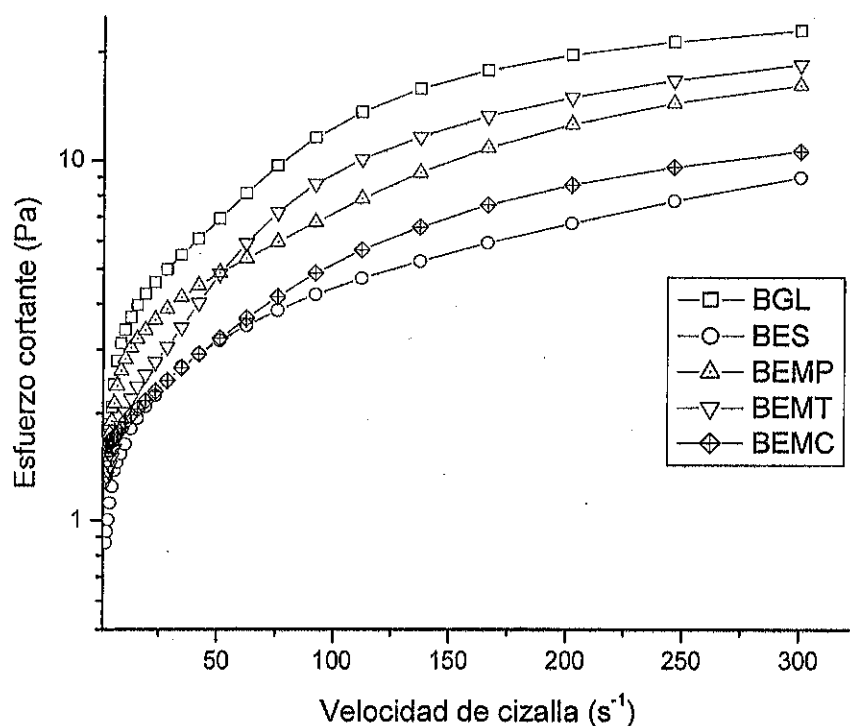


Figura 32. Comportamiento del esfuerzo cortante ( $\sigma$ ) en función de la velocidad de cizalla ( $\gamma$ ), de las bebidas a los 7 días de elaboradas

Modificaciones en el tipo y agentes emulsificantes/estabilizantes de las emulsiones, provocaron variaciones en los valores de los parámetros reológicos de las bebidas, durante su almacenamiento. La bebida BGL mostró aumentos en el valor de  $\sigma_0$  del primero al séptimo día, disminuyendo el valor de este parámetro al 14° día; mientras que sus valores de  $k$  aumentaron durante todo el período de almacenamiento y los de  $n$  disminuyeron durante todo el período de almacenamiento (Tabla 3). Las variaciones en los valores de los parámetros reológicos de BGL con el tiempo, posiblemente estén relacionados con una mayor coagulación de la caseína durante los primeros siete días de almacenamiento, al aproximarse el pH al punto isoelectrico, atrapando glóbulos de grasa y suero y adquiriendo mayor firmeza; sin embargo, al transcurrir el tiempo, el proceso de sinéresis que sufre el gel, contribuye a su desmineralización y al debilitamiento de su estructura (Alfonso y Maia, 1999), que puede estar acompañado de la formación de aglomerados de caseína con menor elasticidad, pero que imparten cierta consistencia a la bebida.

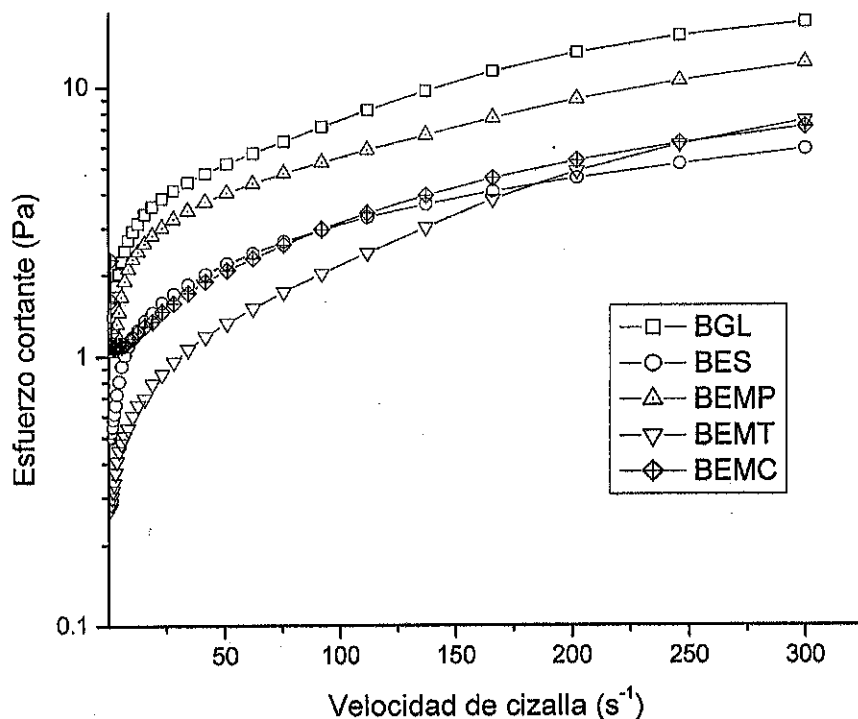


Figura 33. Comportamiento del esfuerzo cortante ( $\sigma$ ) en función de la velocidad de cizalla ( $\gamma$ ), de las bebidas a los 14 días de elaboradas

Los valores de los parámetros reológicos de BES, tendieron a disminuir con el tiempo, mostrando un debilitamiento progresivo de su estructura, acompañado de mayor carácter pseudoplástico (Tabla 3). Este comportamiento pudo deberse a la limitada interacción entre los glóbulos grasos contenidos en la BES con las cadenas de caseína y en consecuencia con la estructura de la red proteínica. En la BEMT se observó un incremento en sus valores de  $\sigma_0$  del primero al séptimo día, pero disminución muy pronunciada al catorceavo día, mientras que los valores de  $n$  disminuyen notablemente del primero al séptimo día, y permanece casi constante al día catorce; El coeficiente de consistencia ( $k$ ), aumenta durante todo el período de almacenamiento. Cabe resaltar que en el 14° d esta bebida mostró el mayor carácter pseudoplástico (Tabla 3). Los valores y la variación con el tiempo de los parámetros reológicos de BEMT permiten inferir que esta bebida fue la que tuvo la estructura más débil y menos resistente a la deformación, tendiendo a fluir fácilmente bajo la aplicación de esfuerzos cortantes. La explicación sobre la pobre interacción e

inestabilidad de los glóbulos grasos contenidos en la BEMT ya fue expresada con anterioridad.

Los valores de  $\sigma_0$  de BEMC permanecieron prácticamente constantes con el tiempo de almacenamiento y sus valores de  $n$ , tendieron a aumentar en lugar de disminuir como en el resto de las bebidas, hasta alcanzar valores cercanos a la unidad; en contraste, su valor de  $k$  disminuyó considerablemente del primero al séptimo día y ligeramente de este último al 14<sup>o</sup> d (Tabla 3). El valor elevado de  $\sigma_0$  indica que la estructura de BEMC requirió de la aplicación de un esfuerzo importante para comenzar a fluir; no obstante, una vez superado este esfuerzo, la BEMC fluyó más que las otras bebidas (valores más bajos de  $k$ ) (Tabla 3). Al primer día de elaborada, la BEMC mostró comportamiento pseudoplástico ( $n < 1$ ), pero al transcurrir el tiempo de almacenamiento su pseudoplasticidad disminuyó, exhibiendo valores de  $n$  ligeramente mayores de la unidad. Estos resultados indican que hubo cambios en la estructura de la BEMC con el almacenamiento, probablemente consistentes en una mayor interacción caseína-CMC debida a aumentos en la acidez del medio de dispersión. Esta explicación es reforzada por los aumentos en  $G'$  y  $G''$  de BEMC observados durante su almacenamiento (Figs. 26 y 27). Dispersiones de CMC en forma individual o combinada con otros polisacáridos han mostrado comportamiento reológico pseudoplástico (Gómez-Díaz y Navaza, 2004; Togrul y Arslan, 2003); aunque también se ha informado que dispersiones de CMC con proteínas de lactosuero muestran comportamiento dilatante (Hegedusic *et al.*, 2000). Al parecer la estructura del gel de BEMC fue resistente a bajas velocidades de cizalla, requiriéndose la ruptura de enlaces proteína-proteína, glóbulos grasos-proteína, CMC-proteína y probablemente CMC-CMC (Togrul y Arslan, 2003) para comenzar a fluir, pero una vez que estos enlaces son irrumpidos los agregados macromoleculares fluyen. Este comportamiento puede observarse en las figuras 34 a 36, las que muestran viscosidades relativamente elevadas de BEMC a bajas velocidades de cizalla, seguidas de una caída pronunciada en sus valores al incrementarse la velocidad de cizalla, mostrando después muy poca variación. Skriver, *et al.* (1993) y Yanes *et al.* (2002), informaron que sistemas alimenticios incluyendo hidrocoloides y proteínas, muestran

características de flujo atribuidas a la formación de una red secundaria mediante la interacción entre estos dos tipos de polímeros.

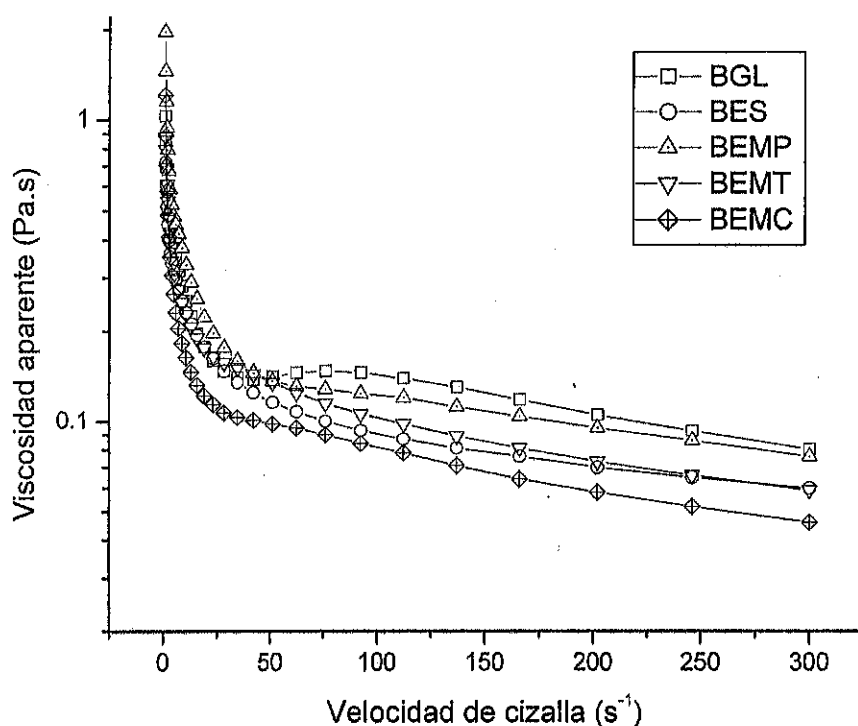


Figura 34. Comportamiento del viscosidad aparente en función de la velocidad de cizalla ( $\dot{\gamma}$ ), de las bebidas a las 24 horas de elaboradas

Los valores de  $\sigma_0$  de BEMP aumentaron ligeramente del primero al séptimo día y al 14° d disminuyeron; los valores de  $k$  permanecen casi constantes del primero al séptimo día y después sufren un pequeño aumento; el comportamiento opuesto lo presenta  $n$ , permaneciendo casi constante del 1° al 7° d y después disminuyendo (Tabla 3). Estos datos muestran estabilidad en BEMP en los primeros días de almacenamiento; no obstante, al 14° d, su carácter pseudoplástico aumenta acompañado de disminución en el esfuerzo requerido para que comience a fluir su estructura. Este comportamiento puede explicarse como consecuencia de un mayor grado de sinéresis y desmineralización de la BEMP al transcurrir del séptimo al 14° d de almacenamiento, causando disminución en las interacciones entre glóbulos grasos cubiertos con pectina y la red proteínica, así como incrementos en el tamaño de los glóbulos grasos (Tabla 2).

La BEMP mostró comportamiento reológico bajo esfuerzo cortante muy similar al exhibido por la BGL (Tabla 3).

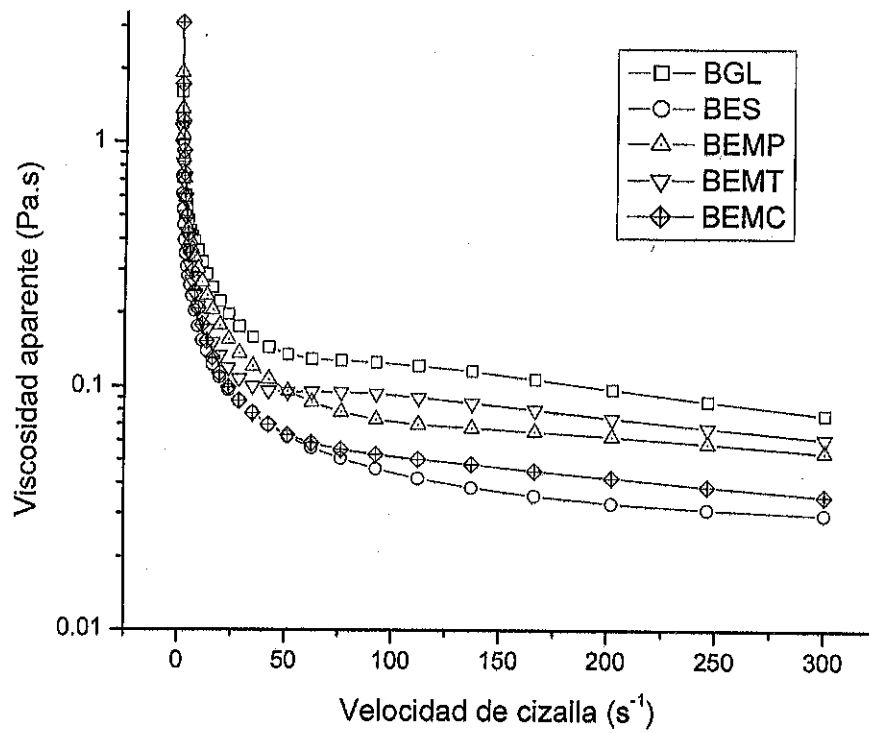


Figura 35. Comportamiento del viscosidad aparente en función de la velocidad de cizalla ( $\gamma$ ), de las bebidas a los 7 días de elaboradas

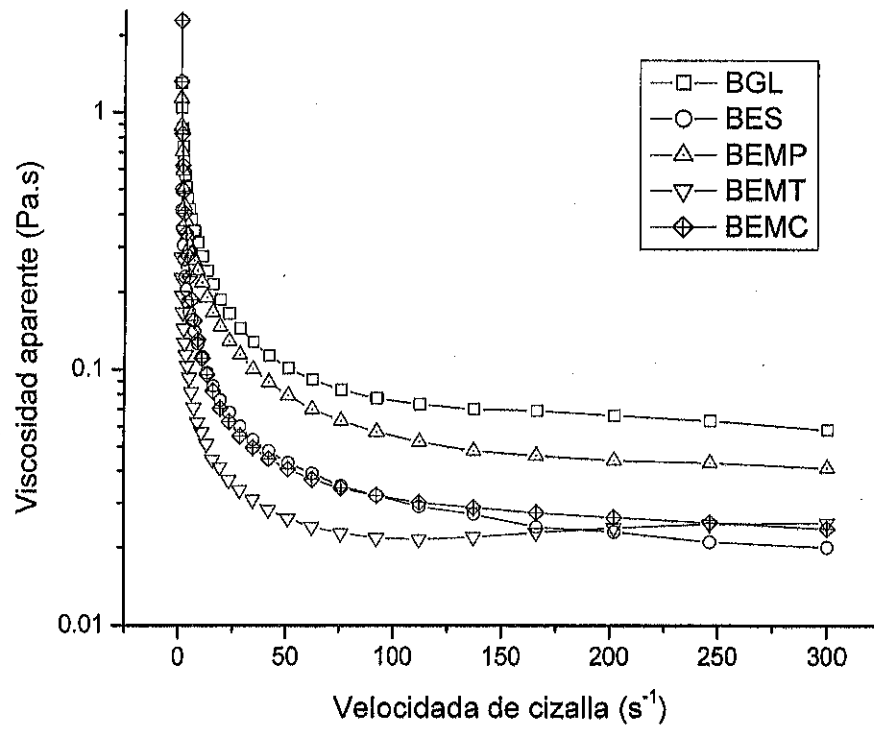


Figura 35. Comportamiento del viscosidad aparente en función de la velocidad de cizalla ( $\gamma$ ), de las bebidas a los 14 días de elaboradas

## BIBLIOGRAFÍA

- Afonso, I., and Maia, J. 1999 Rheological monitoring of structure evolution and development in stirred yogurt. *Journal of Food Engineering*. 42:183-190.
- Aguilera, J., and Stanley, D. 1999. Microestructural principles of food processing and engineering, Aspen Publishers, 2da Edición, Inc, Marylan E.U.A. pp. 293-324.
- Alais, Ch. 1986. *Ciencia de la Leche*. CECSA, México. pp: 87-150
- Allouche, J. Tyrode, E., Sadtler, V., Choplin, L. and Salager, J.L. 2003. Single- and Two-Step Emulsification to Prepare a Persistent Multiple Emulsion with a Surfactant-Polymer Mixture. *Ind. Eng. Chem. Res.* 42, 3982-3988
- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C
- Asano, Y. 1970. The interaction between casein and carboxymethyl cellulose in the acidic condition. *Agricultural & Biological Chemistry*, 34 (1), 102-107.
- Barnes, H. 1999. The yield stress – a review- everything flows?. *Journal of non Newtonian fluid Mechanics*, 81 133-178
- Baron, M., Roy, D. and Vuillemand, J. 2000. Biochemical characteristics of fermented milk produced by mixed-cultures of lactic starters and bifidobacteria. *Lait*, 80 465-478.
- Bourne, M. 2002. *Food Texture and Viscosity. Concept and Measurements*. Academia Press, CA, EUA. pp: 59-106.
- Chen, J., Dickinson, E., Langton, M. and Hermansson, A.M. 2000. Mechanical properties and microstructure of heat-set whey protein emulsion gels: Effect of emulsifiers. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 33, 299:307.
- Coffey, D.G., Bell, D.A. and Henderson, A. 1995. Cellulose and cellulose derivatives. En *Food Polysaccharides and their Applications*. A.M. Stephen Ed. Marcel Dekker, Inc. Nueva York. pp: 123-153.
- Dickinson, E. and Stainsby, G. 1982. *Colloids in Foods*. Applied Science Publishers, Londres, Reino Unido.
- Dickinson, E. 1992. *An Introduction to Food Colloids*. Oxford University Press, Oxford, Reino Unido.
- Dickinson, E. and Tanai, S. 1992. Protein displacement from the emulsion droplet surface by oil-soluble and water-soluble surfactants. *J. Agr. Food Chem.* 40: 179-183.

- Dickinson, E. and Hong, S.T. 1996. Influence of water-soluble nonionic emulsifier on the rheology of heat-set protein-stabilized emulsion gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 2560-2566.
- Dickinson, E., 2001. Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology *Colloids and surfaces B*, 20: 197-210.
- Dickinson, E., 2003 Hydrocolloid at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems *Food Hydrocolloids* 17:25-39
- Euston, S.E., Singh, H., Munro, P.A. and Dagleish, D.G. 1995 Competitive adsorption between sodium caseinate and oil-soluble and water-soluble surfactants in oil-in-water emulsion. *Journal of Food Science*, 60: 1124-1131.
- Everett, D.W. and Olson, N.F. 2000. Dynamic rheology of renneted milk gels containing fat globules stabilized with different surfactants. *Journal of Dairy Science*, 83, 1203-1209.
- Fisher, L.R. and Parker, N.S. 1988. Effect of surfactants on the interactions between emulsions droplets. En E. Dickinson y G. Stainsby (Eds.) *Advances in Food Emulsions and Foams*. Londres R.U. Elsevier Applied Science.
- Ferry, J.D. 1980. Viscoelastic Properties of Polymers. John Wiley & Sons, Nueva York.
- Garti, N. 1997. Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food applications. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 30, 222:235.
- Giese, J. 2003. Texture measurement in foods. *Food Technol.*, 57(3): 63-67.
- Gómez-Díaz, D. and Navaza, J. 2004. Rheology of food stabilizers blends. *Journal of Food Engineering*, 64, 143-149.
- Gunasekaran, S. and Mehmet, M. 2000 Dynamic oscillatory shear testing of foods – Selected applications. *Food science and technology*, 11:115-127
- Haque, A., Richardson, A., and Morris, E. 2001. Effect of fermentation on rheology of set and stirred yogurt. *Food Hydrocolloids* 15: 593-602
- Hegedusic, V., Herceg, Z. and Rimac, S. 2000. Rheological properties of carboxymethylcellulose and whey model solutions before and after freezing. *Food Technology and Biotechnology*, 38 (1), 19-26.
- Hercules Incorporated. 2002. Aqualon cellulose gum behavior with milk. Technical information. Bulletin VC-533A. Willmington, D.E., EUA. pp:1-6.

- Lucey, J. 2001. The relationship between rheological parameters and whey separation in milk gels. *Food Hydrocolloids* 15: 603-608.
- Malone, M., Appelqvist, I. and Norton I. 2003 Oral behavior of food hydrocolloids and emulsions. Part 2. Taste and aroma release *Food hydrocolloids* 17:775-784
- McClements, D. J. 1999. Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques. CRC Press, Boca Raton, Florida, EUA.
- McClements, D.J. 2000. Comments on viscosity enhancement and depletion flocculation by polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 14, 173-177.
- McManus, W.R., McMahon, D.J., and Oberg, C.J. 1993. High-resolution scanning electron microscopy of milk products: a new sample preparation procedure. *Food Structure*, 12, 475-482.
- Morris, V. J. 1993. Rheological and organoleptic properties of food hydrocolloids. In *Food Hydrocolloids Structures, Properties and Functions*. K.Nishinari and E. Doi Eds. Plenum Press, Nueva York, EUA. Pp: 201-210.
- Muguet, V., Seiller, M., Barratt, G., Ozer, O., Marty, J.P. and Grossiord, J.L. 2001. Formulation of shear rate sensitive multiple emulsions. *J. Controlled Release*, 70, 37-49.
- Musashino, K., Hasegawa, Y., Imaoka, H., Adachi, S. and Matsuno, R. (2001). Preparation of W/O/W múltiple Emulsions with Polymers in the Outer Aqueous Phase. *Food Sci. Technol. Res.*, 7(1), 78-83.
- Omotosho, J.A., Whateley, T.L. and Florence, A.T. 1989. Methotrexate transport from the internal phase of multiple W/O/W emulsions. *Journal of Microencapsulation*, 6, 183-192.
- Parker, A., Boulenger, P. and Kravtchenko, T.P. 1993. Effect of the addition of high methoxy pectin on the rheology and colloidal stability of acid milk drinks. En *Food Hydrocolloids Structures, Properties, and Functions*. K. Nishinari and E. Doi Eds. Plenum Press, New York, N.Y. pp: 307-312.
- Penna, A., Sivieri, K. and Oliveira, M. 2001. Relation between quality and rheological properties of lactic beverages. *Journal of Food Engineering* 49: 7-13.
- Penna, A., Oliveira, N. and Tamime, A. 2003. Influence of carrageenens and total solids content on the rheological properties of lactic beverage made with yogurt and whey. *Journal of texture Studies* 34: 95-113.
- Quintana, J.M., Califano, A.N., Zaritzky, N.E., Partal, P. and Franco, J.M. 2002. Linear and nonlinear viscoelastic behavior of oil-in-water emulsions stabilized with polysaccharides. *J. Texture Studies*. 33, 215-236.

- Rao, M. 1999. Introduction. En *Rheology of Fluid and semisolid Foods. Principles and Applications*. Rao (Ed.). Aspen Publishers, Inc. Ma. EUA. pp: 1-21.
- Raymundo, A., Franco, J.M., Partal, P., Sousa, I. and Gallegos, C. 1999. Effect of the lupin protein/ surfactant ratio on the linear viscoelastic properties of oil-in-water emulsions. *J. Surfactants Detergents*, 4, 545-551.
- Rolin, C. 1993. Pectin. En *Industrial Gums Polysaccharides and their Derivatives* R.L. Whistler and J.N. BeMiller Eds. Third edition. Academic Press, Inc. San Diego, CA. pp: 257-293.
- Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., Aguirre-Mandujano, E. and Vernon-Carter, E.J. 2004. Microstructure and texture of yogur as influenced by fat replacers. *International Dairy Journal*, 14, 151-159, 2004.
- Shaker, R., Juman, R. and Abu-Jdayil, B. 2000 Rheological properties of plain yogurt during coagulation process: impact of fat content and preheat treatment of milk *Journal of food engineering*. 44 175-180
- Sharma, S. and Dalgleish, D. 1993, Interactions between milk serum proteins and synthetic fat globul membrane during heating of homogenized whole milk. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 41: 1407-1412.
- Skriver, A., Roemer, H. and Qvist, K.B. 1993. Rheological characterization of stirred yogurt: Viscometry. *Journal of Texture Studies*, 24: 185-198.
- Steffe, J. 1996. *Rheological Methods in Food Process Engineering*. 2ª Edición. Freeman Press. MI, EUA. pp: 19-35.
- Steventon, A.J., Parkinson, C.J., Fryer, P.J. and Bottomley, R.C. 1990. The rheology of yogurt. En *Rheology of Food, Pharmaceutical and Biological Materials with general Rheology*. R.E. Carter Ed. Elsevier Applied Science. pp: 197-210.
- Tabilo-Munizaga, G. and Barbosa-Cánovas, V. 2005. Rheology for the food industry *Journal of food Engineering* 67:147-156.
- Togrul, H. and Arslan, N. 2003. Production of carboxymethyl cellulose from sugar beet pulp cellulose and rheological behaviour of carboxymethyl cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 54, 73-82.
- Tromp, R.H., de Kruif, C.G., van Eijk, M. and Rolin, C. 2004. On the mechanism of stabilisation of acidified milk drinks by pectin. *Food Hydrocolloids*, 18: 565-572.
- Truswell, S. 1995. Dietary Fat: some aspects of nutrition and health and product development Buselas Bélgica