



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

**ESTABILIDAD Y PROPIEDADES REOLÓGICAS DE MICRO Y NANO-
EMULSIONES ACEITE-EN-AGUA PREPARADAS CON COMPLEJOS
SOLUBLES HIDROLIZADO DE PROTEÍNA DE LACTOSUERO- PECTINA
DE TEJOCOTE**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

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



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

PRESENTA:

ING. DANIEL TRUJILLO RAMÍREZ



DICIEMBRE, 2013

Chapingo, Estado de México

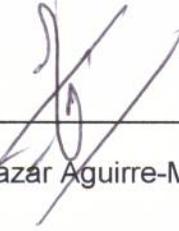
**ESTABILIDAD Y PROPIEDADES REOLÓGICAS DE MICRO Y NANO-
EMULSIONES ACEITE-EN-AGUA PREPARADAS CON COMPLEJOS
SOLUBLES HIDROLIZADO DE PROTEÍNA DE LACTOSUERO- PECTINA
DE TEJOCOTE**

Tesis realizada por **Daniel Trujillo Ramírez** 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**

Co-Director: 
Dra. Consuelo Silvia Olivia Lobato-Calleros

Co-Director: 
Dr. Salvador Valle-Guadarrama

Asesor: 
Dr. Eleazar Aguirre-Mandujano

DIDICATORIA

A MIS PADRES:

Gregorio Trujillo García y Reyna Ramírez Martínez.

Sabiendo que jamás existirá una forma de agradecer una vida de lucha, sacrificio y esfuerzo constante, solo deseo que sepan que el logro mío, es logro suyo, que mi esfuerzo es inspirado en ustedes y que son mi único ideal.

Con admiración, amor y agradecimiento, este trabajo siempre lo hice pensando en ustedes y en mis hermanos Luis Ángel, Dulce del Carmen y Marisol Trujillo Ramírez, y en Vannia personita que ha alegrado la vida a todos nosotros.

Daniel.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT) por brindarme el apoyo económico para la realización de mis estudios de maestría, así como a la Universidad Autónoma Chapingo, institución que me albergó en esta etapa de mi vida.

A la Dra. Consuelo Lobato Calleros, por ser directora de esta tesis de investigación e instructora del conocimiento aquí plasmado. Sus acertadas sugerencias, aportaciones, correcciones así como su confianza, amistad y afecto, me permiten concluir esta etapa de mi formación profesional.

Al Dr. Eleazar Aguirre Mandujano, quien desde un principio me brindó su apoyo y dedicación profesional para poder ingresar a la maestría y que gracias a sus aportaciones científicas me permiten concluir dichos estudios.

Al Dr. Salvador Valle Guadarrama, por las facilidades otorgadas en la realización de esta investigación.

A la Dra. Ofelia Sandoval Castilla, al Dr. Cesar Ramírez Santiago y a la M. C. Landy Hernández Rodríguez, por sus acertadas asesorías en la presente investigación, así como la amistad brindada.

A mis compañeros de la 10ª generación, y compañeros de laboratorio, por hacer más amena mi estancia en Chapingo, así como aquellas personas que directa e indirectamente contribuyeron en mi formación profesional y personal.

Y finalmente a mi alma mater, la Universidad Veracruzana.

DATOS BIOGRÁFICOS

Daniel Trujillo Ramírez, nació el 26 de marzo de 1988 en la H. Cd. de Cosoleacaque, Veracruz. Realizó sus estudios en la Facultad de Ingeniería en Sistemas de Producción Agropecuaria (FISPA) de la Universidad Veracruzana (UV), durante el periodo 2006-2010, titulándose con el trabajo de investigación: “Rendimiento y calidad de *Panicum maximum* (JACQUIN) cultivar Mombaza sometida a fertilización en Mecayapan, Veracruz” y obteniendo mención honorífica; dicho trabajo de investigación lo presentó en el I Congreso Internacional de Manejo de Pastizales y II Simposio Internacional de Forrajes Tropicales; así como también en la XXIII Reunión Científica-Tecnológica, Forestal y Agropecuaria Veracruz y II del Trópico Mexicano, ambos en 2010.

Ha tomado cursos-talleres de actualización profesional de reología interfacial, de correlación de las propiedades reológicas de potencial zeta y análisis de distribución de tamaño para la caracterización de un sistema particulado, de microfluidización y cromatografía de gases, así como de modelo de negocios en empresas agroindustriales.

En el ámbito profesional trabajó en el Laboratorio de Análisis de Suelos, Bromatología y Agua (LASBA) perteneciente a la UV, de 2010-2011, así también como Prestador de Servicios Profesionales para la SRA (Secretaría de la Reforma Agraria) hoy SEDATU (Secretaría de Desarrollo Agrario Territorial y Urbano) durante el periodo de 2011–2013.

ESTABILIDAD Y PROPIEDADES REOLÓGICAS DE MICRO Y NANO- EMULSIONES ACEITE-EN-AGUA PREPARADAS CON COMPLEJOS SOLUBLES HIDROLIZADO DE PROTEÍNA DE LACTOSUERO- PECTINA DE TEJOCOTE

STABILITY AND RHEOLOGICAL PROPERTIES OF OIL-IN-WATER MICRO AND NANOEMULSIONS MADE WITH WHEY PROTEIN HYDROLYSATE-HAW PECTIN SOLUBLE COMPLEXES

D. Trujillo-Ramírez¹, C. Lobato-Calleros², S. Valle-Guadarrama³, E. Aguirre-Mandujano²

1. Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria. Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México- Texcoco, 56230 Texcoco, México.
2. Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México- Texcoco, 56230 Texcoco, México.
3. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México- Texcoco, 56230 Texcoco, México

RESUMEN

La estabilidad y propiedades reológicas de micro y nanoemulsiones aceite-en-agua (E) estabilizadas con complejos solubles ($CS_{WPH,P}$) hidrolizado de proteína de lactosuero (WPH)-pectina (P) fueron evaluadas. Dieciocho variaciones de E se prepararon usando una relación en peso WPH:P de 6:1, y variando el tamaño de gota (4000, 3000, 2500, 200, 100 y 30 nm) y el tipo de pectina [pectinas de accesiones de tejocote 26 y 50 (PT_{26} y PT_{50} , respectivamente) y pectina cítrica (P_C)]. Los valores de pH para generar $CS_{WPH,P}$ se establecieron mediante determinaciones de potencial zeta y turbidez. Ambos, el tipo de pectina y tamaño de gota influenciaron la estabilidad y propiedades reológicas de las E. Todas las E fueron estables, pero aquellas con diámetro volumétrico-superficial medio ($d_{3,2}$) ≤ 100 nm sufrieron la variación más pequeña de tamaño de gota durante el almacenamiento. Las E_{PT26} y E_{PT50} mostraron propiedades viscoelásticas y viscosidades aparentes más elevadas, las cuales fueron mayores conforme los valores de $d_{3,2}$ disminuyeron, en comparación con aquellas presentadas por E_{PC} .

Palabras clave: microemulsiones, nanoemulsiones, propiedades reológicas, estabilidad, complejos solubles.

ABSTRACT

The stability and rheological properties of oil-in-water micro and nanoemulsions (E) stabilized by whey protein hydrolysate (WPH)-pectin (P) soluble complexes ($CS_{WPH,P}$) were evaluated. Eighteen E variations were prepared using a weight ratio WPH:P of 6:1 and by varying the droplet size (4000, 3000, 2500, 200, 100, and 30 nm) and the pectin type [pectins from 26 and 50 haw accessions (PT_{26} and PT_{50} , respectively), and citrus pectin (P_C)]. The interaction pH values to generate $CS_{WPH,P}$ were established through zeta potential and turbidity determinations. Both pectin type and the droplet size influenced the stability and rheological properties of the E. All of the E were stable, but those with volume-surface average diameter ($d_{3,2}$) ≤ 100 nm suffered the smallest droplet size variation during the storage. The E_{PT26} and E_{PT50} displayed higher viscoelastic properties and apparent viscosities, which increased as the $d_{3,2}$ values decreased, in comparison with those presented by the E_{PC} .

Keywords: microemulsions, nanoemulsions, rheological properties, stability, soluble complexes.

Índice general

Lista de cuadros	v
Lista de figuras	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. JUSTIFICACIÓN	3
III. OBJETIVOS	5
3.1. Objetivo general.....	5
3.2. Objetivos particulares.....	5
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	6
4.1. Emulsiones.....	6
4.1.1. Clasificación de las emulsiones.....	6
4.1.1.1. De acuerdo a la fase dispersa.....	6
4.1.1.2. De acuerdo al tamaño de gota.....	7
4.2. Nanoemulsiones.....	7
4.2.1. Métodos de emulsificación.....	8
4.2.1.1. Métodos de alto consumo energético.....	9
4.2.1.2. Métodos de bajo consumo energético.....	12
4.3. Propiedades fisicoquímicas de micro y nanoemulsiones.....	13
4.3.1. Composición de la gota.....	14
4.3.2. Concentración de gotas.....	14
4.3.3. Distribución del tamaño de gota.....	14
4.3.4. Carga de las gotas.....	15

4.3.5. Interacciones coloidales.....	16
4.3.6. Reología.....	16
4.4. Mecanismos físicos de desestabilización de emulsiones.....	17
4.4.1. Separación gravitacional.....	18
4.4.2. Agregación de gotas.....	19
4.4.2.1. Floculación.....	20
4.4.2. Coalescencia.....	21
4.4.3. Maduración de Ostwald.....	22
4.5. Agentes que propician la estabilidad en nanoemulsiones.....	22
4.5.1. Emulsificantes.....	22
4.5.1.1. Mecanismo de acción.....	24
4.5.1.2. Factores que influyen en la selección.....	24
4.5.2. Agentes espesantes.....	26
4.5.2.1. Mecanismo de acción.....	26
4.5.2.2. Factores que influyen en la selección.....	26
4.6. Emulsiones estabilizadas con proteína.....	27
4.6.1. Proteínas del suero.....	28
4.7. Emulsiones estabilizadas con polisacáridos.....	30
4.7.1. La pectina.....	30
4.8. Sistemas emulsionantes mixtos.....	31
4.8.1. Emulsiones estabilizadas con proteína-polisacárido.....	31
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
5.1. Materiales.....	33
5.2. Extracción de pectinas de tejocote.....	33
5.3. Determinación del grado de esterificación de pectinas de	

tejocote.....	35
5.4. Contenido de proteína y humedad de pectinas.....	35
5.5. Formación de complejos solubles hidrolizado de proteína de lactosuero- pectina.....	36
5.5.1. Disoluciones base.....	36
5.5.2. Determinación de la ventana de pH de interacción.....	36
5.5.3. Determinación del pH óptimo para la formación de complejos solubles.....	37
5.6. Variaciones y método de preparación de las emulsiones.....	37
5.6.1. Variaciones.....	37
5.6.2. Método de preparación.....	38
5.7. Caracterización de las emulsiones.....	40
5.7.1. Estabilidad de las emulsiones con el tiempo de almacenamiento.....	40
5.7.2. Propiedades reológicas.....	40
5.8. Análisis de datos.....	41
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
6.1. Rendimiento, grado de esterificación y contenido de proteína de las pectinas.....	42
6.2. Formación de complejos solubles hidrolizado de proteína de lactosuero- pectina.....	44
6.2.1. Variación de los valores de potencial zeta (ζ) de los biopolímeros como función del pH.....	44
6.3. pH de máxima formación de complejos solubles hidrolizado de proteína de lactosuero- pectina.....	47

6.4. Condiciones de proceso para la obtención de micro y nanoemulsiones con tamaño de gota preestablecido.....	51
6.5. Estabilidad de micro y nanoemulsiones con el tiempo.....	56
6.6. Propiedades reológicas.....	65
6.6.1. Barridos de amplitud.....	65
6.6.2. Barridos de frecuencia.....	73
6.6.3. Curvas de flujo.....	79
VII. CONCLUSIONES.....	85
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	87

Lista de cuadros

Cuadro 1. Rendimiento, grado de esterificación y contenido de proteína de las pectinas.....	42
Cuadro 2. Condiciones de obtención y diámetro volumétrico-superficial medio ($d_{3,2}$, nm) de micro y nanoemulsiones.....	52
Cuadro 3. Valores de diámetro volumétrico-superficial medio ($d_{3,2}$) inicial y final de micro y nanoemulsiones.....	58
Cuadro 4. Análisis de varianza multifactorial de potencial zeta (mV) de micro y nanoemulsiones como función del diámetro volumétrico-superficial inicial promedio ($d_{3,2}$) y del tipo de pectina.....	63
Cuadro 5. Análisis de varianza multifactorial de los valores del módulo de almacenamiento (G' , kPa) de micro y nanoemulsiones, correspondientes a la zona viscoelástica lineal.....	70
Cuadro 6. Análisis de varianza multifactorial de los valores del módulo de pérdida (G'' , kPa) de micro y nanoemulsiones, correspondientes a la zona viscoelástica lineal.....	70
Cuadro 7. Análisis de varianza multifactorial del factor de cedencia ($\text{Tan } \delta$, kPa) de micro y nanoemulsiones, correspondientes a la zona viscoelástica lineal.....	71
Cuadro 8. Análisis de varianza multifactorial de la viscosidad inicial (η_0 , Pa.s) de micro y nanoemulsiones.....	82
Cuadro 9. Análisis de varianza multifactorial del tiempo de relajación (λ , s) de micro y nanoemulsiones.....	82

Cuadro 10. Análisis de varianza multifactorial del índice de adelgazamiento al corte (ρ) de micro y nanoemulsiones.....	83
--	----

Lista de figuras

Figura 1. Mecanismos físicos de inestabilidad de una emulsión (McClements y Rao, 2011).....	18
Figura 2. Proceso de extracción y obtención de pectina de tejocote.....	34
Figura 3. Variación del potencial zeta (ζ) como función del pH de disoluciones de WPH (6% p/v) y pectinas (1% p/v).....	45
Figura 4. Variación de la absorbancia de los complejos solubles hidrolizado de proteína de lactosuero-pectinas como función de la longitud de onda.	48
Figura 5. Absorbancia de mezclas de WPH (6% p/v): pectinas (1% p/v) en función del pH.....	49
Figura 6. Variación del diámetro volumétrico-superficial de las gotas de aceite de las microemulsiones (a) y nanoemulsiones (b) durante su almacenamiento por 35 días a 5 ± 1 °C.....	57
Figura 7. Potencial- ζ de micro y nanoemulsiones.....	62
Figura 8. Variación de los módulos G' (símbolos rellenos) (a) y G'' (símbolos vacíos) (b) del $CS_{WPH, PC}$ y de micro y nanoemulsiones formadas con este complejo a pH= 4.25, como función de la deformación.	66
Figura 9. Variación de los módulos G' (símbolos rellenos) (a) y G'' (símbolos vacíos) (b) del $CS_{WPH, PT26}$ y de micro y nanoemulsiones formadas con este complejo a pH= 4.25, como función de la deformación.	67
Figura 10. Variación de los módulos G' (símbolos rellenos) (a) y G'' (símbolos vacíos) (b) del $CS_{WPH, PT50}$ y de micro y nanoemulsiones formadas con este complejo a pH= 4.0, como función de la deformación.	68

Figura 11. Variación de los módulos G' (símbolos rellenos) (a) y G'' (símbolos vacíos) (b) del $CS_{WPH, PC}$ y de micro y nanoemulsiones formadas con este complejo a $pH= 4.25$, durante el barrido de frecuencia.....	74
Figura 12. Variación de los módulos G' (símbolos rellenos) (a) y G'' (símbolos vacíos) (b) del $CS_{WPH, PT26}$ y de micro y nanoemulsiones formadas con este complejo a $pH= 4.25$, durante el barrido de frecuencia.....	75
Figura 13. Variación de los módulos G' (símbolos rellenos) (a) y G'' (símbolos vacíos) (b) del $CS_{WPH, PT50}$ y de micro y nanoemulsiones formadas con este complejo a $pH= 4.0$, durante el barrido de frecuencia.....	76
Figura14. Cambios en la viscosidad aparente como función de la tasa de corte del $CS_{WPH, PC}$ y de micro y nanoemulsiones formadas con este complejo a $pH= 4.25$	79
Figura 15. Cambios en la viscosidad aparente como función de la tasa de corte de $CS_{WPH, PT26}$ y de micro y nanoemulsiones formadas con este complejo a $pH= 4.25$	80
Figura 16. Cambios en la viscosidad aparente como función de la tasa de corte de $CS_{WPH, PT50}$ y de micro y nanoemulsiones formadas con este complejo a $pH= 4.0$	80

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad los consumidores demandan productos de alta calidad nutricia y sanitaria, que contribuyan además a su salud; por tanto se ha generado gran interés por el desarrollo de emulsiones aceite-en-agua, las cuales pueden actuar como medios encapsulantes y de protección de compuestos bioactivos liposolubles, y a la vez como sustitutos de grasa saturada en distintos alimentos (Lobato-Calleros *et al.*, 2010; Burapapadh *et al.*, 2012; Troncoso *et al.*, 2012). El carácter no polar de aceites e ingredientes hidrófobos es responsable de su separación espontánea de la fase acuosa (Given, 2009). Para solucionar este problema se ha propuesto el desarrollo de micro- y nano-emulsiones, mediante el uso de diversos agentes emulsificantes/estabilizantes (Rao y McClements, 2011). En adición, las emulsiones deben ser cuidadosamente diseñadas para proporcionar atributos sensoriales y fisicoquímicos deseables en el producto final (Piorkowski y McClements, 2013). Recientemente, la industria alimentaria ha mostrado un creciente interés en la sustitución de los emulsionantes sintéticos por aquellos de origen natural, tales como polisacáridos y proteínas (Hernández-Marín *et al.*, 2013; Piorkowski y McClements, 2013; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2014). En este sentido, se ha informado que complejos biopoliméricos presentan propiedades funcionales mejoradas, en relación a aquellas mostradas por los biopolímeros individuales, en particular han llamado la atención aquellos de naturaleza proteína- polisacárido (Ramírez-Santiago *et al.*, 2012). Las proteínas son ingredientes ampliamente

utilizados en emulsiones alimentarias, debido a su carácter anfifílico estas macromoléculas se adsorben en la interfase aceite-agua, disminuyen la tensión interfacial y estabilizan las gotas de aceite por repulsión electrostática y estérica (Lam y Nickerson, 2013). Por su parte, los polisacáridos son macromoléculas hidrofílicas que se añaden a la fase acuosa de las emulsiones como agentes espesantes con el fin de frenar la desestabilización de las emulsiones (Dickinson, 2003). Bajo condiciones especiales de pH y relación en peso entre biopolímeros, pueden obtenerse complejos solubles proteína- polisacárido (Espinosa-Andrews *et al.*, 2013), los cuales pueden actuar como agentes emulsificantes/estabilizantes de emulsiones, dependiendo su funcionalidad de su naturaleza química y la fuerza de las interacciones proteína- polisacárido (Leal-Calderón *et al.*, 2007). En adición, se ha informado que la disminución del tamaño de gota de las emulsiones, puede convertirlos en sistemas cinéticamente estables (meta-estables) (Hernández-Jaimes *et al.*, 2013). El tamaño de gota de las emulsiones también influye en sus propiedades reológicas; particularmente cuando se vuelve pequeño (McClements, 2005), lo cual en turno repercutirá en las propiedades mecánicas de aquellos alimentos a los que se incorporen. Con base en lo expuesto, en este trabajo se evaluó la estabilidad y las propiedades reológicas de micro y nanoemulsiones, usando complejos solubles de hidrolizado de proteína de lactosuero (WPH) y pectinas (dos de tejocote de las accesiones 26 y 50, y una cítrica) como agentes emulsificantes/estabilizantes.

II. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad los consumidores demandan productos de alta calidad nutricia y sanitaria, que contribuyan además a su salud; por tanto se ha generado un gran interés por el desarrollo de emulsiones aceite-en-agua, las cuales pueden actuar como medios encapsulantes y de protección de compuestos bioactivos liposolubles, y a la vez como sustitutos de grasa saturada en distintos alimentos. La gran mayoría de las investigaciones se han enfocado a la preparación y la caracterización de microemulsiones (tamaño de gota > 100 nm); sin embargo, existen varios problemas por resolver en este sentido, siendo algunos los siguientes: las microemulsiones son sistemas termodinámicamente inestables, que sufren separación de fases en tiempos relativamente cortos; para la obtención de microemulsiones metaestables se requiere del uso de agentes emulsificantes/estabilizantes incorporados individualmente o combinados, de los cuales en la gran mayoría de los casos, al menos alguno es de origen sintético y, la incorporación de microemulsiones como sustitutos de grasa saturada, en general resulta en alimentos con propiedades mecánico-sensoriales menores a aquellas de su contraparte conteniendo grasa saturada. Resulta entonces interesante explorar la formación, las propiedades mecánicas y la estabilidad de nanoemulsiones (tamaño de gota < 100 nm) formadas y estabilizadas mediante compuestos de origen natural; por ejemplo, mediante complejos biopoliméricos solubles, y comparar tales propiedades con aquellas de microemulsiones preparadas de manera similar. Los complejos

biopoliméricos presentan propiedades funcionales mejoradas, respecto a aquellas mostradas por los biopolímeros individuales. Las nanoemulsiones, de las cuales existen escasos reportes relacionados con su formulación y aplicación en sistemas alimenticios, constituyen sistemas coloidales con mayor estabilidad que las microemulsiones y ofrecen una mayor biodisponibilidad de los agentes bioactivos encapsulados en las mismas.

En este trabajo se propone utilizar complejos solubles de hidrolizado de proteína de lactosuero (WPH) y pectinas (dos de tejocote y una cítrica) como agentes emulsificantes/estabilizantes, con la finalidad adicional de aprovechar las propiedades funcionales de los péptidos bioactivos contenidos en el WPH y al mismo tiempo desarrollar aplicaciones alimentarias para las pectinas de tejocote, cultivo originario y tradicional de nuestro país.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Comparar las propiedades reológicas y la estabilidad de micro- y nano-emulsiones aceite-en-agua, formadas y estabilizadas mediante complejos solubles de hidrolizado de proteína de lactosuero-pectina.

3.2. Objetivos particulares

Formar complejos solubles entre hidrolizado de proteína de lactosuero y tres tipos de pectina (pectina cítrica y pectinas de tejocote accesiones 26 y 50).

Establecer el método de preparación de micro- y nano-emulsiones, utilizando los complejos solubles de hidrolizado de proteína de lactosuero-pectina como agentes emulsificantes/estabilizantes.

Comparar las propiedades reológicas y estabilidad de las micro- y nano-emulsiones como función de su tamaño de gota y el tipo de pectina formando parte de los complejos solubles.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Emulsiones

Las emulsiones, son dispersiones termodinámicamente inestables de dos líquidos inmiscibles, generalmente de agua y aceite (Muñoz *et al.*, 2007). Mediante la incorporación de agentes emulsificantes/estabilizantes, los cuales presentan la capacidad de adsorberse a la superficie de las gotas, estos sistemas dispersos pueden convertirse en cinéticamente estables (meta-estables; Hernández-Jaimes *et al.*, 2013; Bortnowska *et al.*, 2014). Las emulsiones están constituida por tres regiones, las cuales presentan propiedades físico-químicas diferentes: la fase dispersa, la fase continua y la interfase. Todas las moléculas o ingredientes de la emulsión se distribuyen según su concentración y polaridad a lo largo de las regiones mencionadas anteriormente (Aranberri *et al.*, 2006). Las moléculas que constituyen una emulsión tienden a moverse de una región a otra, alterando de esta forma las condiciones físicas y químicas de la misma. Este movimiento, así como la concentración e interacciones entre sus constituyentes tienen una influencia significativa en las propiedades fisicoquímicas, de textura y de aplicación de estos sistemas dispersos (Sonneville-Aubrun *et al.*, 2004; McClements, 2005).

4.1.1. Clasificación de las emulsiones

4.1.1.1. De acuerdo a la fase dispersa. En general, las emulsiones se clasifican de acuerdo a la organización espacial relativa de su fase

continua o dispersante: agua-en-aceite (W/O) y aceite-en-agua (O/W). Estas últimas permiten la incorporación de agentes funcionales liposolubles a sistemas alimenticios. También existen emulsiones dobles de agua-en-aceite-en-agua (W/O/W) y de aceite-en-agua-en-aceite (O/W/O; Benichou *et al.*, 2007; Hernández-Marín *et al.*, 2014).

4.1.1.2. De acuerdo al tamaño de gota. Las emulsiones pueden clasificarse de acuerdo al tamaño de las gotas de la fase dispersa; sin embargo, aún no hay una homogeneidad sobre los rangos de este criterio. A continuación se muestra la clasificación establecida por McClements y Rao (2011); Rao y McClements (2011):

- Emulsiones (radio de gota 100 nm – 100µm)
- Nanoemulsiones (radio de gota 10 – 100 nm)
- Microemulsiones (radio de gota 2 – 100 nm)

Mason *et al.* (2006) y Salvia-Trujillo *et al.* (2013) mencionan que las nanoemulsiones son aquellas constituidas por gotas de la fase dispersa menores a 200 nm.

4.2. Nanoemulsiones

En los últimos años, debido a la introducción de nuevas tecnologías de alta presión (homogeneizadores y microfluidizadores), las industrias química, alimentaria, farmacéutica y cosmética se han dado a la tarea de producir emulsiones con tamaños de gota pequeñas (en escala nanométrica; Junyaprasert *et al.*, 2009; Rao y McClements, 2011; Burapapadh *et al.*, 2012; Hernández-Jaimes *et al.*, 2013; Salvia-Trujillo *et al.*, 2013).

Algunas ventajas de nanoemulsiones con respecto a emulsiones convencionales (emulsiones en escala micrométrica) son: pueden ser transparentes, si no dispersan luz en la región visible; tienen una alta estabilidad a la agregación y separación gravitacional; tienen características reológicas únicas y pueden aumentar en gran medida la biodisponibilidad de los componentes lipófilos encapsulados (por ejemplo, antioxidantes, sabores, colores, antimicrobianos y bactericidas; Weiss *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2010; Salvia-Trujillo *et al.*, 2013). En los últimos años ha despertado el interés por el uso de nanoemulsiones, debido a sus propiedades funcionales, tales como apariencia, estabilidad física, química y de textura, y la actividad de compuestos bioactivos encapsulados (Rao y McClements, 2011; Rao y McClements, 2012; Burapapadh *et al.*, 2012; Salvia-Trujillo *et al.*, 2013).

4.2.1. Métodos de emulsificación

Las nanoemulsiones pueden obtenerse por métodos de alta energía y métodos de baja energía.

Los métodos de emulsificación de alta energía incluyen homogeneizadores (por ejemplo, agitación a alta cizalla), válvulas de alta presión, microfluidizadores y métodos ultrasónicos (Burapapadh *et al.*, 2010; Hernández-Jaimes *et al.*, 2013; Piorkowski y McClements, 2013; Salvia-Trujillo *et al.*, 2013).

También los métodos de emulsificación de baja energía están recibiendo cada vez más atención. En estos métodos, las nanoemulsiones se obtienen como resultado de transiciones de fases producidos durante la emulsificación (Ostertag *et al.*, 2012; Mayer *et al.*, 2013; Saberi *et al.*, 2013). En la práctica, una combinación de métodos de emulsificación de alto y bajo

consumo de energía han demostrado ser una forma eficaz de obtener nanoemulsiones con tamaño de gota pequeño y distribución uniforme (Mayer *et al.*, 2013). No obstante, en la actualidad los métodos de alta energía son probablemente los comúnmente utilizados para la preparación de nanoemulsiones, debido a que se pueden producir a gran escala y se puede usar una gran variedad de materiales (Piorkowski y McClements, 2013). El tamaño mínimo de partícula que puede ser producido utilizando uno u otro tipo de método depende de diversos factores, los cuales se mencionaran a continuación.

4.2.1.1. Métodos de alto consumo energético. El tamaño de las gotas generadas por los métodos de alta energía está determinado por un equilibrio entre dos procesos opuestos que ocurren dentro del homogeneizador: ruptura y coalescencia de gotas (Jafari *et al.*, 2007). Sólo los dispositivos mecánicos son capaces de generar fuerzas extremadamente intensas de ruptura para producir gotas pequeñas, es decir, homogeneizadores de válvulas de alta presión, microfluidizadores y dispositivos ultrasónicos (Piorkowski y McClements, 2013; Salvia-Trujillo *et al.*, 2013; Hernández-Jaimes *et al.*, 2012).

El tamaño de gota producido por un dispositivo depende de la alta energía del diseño del homogeneizador (por ejemplo, el flujo y perfiles de fuerza); condiciones de operación del homogeneizador (intensidad energética y duración); condiciones ambientales (temperatura); composición de la muestra (tipo de aceite, tipo y concentración de emulsionantes) y las propiedades físico-químicas de la composición de fases (tensión interfacial, viscosidad; Wooster *et al.*, 2008; Piorkowski y McClements, 2013). Los

métodos de alta energía son adecuados para la producción de micro- y nanoemulsiones; sin embargo, como se mencionó, el tamaño de las gotas producidas no sólo depende de un factor. Por ejemplo, es más fácil producir gotas muy pequeñas cuando la fase oleosa presenta una viscosidad y/o tensión interfacial baja, que cuando se tiene una alta viscosidad y/o tensión interfacial (Rao y McClements, 2012).

Una vez que se han optimizado las condiciones de homogeneización, las nanoemulsiones pueden contener en la fase oleosa, aceites ricos en ácidos grasos poliinsaturados, aceites esenciales con actividad antimicrobiana, antioxidantes. Como agentes emulsificantes y/o estabilizantes pueden utilizarse proteínas, polisacáridos o fosfolípidos. Algunos instrumentos que se utilizan en los métodos de emulsificación de alto consumo energético, se presentan a continuación:

Homogeneizadores de válvulas de alta presión (HVAP). Actualmente, los homogeneizadores de válvulas de alta presión (HVAP) son los equipos de alta energía más comúnmente usados para producir nanoemulsiones. Inicialmente, se prepara una emulsión gruesa o micrométrica utilizando un mezclador de alto cizallamiento y en seguida, ésta se alimenta directamente a la entrada del HVAP. A medida que la emulsión gruesa pasa por la válvula experimenta una combinación de fuerzas de ruptura intensas que causan que las gotas más grandes se descompongan en otras más pequeñas.

El tamaño de gota producido usando un HVAP, generalmente disminuye a medida que se incrementa el número de pases y/o la presión del homogeneizador; también depende de la relación de las dos fases (aceite y agua; Piorkowski y McClements, 2013).

Microfluidizadores. La formación de nanoemulsiones usando microfluidizadores también implica forzar una emulsión gruesa, sin embargo, el diseño de los canales a través del cual la emulsión fluye dentro del microfluidizador es diferente a la de los HVAP; a diferencia de este último, el microfluidizador divide una emulsión en dos corrientes, que luego chocan entre sí en una cámara de interacción, llevando a una ruptura de gotas eficientes. Algunos estudios han examinado la posible aplicación de microfluidizadores para la producción de nanoemulsiones (Gharibzahedi *et al.*, 2012; Nam *et al.*, 2012; Salvia-Trujillo *et al.*, 2013). Estos estudios han demostrado que las nanoemulsiones se pueden producir siempre y cuando las condiciones faciliten la ruptura de gotas e inhiban la coalescencia de las mismas.

El tamaño de gota tiende a disminuir al aumentar la presión de homogeneización, número de pases, la concentración de emulsionante y el incremento de la relación viscosidad fase dispersa/fase continua (Wooster *et al.*, 2008; Troncoso *et al.*, 2012).

Homogeneizadores por ultrasonido. Este tipo de homogeneizador utiliza alta intensidad en ondas ultrasónicas para generar fuerzas perturbadoras intensas (generado principalmente por cavitación) que rompen las fases de aceite y agua en gotas muy pequeñas (Quintanilla-Carvajal *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2012; Hernández-Jaimes *et al.*, 2012).

El tamaño de las gotas producidas utilizando este tipo de dispositivos tiende a disminuir a medida que la intensidad de las ondas ultrasónicas se incrementa o el tiempo de residencia en la zona de rompimiento se incrementa (Peshkovsky *et al.*, 2013; Hernández-Jaimes *et al.*, 2012).

La eficiencia de homogeneización también depende del tipo y cantidad de emulsionante presente, la viscosidad de las fases oleosa y acuosa (Jafari *et al.*, 2007; Leong *et al.*, 2009).

4.2.1.2. Métodos de bajo consumo energético. La formación de emulsiones utilizando métodos de baja energía se basa en la formación espontánea de gotas de aceite en mezclas tensoactivo-aceite-agua, cuando su composición o su entorno se alteran de alguna manera. Una serie de métodos para la preparación de nanoemulsiones se basa en el enfoque de baja energía, incluyendo emulsificación espontánea y métodos de inversión de fases (Sonneville-Aubrun *et al.*, 2009; Ostertag *et al.*, 2012; Mayer *et al.*, 2013; Saberi *et al.*, 2013). Los métodos de bajo consumo de energía son:

Métodos de emulsificación espontánea. Mediante el método se forma una emulsión de manera espontánea cuando una fase orgánica y una fase acuosa se mezclan entre sí (Saberi *et al.*, 2013). La fase orgánica por lo general contiene aceite, tensoactivo y posiblemente disolvente miscible en agua, mientras que la fase acuosa contiene generalmente agua y posiblemente co-disolvente y co-tensoactivo. Las dos fases pueden ser incorporadas de dos maneras: la fase orgánica se puede valorar en la fase acuosa, o la fase acuosa se puede valorar en la fase orgánica (Sonneville-Aubrun *et al.*, 2009).

Cuando las dos fases entren en contacto con el agente tensoactivo hidrófilo y/o disolvente de la fase oleosa a la fase acuosa, generará pequeñas gotas de aceite en el límite de la fase (Saberi *et al.*, 2013). El tamaño de gotas producido puede ser controlado por las composiciones de las dos fases

iniciales, así como las diferentes condiciones de mezcla.

La principal ventaja de este método es que es barato, sencillo y no requiere ningún equipo importante, mientras que la desventaja es que los niveles de tensoactivos que se requieren son relativamente altos.

Métodos de inversión de fase. Varios métodos han sido desarrollados para formular nanoemulsiones que dependen de la inducción de una inversión de fase de una W/O a una forma de O/W, por ejemplo, inversión de fase de temperatura y el punto de inversión de la emulsión (PIT, EPI, por sus siglas en inglés respectivamente; Ostertag *et al.*, 2012; Mayer *et al.*, 2013). En el método PIT el cambio de un tipo de una emulsión a otra implica una inversión de fase de transición, esto se produce cuando las propiedades del tensoactivo son alterados mediante el ajuste de una variable de formulación, tales como la temperatura, pH o fuerza iónica; mientras que en el método de EPI se trata de una inversión de fase catastrófico y esta se produce cuando la relación de las fases aceite-agua es alterada, mientras las propiedades tensoactivas, se mantienen constantes.

4.3. Propiedades físico-químicas de micro y nanoemulsiones

Las propiedades físico-químicas de la mayoría de las emulsiones (por ejemplo, propiedades ópticas, estabilidad, reología y características de liberación) están determinadas en gran medida por las propiedades de las gotas que contienen (McClements, 2005), tales como la composición, la concentración, el tamaño, y la carga

4.3.1. Composición de la gota

La composición de la fase de aceite tiene una gran influencia en la formación y estabilidad de las emulsiones.

Las emulsiones pueden contener una variedad de diferentes componentes hidrofílicos; tales como aceites esenciales, de sabor, con una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, vitaminas, nutraceuticos, agentes antimicrobianos, bactericidas, estos componentes varían en sus características moleculares (peso molecular, conformación molecular y grupos funcionales), lo que conduce a cambios en sus propiedades físico-químicas (polaridad, solubilidad en agua, densidad, viscosidad, índice de refracción, estado físico y punto de fusión). Muchas de estas propiedades físico-químicas y moleculares tienen una gran influencia en la formación, la estabilidad y la funcionalidad de las emulsiones (Rao y McClements, 2012).

4.3.2. Concentración de gotas

En general, la concentración de las gotas en una emulsión tiene influencia en la textura, estabilidad, apariencia, atributos sensoriales y calidad nutricional (McClements y Rao, 2011). La concentración de gotas se caracteriza generalmente en términos de fracción volumétrica de la fase dispersa (φ), que es el volumen de las gotas de la emulsión dividido por el volumen total de la emulsión.

4.3.3. Distribución del tamaño de gota

La distribución del tamaño de gotas en una emulsión tiene un fuerte impacto sobre su estabilidad física (por ejemplo; separación gravitacional, floculación, coalescencia y la maduración de Ostwald) y sus propiedades ópticas (por

ejemplo, la transparencia y color; McClements, 2005).

Típicamente, producir una emulsión que tenga una distribución monomodal estrecha, proporciona estabilidad a largo plazo.

4.3.4. Carga de las gotas

Las gotas en la mayoría de las emulsiones tienen una carga eléctrica debido a la adsorción de especies iónicas a sus superficies, por ejemplo; proteínas, polisacáridos iónicos, tensoactivos iónicos, fosfolípidos, ácidos grasos, y algunos pequeños iones (McClements, 2005). Las características eléctricas de una superficie de gota dependen del tipo, concentración y organización de las especies ionizadas presentes, así como la composición iónica y las propiedades físicas de la fase acuosa circundante. Las características eléctricas de una gota en una emulsión se caracterizan usualmente en términos de su densidad de carga superficial, potencial eléctrico, y/o potencial zeta ($P\zeta$; Hunter, 1986).

$P\zeta$, se define como la distancia desde la superficie de las gotas por debajo del cual los contra-iones permanecen firmemente unidos a la gota cuando se mueve en un campo eléctrico. Prácticamente, el $P\zeta$ es una mejor representación de las características eléctricas de una gota de aceite, ya que representa la adsorción de contra-iones o especies iónicas a la superficie de la gota. La repulsión electrostática juega un papel importante en la determinación de estabilidad de los agregados de gotas de aceite recubiertas por emulsificantes cargadas que sólo forman capas delgadas que generan repulsión estérica de corto plazo, tales como proteínas globulares y tensoactivos iónicos. Por otro lado, la repulsión electrostática es menos importante en sistemas en los que las gotas de aceite son recubiertas

por emulsionantes que forman capas interfaciales gruesas que generan repulsión estérica a largo plazo, tales como polisacáridos (goma arábiga y almidones modificados).

4.3.5. Interacciones coloidales

Las interacciones coloidales atractivas y repulsivas, que se dan entre las gotas de aceite de las emulsiones determinan su estabilidad a la floculación y coalescencia, que a su vez influye en su estabilidad en la formación de cremado y reología (Friberg *et al.*, 2004; McClements, 2005).

Las interacciones coloidales entre dos gotas de aceite pueden ser descritos en términos de un potencial de interacción, que es la energía necesaria para conseguir que dos gotas a una distancia aparten una separación de superficie a superficie. Generalmente el potencial de la interacción se compone de las contribuciones de los distintos tipos de interacciones, siendo las más importante las de van der Waals, estérica, electrostática, agotamiento e interacciones hidrofóbicas (McClements, 2005; Israelachvili, 2011). Estas interacciones individuales varían en su signo (atracción o de repulsión), magnitud (débil a fuerte) y rango (corto a largo). Cada una de las interacciones individuales por lo general tiene una dependencia simple en la separación de superficie a superficie, pero la suma de las interacciones puede exhibir una dependencia más compleja.

4.3.6. Reología

Las propiedades reológicas de las emulsiones son un factor importante para determinar su fabricación y utilización.

Las características de flujo de emulsiones están influenciadas por diversas

fuerzas de interacción que se producen en el sistema durante la sedimentación o formación de crema, floculación, coalescencia y la maduración de Ostwald. Varios factores afectan la reología de la emulsión tal como fracción de volumen, viscosidad de la fase dispersa y de la continua, composición química (polaridad, pH), naturaleza y concentración de electrolitos y reología interfacial (Tadros, 1994). Hay numerosos métodos disponibles para investigar las propiedades de flujo de emulsión. Es posible llevar a cabo experimentos de flujo, de arrastre, dinámicos y oscilatorios.

En mediciones oscilatorias, un material viscoelástico es sometida a una tensión que varía sinusoidalmente (o estrés). La respuesta al estrés (tensión, respectivamente) se monitorea. A partir de estas mediciones, es posible determinar los parámetros viscoelásticos de una emulsión tales como el módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdida (G''). El módulo de almacenamiento representa la energía almacenada y la elasticidad en la emulsión, y el módulo de pérdida la energía disipada en el flujo viscoso (Tadros, 1994). Dependiendo de sus propiedades, las emulsiones pueden mantener la fluidez necesaria para su transporte, distribución o exhibir un comportamiento de flujo a bajo esfuerzo cortante.

A partir de la variación de los diferentes parámetros reológicos, es posible inferir la estabilidad de las emulsiones, su textura, inyectabilidad, y posibles condiciones para aplicaciones futuras (Tadros, 1994).

4.4. Mecanismos físicos de desestabilización de emulsiones

Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables y suelen presentar uno o varios mecanismos de desestabilización a la vez, incluyendo separación gravitatoria, floculación, coalescencia y maduración

de Ostwald (Friberg *et al.*, 2004; McClements, 2005). Todos estos mecanismos de inestabilidad conducen a un cambio en la organización estructural de los componentes del sistema. En la Figura 1 se muestran éstos mecanismos.

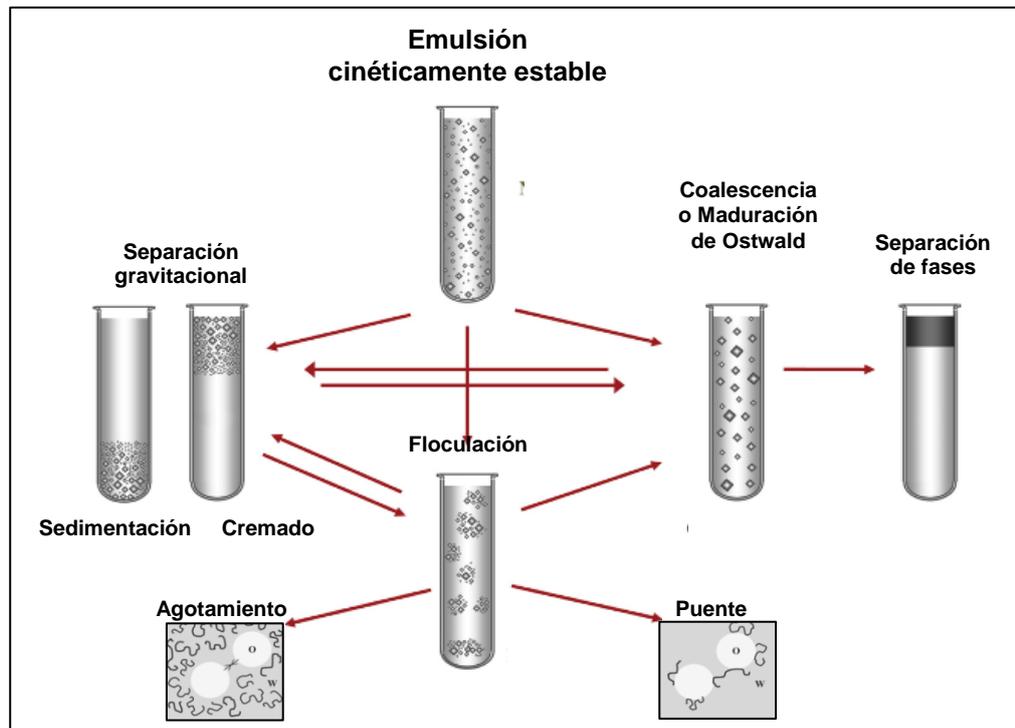


Figura 1. Mecanismos físicos de inestabilidad de una emulsión (McClements y Rao, 2011).

4.4.1. Separación gravitacional

Es una de las formas más comunes de la inestabilidad física en emulsiones y puede llevarse a cabo por medio de la formación de crema (cremado) o sedimentación dependiendo de las densidades relativas de las gotas de aceite y la fase dispersante. Se puede inhibir o prevenir la separación gravitacional por medio de tres enfoques: la primera es haciendo coincidir la densidad de las fases dispersas (aceite) y continuas (acuosa); en segundo lugar, por la reducción del tamaño de las gotas en la emulsión, ya que la velocidad de formación de crema es proporcional al tamaño de las gotas al cuadrado (ley de Stoke). Si las gotas son lo suficientemente pequeñas,

entonces los efectos de movimiento browniano dominaran y el sistema se mantendrá estable a la formación de crema o sedimentación; en tercer lugar, por el aumento de la viscosidad de la fase acuosa, por ejemplo, mediante la adición de agentes espesantes o gelificantes. Este enfoque no siempre puede ser viable, ya que influirá también en la textura y sensación en la boca del producto final (Sonneville-Aubrun *et al.*, 2004; Piorkowski y McClements, 2013).

4.4.2. Agregación de gotas

La tendencia para que ocurra agregación de gotas en una emulsión depende del equilibrio de fuerzas atractivas y repulsivas que operan entre las gotas y de las propiedades físico-químicas de las fases dispersa, continua e interfacial (índice de refracción, pH, fuerza iónica, presión osmótica, temperatura, etc.). Las interacciones de van der Waals tienen fuerzas atractivas; mientras que las interacciones estéricas y electrostáticas son generalmente de fuerza repulsiva. En este sentido las interacciones de van der Waals van operar en todos los tipos de gotas y ocurrirá una agregación si no hay fuerzas de repulsión opuestas; para contrarrestar esto, se pueden incorporar emulsificantes (polisacáridos y tensoactivos no iónicos con grandes grupos hidrófilos) que pueden generar una repulsión estérica suficientemente fuerte, estas fuerzas repulsivas superaran a las fuerzas atractivas de van der Waals y con ello se puede estabilizar el sistema frente a la agregación (Piorkowski y McClements, 2013). Las dos formas principales de agregación en emulsiones son la floculación y la coalescencia.

4.4.2.1. Floculación

Es el proceso mediante el cual dos o más gotas se unen para formar un agregado en el que las gotas conservan su integridad individual.

La floculación es generalmente perjudicial para la calidad de la emulsión debido a que acelera la velocidad de la separación gravitatoria reduciendo así su vida útil. También puede causar un aumento en la viscosidad de la emulsión y puede incluso conducir a la formación de un gel (McClements, 2005)

La floculación se puede producir en las emulsiones a través de una variedad de diferentes procesos que aumentan las fuerzas de atracción o disminuyen las fuerzas de repulsión que operan entre las gotas, los mecanismos más comunes que se dan en la floculación se presentan a continuación.

Agotamiento por atracción. La presencia de no-adsorción en entidades coloidales en la fase continua de una emulsión, tales como biopolímeros o micelas de tensoactivos, generan un aumento en la fuerza de atracción entre las gotas debido a un efecto osmótico asociado con la exclusión de las entidades coloidales de una estrecha región que rodea a cada gota (Israelachvili, 2011). Esta fuerza atractiva aumenta a medida que la concentración de entidades coloidales incrementa, hasta que finalmente se hace lo suficientemente grande como para superar las interacciones repulsivas entre las gotas y floclula. Este tipo de agregación de las gotas se conoce normalmente como floculación de agotamiento.

Formación de puentes de biopolímeros. Muchos tipos de biopolímero promueven la floculación mediante la formación de puentes entre dos o más

gotas. Los biopolímeros pueden adsorberse ya sea directamente a las superficies desnudas de las gotas de aceite o de las moléculas adsorbidas de emulsionantes que forman la capa interfacial. Para ser capaz de unirse a las gotas debe haber una fuerte interacción atractiva entre los segmentos de los biopolímeros y la superficie de las gotas. Por ejemplo, un biopolímero con carga positiva (quitosano) puede adsorberse a la superficie de dos gotas de la emulsión cargados negativamente haciendo que floculen (Ogawa *et al.*, 2003) o un biopolímero con carga negativa (pectina, carragenina o xantano) pueden adsorberse a la superficie de dos gotas cargadas positivamente haciendo que floculen (Dickinson, 2003; Guzey y McClements, 2005).

4.4.2. Coalescencia

Es el proceso mediante el cual dos o más gotas se fusionan entre sí para formar una gota mayor. La coalescencia provoca en las gotas de emulsión, cremado o sedimentación aumentando más rápido su tamaño (Lobo y Svereika, 2003).

La susceptibilidad de una emulsión a coalescencia es altamente dependiente de la naturaleza del emulsionante utilizado para estabilizar el sistema, ya que este mecanismo de inestabilidad implica la fusión de dos o más gotas. En general, la susceptibilidad de las gotas de aceite a la coalescencia se determina por la naturaleza de las fuerzas que actúan entre las gotas (es decir, fuerzas gravitatorias, coloidales, hidrodinámicas y mecánicas) y la resistencia de la capa interfacial a la ruptura. La estabilidad de las emulsiones a coalescencia se puede mejorar mediante la selección de un emulsionante apropiado.

4.4.3. Maduración de Ostwald

Esta susceptibilidad está determinada principalmente por la solubilidad de la fase oleosa en la fase acuosa: cuanto mayor es la solubilidad, más inestable la emulsión. Fases oleosas con muy baja solubilidad en agua no presentan este fenómeno, pero las fases oleosas con alta solubilidad en agua pueden ser muy inestables. Mecánicamente, la maduración de Ostwald es el proceso por el cual el tamaño de las gotas de aceite en una emulsión de aceite-en-agua aumenta con el tiempo debido a la difusión de moléculas de aceite desde gotas pequeñas a grandes a través de la intervención de la fase acuosa (Kabalnov, 2001; Chebil *et al.*, 2013).

La presencia de este gradiente de concentración significa que las moléculas de aceite tienden a moverse de la zona de gotas más pequeñas a la de gotas más grandes. Esto conduce a un aumento en el tamaño medio de las gotas con el tiempo, pero para impedir este fenómeno las proteínas y agentes tensoactivos iónicos (emulsificantes que forman interfases altamente cargados) pueden generar una fuerte repulsión electrostática entre las gotas que impidan este fenómeno, sin embargo, estos emulsificantes pueden ser propensos a la inestabilidad cuando se cambia el pH o la fuerza iónica.

4.5. Agentes que propician la estabilidad en las nanoemulsiones

4.5.1. Emulsificantes

Muchos de los emulsionantes utilizados en aplicaciones alimentarias son agentes tensoactivos de pequeñas moléculas sintéticas debido a su bajo costo y alta eficiencia (Kralova y Sjoblom, 2009). En general, los

tensoactivos de moléculas pequeñas consisten en una cabeza (grupo polar) y una cola (grupo no polar). El grupo de cabeza puede ser no iónico, aniónico o catiónico, mientras que el grupo de cola puede variar en el número, la longitud y grado de insaturación de las cadenas (Kralova y Sjoblom, 2009; McClements, 2005). Muchos tensoactivos se pueden utilizar para la fabricación de emulsiones usando enfoques de alta o baja energía.

Los tensoactivos sintéticos son capaces de estabilizar emulsiones en concentraciones más bajas que los biopolímeros anfifílicos. Algunos tensoactivos sintéticos que pueden ser utilizados en la elaboración de emulsiones son: Tweens (conocidos comercialmente como polisorbatos) son tensoactivos no iónicos sintéticos que consisten en un grupo de ácido graso no polar esterificado a un grupo de sorbitán polioxietileno polar. La naturaleza de las cadenas de ácidos grasos y polioxietileno determina la nomenclatura y las propiedades funcionales del tensioactivo. Tween 20 (monolaurato), Tween 40 (monopalmitato), Tween 60 (monoestearato) y Tween 80 (monooleato) son moléculas hidrofílicas con valores relativamente altos de HLB (14.9 - 16) (McClements, 2005). Ellos son por lo tanto predominantemente solubles en agua, formar micelas en soluciones acuosas, y estabilizan emulsiones de aceite-en-agua.

Existe un creciente interés dentro de la industria alimentaria en la sustitución de ingredientes sintéticos con alternativas naturales a fin de crear productos más saludables para el consumidor (Piorkowski y McClements, 2013).

Algunos emulsificantes naturales son las proteínas de superficie activa, las cuales se pueden ser aisladas de diversas fuentes, incluyendo la leche, la carne, el pescado y las plantas, pero el más utilizado en la industria

alimentaria son los derivados de la leche de vaca: las proteínas de caseína y el lactosuero (Dickinson, 2010).

4.5.1.1. Mecanismo de acción. Los emulsificantes son moléculas de superficie que se utilizan en emulsiones para facilitar la ruptura de las gotas dentro del homogeneizador (formando de este modo gotas más pequeñas) y para prevenir el crecimiento de las gotas después de la formación (aumentando con ello la estabilidad a largo plazo; McClements, 2005; Stauffer, 1999). Durante la homogeneización, los emulsificantes se absorben a la interfaz aceite-agua, lo que conduce a una reducción en la tensión interfacial facilitando así la lejanía entre gotas. Una vez que se han adsorbido a la superficie de la gota, los emulsionantes impiden que exista coalescencia entre sí, pues forman una capa protectora alrededor de las gotas de aceite.

4.5.1.2. Factores que influyen en la selección. Dos de los factores más importantes a considerar cuando se selecciona un emulsionante apropiado para la formación de una nanoemulsión es su capacidad para producir gotas pequeñas durante la homogeneización y la cantidad mínima de emulsionante necesaria para formar un sistema estable (McClements, 2005).

Las características físicas más importantes de un emulsificante son: (a) la velocidad a la que se absorben a la interfase aceite-agua durante la homogeneización; (b) la cantidad que reducen la tensión interfacial después de la absorción y (c) la cantidad requerida para cubrir un área de la interfase (carga superficial). Típicamente, el tamaño de las gotas

producidas bajo condiciones estandarizadas tiende a disminuir con el aumento de la cinética de absorción, la disminución de la tensión interfacial, y la disminución de la superficie de carga.

Cuando se selecciona un emulsificante es importante establecer el conjunto de condiciones (por ejemplo, intervalo de pH, intervalo de temperatura, composición iónica y composición del disolvente).

Los emulsificantes pueden variar considerablemente en su capacidad para formar emulsiones estables bajo diferentes condiciones ambientales. Por ejemplo, muchas proteínas globulares forman emulsiones estables a bajas fuerzas iónicas y valores de pH lejos de su punto isoeléctrico, pero tienden a flocular a fuerzas iónicas elevadas o valores de pH cercanos a su punto isoeléctrico (McClements, 2005). Además, tienden a flocular cuando se calienta por encima de su temperatura de desnaturalización térmica debido a un aumento de la hidrofobicidad de la superficie de gotas.

Las emulsiones estabilizadas por algunos tipos de tensoactivos no iónicos también son inestables a temperaturas elevadas (Rao y McClements, 2010), en este caso debido a que la tasa de coalescencia de las gotas aumenta cuando el agente tensoactivo se acerca a su temperatura de inversión de fase (PIT).

Emulsiones estabilizadas por polisacáridos anfifílicos, tales como goma arábica y almidón modificado, tienden a tener una buena estabilidad a la agregación a través de una amplia gama de valores de pH, fuerzas iónicas y temperaturas (Chanamai y McClements, 2002; Charoen *et al.*, 2011; Qian *et al.*, 2011). Sin embargo, estos emulsificantes a menudo no son muy eficientes en la producción de gotas pequeñas, o tienen que ser utilizados en niveles altos. Las características de estabilidad de un emulsificante

particular, se determinan en gran parte por su influencia en las interacciones coloidales que operan entre las gotas de aceite (McClements, 2005).

4.5.2. Agentes espesantes

4.5.2.1. Mecanismo de acción. Los agentes espesantes son ingredientes que se añaden a las emulsiones para aumentar la viscosidad de la fase acuosa y por lo tanto, retardan el cremado y alteran la sensación en la boca del producto. Los agentes espesantes son generalmente biopolímeros hidrófilos que se disuelven en la fase acuosa y ocupan un volumen que es mucho más grande que el volumen de la cadena de polímero en sí (McClements, 2005). La eficacia de un agente espesante en el aumento de la viscosidad de una solución acuosa que es determinada en gran parte por sus características moleculares (por ejemplo, peso molecular, conformación y las interacciones).

La mayoría de los agentes espesantes utilizados en las emulsiones son: polisacáridos hidrófilos de cadena larga, tales como; goma de algarrobo, de xantana, pectina o carragenina. Cabe señalar que los agentes espesantes pueden realmente promover la inestabilidad de la emulsión en determinadas condiciones, debido a su capacidad para inducir la floculación-puente o el agotamiento.

4.5.2.2. Factores que influyen en la selección. Hay una serie de factores que deben ser considerados al seleccionar un agente espesante adecuado para su uso en nanoemulsiones. Es importante establecer la solución y las condiciones ambientales bajo las cuales debe funcionar el agente

espesante. Esto por lo general requiere el conocimiento de las propiedades físico-químicas de las moléculas del biopolímero involucrado, tales como: temperaturas, propiedades eléctricas (grupos de carga y valores de pKa), hidrofobicidad, la sensibilidad de iones y la estabilidad químico/enzimática (Burapapadh *et al.*, 2010); también las características eléctricas de las moléculas de biopolímeros utilizados (potencial ζ vs perfil de pH), ya que las interacciones electrostáticas influyen en la interacción de los ingrediente, estabilidad de la emulsión y sensación en la boca.

La carga eléctrica en biopolímeros depende de la naturaleza de los grupos iónicos a lo largo de la cadena, así como las condiciones de la solución (pH y la composición iónica). Algunos biopolímeros son neutrales (almidón, celulosa), algunos son aniónicos (alginato), algunos son catiónicos (quitosano), y algunos son anfóteros (gelatina). La magnitud de la carga eléctrica en biopolímeros iónicos depende del pH en relación con el valor pKa de los grupos iónicos.

4.6. Emulsiones estabilizadas con proteína

Las proteínas son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria para estabilizar diversos alimentos comerciales y productos de bebida.

Los recubrimientos interfaciales formados por las proteínas son por lo general relativamente delgados y eléctricamente cargados, y por lo tanto, el principal mecanismo de la prevención de floculación en las emulsiones estabilizadas por proteína es la repulsión electrostática (en lugar de repulsión estérica). Por consiguiente, las emulsiones estabilizadas con proteína son particularmente sensibles a los efectos del pH y fuerza iónica (Piorkowski y McClements, 2013), y tienden a flocular a valores de pH cerca

de sus puntos isoeléctricos o cuando la fuerza iónica excede de un cierto nivel (McClements, 2005; Dickinson, 2010).

Proteínas de superficie activa se pueden aislar de varias fuentes, incluida la leche, carne, pescado, y plantas, pero la más ampliamente utilizada en la industria alimentaria son los derivados de la leche bovina: las proteínas de caseína y suero de leche.

Otros métodos también han sido desarrollados para mejorar las propiedades emulsionantes de las proteínas, incluyendo hidrólisis limitada a péptidos, la modificación de la estructura de proteínas por medios químicos, medios físicos, enzimáticos o genéticos, y mezcla de las proteínas con otros ingredientes (Piorkowski y McClements, 2013).

Algunos emulsificantes utilizan una combinación de repulsión electrostática y estérica para estabilizar el sistema, este es el caso de las caseínas y proteínas de lactosuero (Piorkowski y McClements, 2013).

4.6.1. Proteínas del suero

Proteínas de suero de leche son una mezcla de β -lactalbúmina (18,300 g/mol), α -lactoglobulina (14,200 g/mol) y varias otras proteínas de menor importancia (inmunoglobulinas, albúmina de suero) que son menos flexibles que las caseínas.

Un número de diferentes ingredientes de proteína de suero de leche están disponibles para su uso en la industria alimentaria como emulsificantes, incluyendo concentrado de proteína de lactosuero, aislado de proteína de lacto suero, hidrolizado de proteína de lacto suero (WPC, WPI y WPH, respectivamente, por sus siglas en inglés) y las fracciones de proteínas altamente purificadas, tales como β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina.

WPC y WPI son comúnmente utilizados como emulsificantes en productos alimenticios y bebidas lácteas (Ramírez-Santiago *et al.*, 2012).

La proteína de suero contiene en realidad una mezcla de proteínas globulares: ~55 % β -lactoglobulina; ~24 % α -lactoalbúmina; ~15 % inmunoglobulinas y ~5 % albúmina de suero (McClements, 2005).

Las proteínas del lactosuero son aquellas que permanecen solubles después de la coagulación de la caseína a pH 4.6 durante la manufactura de queso (Khwaldia *et al.*, 2004). La temperatura de desnaturalización térmica de estas proteínas es de alrededor de 70–80 °C y por lo que las gotas son propensas a la agregación cuando se calienta por encima de esta temperatura (Kim *et al.*, 2002).

Representan el 20 % de las proteínas totales de la leche. Son proteínas de naturaleza globular y termosensibles. Se encuentran integradas por una mezcla de 5 grupos de proteínas incluyendo la α -lactoalbúminas, β -lactoglobulina, seroalbúmina, inmunoglobulinas y proteosomas-peptonas (Khwaldia *et al.*, 2004; Pérez y Krochta, 2001).

La β -lactoglobulina comprende aproximadamente el 57 % de las proteínas presentes en el lactosuero. Se encuentra compuesta por 162 aminoácidos y por arriba de 65 °C, la estructura globular de la β -lactoglobulina se abre y expone sus grupos sulfhidrilo e hidrofóbicos (Kahwaldia *et al.*, 2004).

La α -lactoalbúmina comprende el 19 % de las proteínas del lactosuero. Es una proteína globular que contiene 123 aminoácidos y 4 enlaces disulfuro. Esta proteína sufre cambios conformacionales a pH 4, relacionados con la pérdida de calcio. A pH 6.5 y a una temperatura de 62° C inicia su desdoblamiento, pero con enfriamiento, la molécula puede volver a su

estructura nativa siempre y cuando los enlaces disulfuro no hayan sido dañados por el calentamiento (Pérez y Krochta, 2001).

4.7. Emulsiones estabilizadas con polisacáridos

Los polisacáridos son conocidos por su retención de agua y propiedades espesantes debido a su carácter hidrofílico y de alto peso molecular.

Polisacáridos no adsorbentes no tienen o tienen limitada actividad superficial y mejoran la estabilidad de la emulsión por gelificación o la modificación de la viscosidad de la fase continua acuosa, lo que ralentiza el movimiento de gotas y los fenómenos de desestabilización (Paraskevopoulou *et al.*, 2004).

4.7.1. La pectina

La pectina es un polisacárido complejo extraído de las paredes celulares vegetales, cáscaras de cítricos, especialmente de manzanas y pulpas de remolacha azucarera. Su estructura se compone principalmente por unidades de ácido (1-4) α -D-galacturónico esterificado con unidades de metanol.

De acuerdo a su contenido en ésteres de metilo o el grado de esterificación (GE), las pectinas se dividen en: alto metoxilo (HM, GE > 50 %) o de bajo metoxilo (LM, GE < 50 %). El GE tiene un efecto decisivo sobre la solubilidad de la pectina y sus propiedades gelantes. Las propiedades de emulsificación de pectina se han atribuido principalmente a su contenido de proteínas y también a sus grupos acetilo (Leroux *et al.*, 2003; Siew y Williams, 2008). En efecto, la presencia de grupos acetilo en pectinas (4-5 %) aumenta la naturaleza hidrófoba del polisacárido.

Se han formulado películas comestibles a base de emulsiones utilizando pectinas comerciales, generalmente de importación (Murillo-Martínez *et al.*, 2011); sin embargo, existen escasas investigaciones sobre el aprovechamiento de pectinas obtenidas a partir de cultivos nacionales para la formulación de alimentos; este es el caso de las pectinas de tejocote.

4.8. Sistemas emulsionantes mixtos

Ha habido un creciente interés en el uso de sistemas emulsionantes mixtos con el objetivo de producir más ingredientes amigables con el ambiente. Un número de investigadores han demostrado que los complejos de proteína-polisacárido pueden tener mejores propiedades emulsionantes que si estos biopolímeros fueran utilizados solos (Guzey y McClements, 2006; Dickinson, 2011). Estos complejos pueden ser unidos ya sea por interacciones físicas o covalentes y se pueden formar ya sea antes o después de la homogeneización (McClements 2005). En la fase acuosa, la mezcla proteína-polisacárido puede exhibir una de las tres diferentes situaciones de equilibrio: (a) miscibilidad, (b) incompatibilidad termodinámica y, (c) coacervación compleja. Ocurre miscibilidad comúnmente a bajas concentraciones de biopolímero; la incompatibilidad termodinámica implica la separación de dos fases acuosas distintas dentro de la misma fase, una rica en proteína y la otra rica en hidrocoloide; en la coacervación compleja una fase es rica en los dos biopolímeros y la otra fase es baja en ambos. Estrictamente hablando, la coacervación compleja representa la mitad de una base de una fase separada (líquida) de mezcla de biopolímero que está fuertemente hidratada y osmóticamente “hinchada” por la retención de microiones (Grinberg y Tolstoguzov, 1997).

4.8.1. Emulsiones estabilizadas con proteína-polisacárido

La combinación en el mismo sistema, de las ventajas de las proteínas (adsorción rápida en comparación con polisacáridos) y polisacáridos (repulsión estérica o mejora de la viscosidad) para estabilizar emulsiones se ha estudiado cada vez más (Ramírez-Santiago *et al.*, 2012; Hernández-Marín *et al.*, 2013). En efecto, las proteínas y polisacáridos contribuyen tanto por sus propiedades emulsionante/estabilizantes así como para crear nuevas emulsiones con estabilidad y funcionalidad mejorada. El desarrollo de complejos activos de superficie de proteína-polisacárido se puede lograr ya sea por unión covalente o interacciones electrostáticas. En este último caso, es importante elegir sabiamente los polímeros y las condiciones físico-químicas de manera que la proteína y polisacárido tengan cargas opuestas.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

Para la formación de complejos solubles proteína-polisacárido, se utilizó hidrolizado de proteína de lactosuero (WPH; Hilmar™ 8390, 80 % de proteína en base seca, Hilmer Cheese Company, Hilmar, CA, EUA) y las siguientes pectinas: de tejocote de las accesiones 26 y 50 (PT₂₆, PT₅₀; grado de esterificación de 66.2 y 72.2 %, respectivamente Banco de Germoplasma de la Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Edo. de México, México) y pectina comercial (P_C; pectina cítrica de gelación rápida, CEDROSA®, grado de esterificación 74.2 %, Central de drogas S.A. de C.V., Naucalpan, Edo. de México, México). La fase oleosa de emulsiones aceite-en-agua (O/W) estuvo constituida por aceite de canola (O; Great Value, Wal-Mart, México, D.F.). Otros reactivos utilizados fueron, ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido de sodio (NaOH) grado analítico (J.T. Baker, Xalostoc, Edo. de México, México). En todos los experimentos se utilizó agua desionizada.

5.2. Extracción de pectinas de tejocote

Las pectinas de tejocote (Figura 2a) se obtuvieron por hidrólisis ácida de acuerdo a la metodología propuesta por Yapó, (2009a), con ligeras modificaciones. Brevemente, 100 g de pulpa de tejocote libre de semillas (Figura 2b), se combinaron con 1 000 mL de HCl 0.1 M; la mezcla resultante se calentó a 80 °C ± 1 por 60 min (Figura 2c), se dejó enfriar a 20 °C y se filtró (Figura 2d) con malla metálica. Al filtrado se le adicionó

etanol al 96 % v/v en una relación 1:1 (v/v) con el objeto de precipitar las pectinas, obteniéndose un gel, el cual se dejó reposar por 24 h a $5 \pm 1^\circ \text{C}$ (Figura 2e). El gel se filtró dos veces usando etanol al 70% v/v en una relación 1:1 (v/v) con el objeto de eliminar impurezas (Figura 2f); el excedente de alcohol fue eliminado por centrifugación a 8 000 rpm por 25 minutos a 20°C (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, AG, Hamburg, Alemania; Figura 2g) y el pellet resultante se separó del alcohol para su posterior purificación en membranas de 12,000 peso molecular de corte (Spectra/Por[®] Dialysis Membrane, CA, EUA) Las membranas conteniendo el pellet de pectina se sumergieron en recipientes de agua destilada durante 72 h; el agua de diálisis se cambió tres veces cada 24 h (Figura 2h). Las pectinas purificadas se secaron a $35 \pm 1^\circ \text{C}$, por 24 h en una estufa Wisconsin Oven (Wisconsin over distributors, Inc. East Troy. Model ULM 500, WI, EUA; Figura 2i) y se molieron en licuadora (Osterizer[®] Model. 4655, México, DF) hasta obtener un polvo fino (Figura 2j).

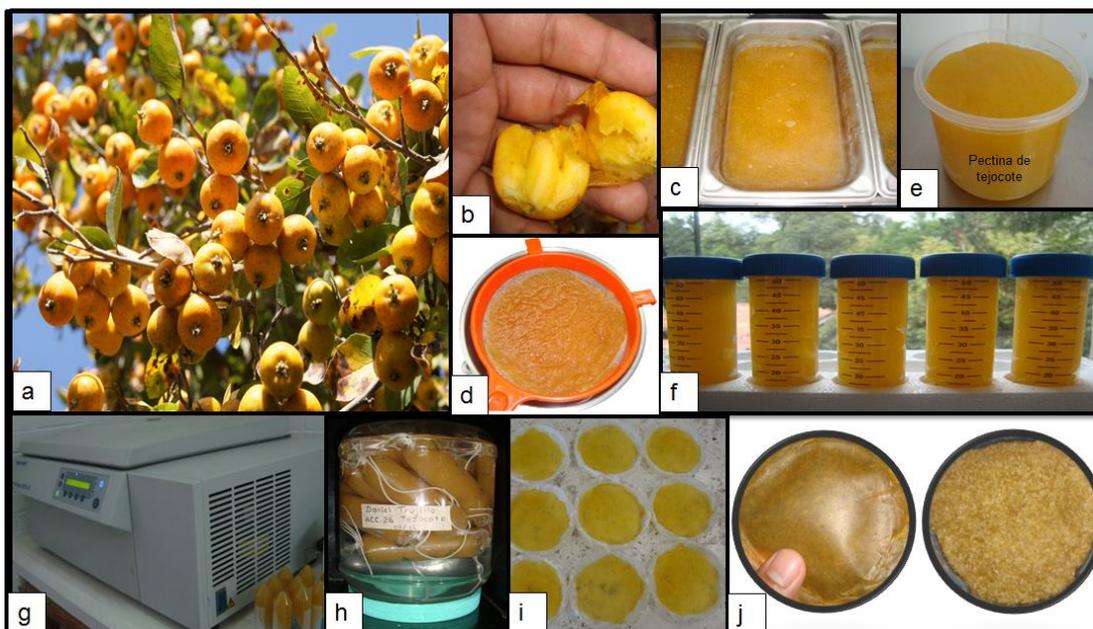


Figura 2. Proceso de extracción y obtención de pectina de tejocote.

5.3. Determinación del grado de esterificación de pectinas de tejocote

El grado de esterificación (GE) de P_C, PT₂₆ y PT₅₀ se determinó mediante el procedimiento de valoración de Schultz (1965), con modificaciones hechas por Singthong *et al.*, 2004 y Yapo 2009b, para lo cual una mezcla de 500 mg de pectina con 2 mL de etanol 96% (v/v), se disolvieron en 100 mL de agua destilada aplicando agitación (Hotplate/Stirrer 984TH7CHS, Thomas Scientific[®], NJ, EUA) durante 15 min. La disolución resultante se adicionó con 5 gotas de fenolftaleína y se tituló con NaOH 0.5 M; el gasto utilizado se registró como “Titulación A”. Después se agregaron 10 mL de NaOH al 0.5 M, aplicando agitación y dejando reposar por 15 min, se adicionó 10 mL de HCl 0.5 N agitando hasta que el color rosa desapareció y finalmente la disolución se tituló con NaOH 0.5 M; el gasto utilizado se registró como “Titulación B”

El grado de esterificación se calculó utilizando la ecuación 1 propuesta por Schultz, (1965):

$$\% \text{ GE} = \frac{\text{Titulación B}}{(\text{Titulación A} + \text{Titulación B})} * 100 \quad (1)$$

5.4. Contenido de proteína y humedad de pectinas

El contenido de proteína de las tres pectinas se determinó por el método Kjeldahl, utilizando un factor de conversión de 6.25; mientras que humedad por secado en termo-balanza (Ohaus MB23, Precision Moisture Analyzer IR Heating, Ohaus[®], NJ, EUA) (AOAC, 1995).

5.5. Formación de complejos solubles hidrolizado de proteína de lactosuero-pectina

5.5.1. Disoluciones base

Disoluciones de WPH (6 % p/v) y de las P_c, PT₂₆ y PT₅₀ (1 % p/v) se prepararon a temperatura ambiente (20 ± 2 °C), aplicando agitación durante 8 h (Hotplate/Stirrer 984TH7CHS, Thomas Scientific[®], NJ, EUA) y se refrigeraron (5 ± 1 °C) durante 12 h para asegurar la completa hidratación de los biopolímeros.

En trabajos previos se encontró que la mejor relación de Pr: Ps para la formación de nanoemulsiones estables era de 6:1 de WPH: PT₂₆; WPH: PT₅₀ y WPH: P_c, lo cual coincide con lo reportado por Perrechil y Cunha (2010), donde estabilizaron microemulsiones utilizando como emulsificante natural al caseinato de sodio (6 % p/v) y como agente espesante a la goma de algarrobo (1.5 % p/v)

Los valores de pH de las soluciones resultantes fueron: WPH (7.68), PT₂₆ (2.86), PT₅₀ (3.09) y P_c (2.67).

5.5.2. Determinación de la ventana de pH de interacción

Para determinar la ventana de pH de interacción electrostática entre WPH y las distintas pectinas, se midió el cambio en los valores del potencial zeta (ζ) de disoluciones base de estos biopolímeros en el rango de pH de 2.0 a 7.0, con variaciones de 0.5 unidades (Jiménez-Alvarado *et al.*, 2009; Hernández Marín *et al.*, 2013) usando un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, RU).

5.5.3. Determinación del pH óptimo para la formación de complejos solubles

Mediante mediciones turbidimétricas se determinó el valor de pH óptimo para la formación de complejos solubles (CS) entre WPH y las distintas pectinas (P_C , PT_{26} y PT_{50}), al usar una relación en peso WPH: pectinas de 6:1, respectivamente. La metodología seguida fue acorde a la propuesta por Ramírez-Santiago *et al.* (2012), con ligeras modificaciones: (1) se prepararon mezclas WPH: P_C , WPH: PT_{26} y WPH: PT_{50} , conteniendo 7 % p/v de biopolímeros totales, de los cuales 1 % p/v correspondió a la pectina en particular y 6 % p/v al WPH; (2) el pH de las mezclas se ajustó a valores de 2.0, 3.0, 3.25, 3.5, 3.75, 4.0, 4.25, 4.5, 4.75, 5.0, 5.25, 5.5 y 6.0 (pH-metro HANNA®, HI-221, Hanna Instruments Inc, Woonseket, RI, EUA.), utilizando HCl 0.1N o NaOH 0.1N; (3) las mezclas se agitaron suavemente durante 30 min y dejaron en reposo durante 48 h a temperatura ambiente para permitir que alcanzaran la fase de equilibrio; (4) los complejos solubles formados se separaron de aquellos insolubles (coacervados) mediante centrifugación a 3000 rpm durante 15 min a 20 °C (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, AG, Hamburg, Alemania) y (5) se midió la absorbancia de los sobrenadantes conteniendo los CS a una longitud de onda de 400 nm (espectrofotómetro UV, Spectrophotometer CS- 200PC® Globe™, 340- 1000 nm, Spectronics Instruments Inc., Rochester, NY, EUA).

5.6. Variaciones y método de preparación de las emulsiones

5.6.1. Variaciones.

Se prepararon 18 emulsiones, las cuales variaron en el tipo de pectina (P_C , PT_{26} y PT_{50}) usada para la formación del CS utilizado como agente

emulsificante/estabilizante y el diámetro volumétrico-superficial medio de gota ($d_{3,2}$): ~ 4000, 3000 y 2500 (microemulsiones) y ~200, 100 y 30 nm (nanoemulsiones). Las emulsiones se codificaron como $E_{x,y}$; donde x = tipo de pectina, mientras que y = valor aproximado de $d_{3,2}$. Los complejos solubles se codificaron como $CS_{x,y}$; donde x = WPH, mientras que y = el tipo de pectina.

5.6.2. Método de preparación

La fase oleosa (O) de las emulsiones aceite-en-agua constituyó una fracción gravimétrica (Φ) de 0.1. La fase acuosa (W) contuvo los distintos CS dispersos en agua. Para preparar las fases continuas se partió de mezclas WPH: PT₂₆, WPH: PT₅₀ y WPH: P_C, conteniendo 7 % (p/v) de biopolímeros totales (6 % p/v de WPH y 1 % p/v de pectina), a las cuales se ajustó su pH al valor determinado como aquel en el que ocurre la máxima formación de CS. Las mezclas se dejaron reposar durante 48 h a temperatura ambiente para que la formación de CS alcanzara el equilibrio.

El método general usado para preparar las emulsiones se basó en lo propuesto por Hernández-Jaimes *et al.* (2013) y Kaltsa *et al.* (2013) con modificaciones. Las microemulsiones se prepararon incorporando la fase O gota a gota a las distintas fases continuas usando un homogeneizador (Ultra-Turrax® T50 basic IKA Works, Inc. Wilmington, EUA). Para la obtención de los rangos de $d_{3,2}$ aproximados establecidos para las microemulsiones, durante su preparación se variaron las condiciones de operación del homogeneizador (rpm: 5200 a 8800 rpm; tiempo de homogeneización: 2 a 10 min). El $d_{3,2}$ de las microemulsiones recién preparadas se verificó usando un equipo Malvern Mastersizer 3000 (Malvern Instruments, Ltd.,

Worcestershire, RU), estableciendo un índice de refracción de 1.334 para la fase O (determinado previamente).

Para la preparación de las nanoemulsiones se partió de microemulsiones con gotas presentando un valor $d_{3,2}$ de ~ 2500 nm, preparadas como se describió. Las microemulsiones se sometieron a un número variable de ciclos de sonicación (Ultrasonic processor, Model VCX 130PB 500 y 750 W, 20 kHz. Newtown, CT, EUA) utilizando una punta de 8 mm de diámetro. Cada ciclo de sonicación consistió en la aplicación de amplitudes que variaron de 40 a 70 %, a una frecuencia de 20 kHz, con una duración de 2 min. La amplitud y el número de ciclos aplicados dependió del $d_{3,2}$ a obtener en las nanoemulsiones. Entre cada ciclo de sonicación se permitió un reposo de 4 min. El diámetro hidrodinámico (d_h) de gota de las nanoemulsiones recién preparadas se determinó con un equipo Zetasizer (Modelo Nano-ZS2000 Malvern Instruments Ltd. Malvern, Worcestershire, RU). Muestras diluidas (1:10) de las nanoemulsiones (para evitar errores debidos a la aglomeración de gotas y disminuir la polidispersidad) se colocaron en el equipo y se dejaron en reposo durante 120 s antes de la medición de su tamaño de gota. A partir de los valores de d_h obtenidos, se calcularon los valores $d_{3,2}$ de las gotas de aceite de las nanoemulsiones utilizando la ecuación 2 propuesta por propuesta por Thomas, (1986).

$$d_{3,2} = d_h * (1 + IP)^2 \quad (2)$$

Donde: IP es el índice de polidispersidad, determinado durante la medición del tamaño de gota.

Durante el proceso de elaboración de las emulsiones, la temperatura se mantuvo debajo de 20° C, mediante un baño de hielo.

5.7. Caracterización de las emulsiones

5.7.1. Estabilidad de las emulsiones con el tiempo de almacenamiento

La estabilidad de las emulsiones se determinó mediante la evaluación de variaciones en su tamaño de gota, determinado como se describió en la sección 5.6.2, durante su almacenamiento por 35 d a 5 ± 1 °C.

5.7.2. Propiedades reológicas

El comportamiento reológico de las $E_{x,y}$ y de los $CS_{x,y}$, se determinó después de un día de preparación, aplicando pruebas oscilatorias (barridos de amplitud y de frecuencia) y dinámicas (curvas de flujo), en un reómetro Physica MCR 301 (Anton Paar, Messtechnik, Stuttgart, Alemania), usando una geometría de cilindros concéntricos (diámetro interno= 14 mm y diámetro externo= 15 mm). Para todas las mediciones, muestras de ~ 3.7 mL de $E_{x,y}$ y de los $CS_{x,y}$, se colocaron en el sistema de medición, se dejaron reposar por 5 min para la recuperación de su estructura y equilibrio de su temperatura a 25° C (Physica TEK 150P).

Las $E_{x,y}$ y los $CS_{x,y}$ se sometieron a barridos de amplitud en un rango de deformación de 0.01 a 100 % a una frecuencia de 1 Hz, para determinar la zona viscoelástica lineal (ZVL), en la cual las propiedades reológicas no son dependientes del esfuerzo o de la deformación. Posteriormente, las $E_{x,y}$ y los $CS_{x,y}$ se sometieron a barridos de frecuencia aplicando una deformación de 0.3 % para las $E_{x,y}$ y 0.2 % para los $CS_{x,y}$ (correspondientes ambas a la ZVL), aplicando un rango de frecuencia de 0.01 a 100 Hz. Mediante el software del equipo (Rheoplus/32 V2.62) se obtuvieron los valores de módulo de almacenamiento (G'), módulo de pérdida (G''), y a partir de estos se calculó el valor del factor de cedencia ($\tan \delta = G''/G'$).

Curvas de flujo de las $E_{x,y}$ y de los $CS_{x,y}$ se obtuvieron aplicando tasas de corte de 10^{-3} a 10^3 s^{-1} . Los datos de las curvas viscosidad aparente-tasa de corte resultantes, se fijaron usando el software del reómetro a los modelos reológicos de Carreau, Casson, Cross, Herschel–Bulkley y Ellis (Steffe, 1996) que describen el comportamiento independiente del tiempo de fluidos.

5.8. Análisis de datos

Todos los experimentos y las mediciones de cada uno de ellos se realizaron por triplicado, usando un diseño completamente al azar. Los datos de tamaño de gota y aquellos de los parámetros reológicos se sometieron a análisis de varianza de clasificación simple y cuando fue adecuado a análisis de comparación de medias de Tukey. Análisis de varianza multifactorial se llevó a cabo para determinar cuáles factores, el $d_{3,2}$ o el tipo de pectina, tuvieron efecto significativo sobre las propiedades de las emulsiones. El análisis de datos se realizó usando el paquete estadístico Statgraphics Plus software (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc., Cambridge, MA, EUA).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Rendimiento, grado de esterificación y contenido de proteína de las pectinas

La obtención de micro y nanoemulsiones, depende de muchos factores tales como las condiciones de homogeneización, así como de las características fisicoquímicas de la fase dispersa y la fase continua; es por ello que se deben de elegir correctamente los materiales formadores para este sistema; en este sentido se optó por dos biopolímeros; hidrolizado de proteína de lactosuero y pectinas, estas últimas provenientes de tejocote de las accesiones 26 y 50, y cítrica (comercial), algunas características fisicoquímicas se presentan el en Cuadro 1.

Cuadro1. Rendimiento, grado de esterificación y contenido de proteína de las pectinas.

Tipo de pectina	GE (%)	Contenido de proteína (%)	Rendimiento (g/100 de pulpa)
P _C	74.2 ± 0.2 ^c	2.6 ± 0.1 ^c	-
PT ₂₆	66.2 ± 0.6 ^a	1.8 ± 0.0 ^a	4.6 ± 0.4 ^a
PT ₅₀	72.2 ± 0.0 ^b	3.6 ± 0.1 ^b	5.7 ± 0.9 ^a

P_C= pectina cítrica; PT₂₆= pectina de la accesión 26 de tejocote; PT₅₀= pectina de la accesión 50 de tejocote; GE= grado de esterificación.

Superíndices distintos en la misma columna indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$).

En el cuadro 1, se presentan los valores de grado de esterificación (GE), contenido de proteína y rendimiento de las pectinas usadas en este estudio, pudiendo observarse que los parámetros de GE y contenido de proteína difirieron ($p \leq 0.05$), dependiendo del origen de la pectina, sin embargo, el rendimiento obtenido no fue estadísticamente significativo. Los valores de GE de las pectinas variaron de la siguiente manera: $PT_{26} < PT_{50} < P_C$. Estos resultados muestran que los GE de las pectinas de tejocote difirieron entre sí y fueron menores que aquel de la P_C ; sin embargo, todas las pectinas mostraron valores de GE mayores a 50 %, por lo que pueden ser clasificadas como de alto metoxilo. Lo anterior, indica que más del 50 % de los grupos carboxílicos de las tres pectinas se encontraron esterificados con grupos metoxilo (Yapo, 2009b). Se ha informado que la presencia de grupos metoxilo puede mejorar la naturaleza hidrófoba de las moléculas de pectina, dándole un carácter superficial activo, con potencial para actuar como agente interfacial en la formación y estabilización de emulsiones aceite-en-agua (Burapapadh *et al.*, 2010). Autores como Vivar-Vera *et al.* (2007) han informado GE para el género *Crataegus* de 92 ± 0.06 % los cuales difieren a los encontrados en este estudio, probablemente atribuido a la compleja variabilidad biológica, genética y taxonómica del género *Crataegus* en América del norte (Nieto-Ángel *et al.*, 2009; Edwards *et al.*, 2012); Bagherian *et al.* (2011) informan para pectinas cítricas GE de 74.9 – 76.3 %, otras fuentes de pectina con alto metoxilo son frutos de *Passiflora edulis* en los cuales Yapo, (2009b) informa GE de 52–73 %. Los valores de contenido de proteína de las pectinas variaron como sigue: $PT_{26} < P_C < PT_{50}$. La proteína asociada a las pectinas les confiere cierto carácter

emulsificante, debido a que las proteínas son moléculas anfifílicas, poseen tanto porciones de cadena polares, como no polares. Esta característica permite a las proteínas adsorberse en interfases aceite-agua y reducir la tensión interfacial (Leroux *et al.*, 2003; Siew y Williams, 2008).

Con base en lo anterior, las proteínas y los polisacáridos son dos tipos de macromoléculas que juegan un papel importante en la formación y la estabilización de emulsiones aceite-en-agua (O/W). Ambas macromoléculas contribuyen a la estructura, textura y estabilidad de estos sistemas dispersos, debido a sus propiedades fisicoquímicas (Dickinson, 2009).

En cuanto al rendimiento de las pectinas de tejocote Vivar-Vera *et al.* (2007) encontró un rendimiento de pectinas de tejocote de 21 ± 2.5 g/ 100 g de fruto deshidratado; Bagherian *et al.* (2011) reporta rendimientos de pectinas cítricas de 19.6- 26.27 g/100 g para pectinas cítricas y finalmente Yapo, (2009b) informa un rendimiento de 6.8 ± 0.9 g/100 g de peso seco para *Passiflora edulis*. La humedad contenida en las pectinas utilizadas en este trabajo fue de 10.0 % para PT₂₆ y PT₅₀; mientras que de 8.0 % para P_C.

6.2. Formación de complejos solubles hidrolizado de proteína de lactosuero- pectina

6.2.1. Variación de los valores de potencial zeta (ζ) de los biopolímeros como función del pH

La presencia de interacciones de atracción proteína- polisacárido en interfases aceite-agua puede influir profundamente en la estabilidad de micro y nanoemulsiones (Jiménez-Alvarado *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011; Hernández-

Marín *et al.*, 2013), por lo que es importante determinar las características eléctricas de los biopolímeros utilizados en este trabajo. Para ello se realizó un barrido de pH vs ζ y se determinó el rango de pH en el que cada par pectina-hidrolizado de proteína de lactosuero (WPH) exhibieron la máxima diferencia estequiométrica entre sus cargas eléctricas de signo opuesto (Figura 3).

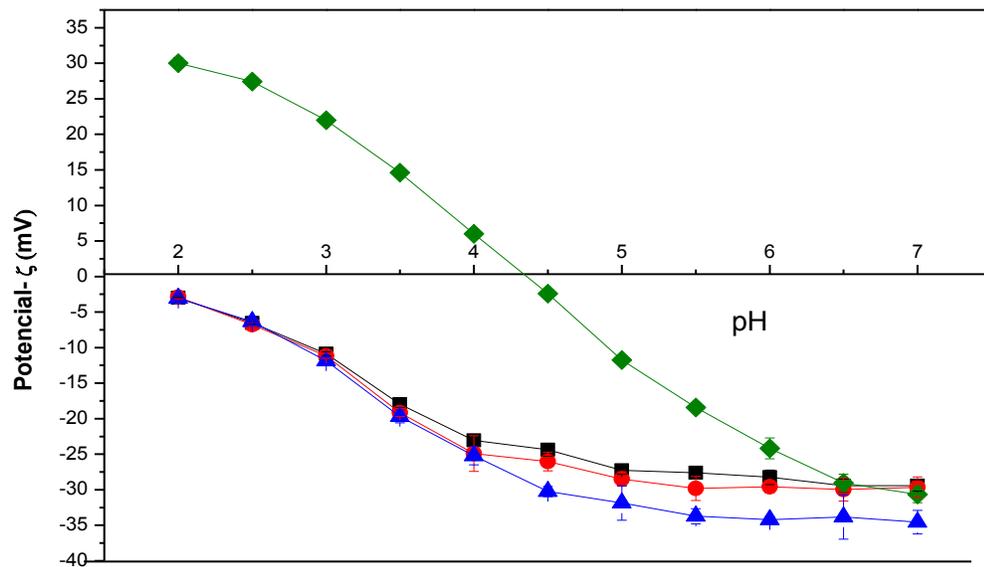


Figura 3. Variación del potencial zeta (ζ) como función del pH de disoluciones de WPH (6% p/v) y pectinas (1% p/v). WPH (◆), P_C (■), PT₂₆ (●) y PT₅₀ (▲).

Los valores de ζ para las disoluciones de pectinas fueron negativos en todo el intervalo de pH estudiado, debido a los bajos valores de pKa de sus grupos carboxilo (Espinosa-Andrews *et al.*, 2013). Los valores de ζ negativos presentados por las pectinas bajo estudio, fueron acordes con aquellos informados por Bengoechea *et al.* (2011) al estudiar la formación de complejos electrostáticos lactoferrina-pectina comercial de alto grado de metoxilo; así como con aquellos informados por Jones *et al.* (2010) al formar complejos

β -lactoglobulina- pectina de bajo y alto grado de metoxilo, para la preparación de nanopartículas.

Los valores de ζ de las pectinas bajo estudio variaron de la siguiente manera: para P_C de -3.0 ± 0.1 mV a pH= 2.0 hasta -29.4 ± 0.8 mV a pH= 7.0; para PT₂₆ de -2.9 ± 0.2 mV a pH= 2.0 hasta -29.6 ± 1.4 mV a pH= 7.0 y finalmente para PT₅₀ de -3.1 ± 0.4 mV a pH= 2.0 hasta -34.6 ± 1.7 mV a pH= 7.0. Incrementos en la magnitud de los valores negativos de ζ al aumentar el pH, reflejaron la conversión de los grupos carboxílicos (-COOH) presentes a bajos valores de pH, en grupos carboxilato (-COO⁻) conforme aumentó el pH. El valor de pH relacionado con la pendiente máxima de la curva de ζ de las soluciones de pectinas estuvo en un intervalo de pH= 3.0 a 4.0 (Figura 3). Jones *et al.* (2010), informaron que la pendiente en el perfil de ζ de pectinas de alto y bajo GE versus pH, correspondió aproximadamente con el pK_a de las soluciones del polisacárido, que es de alrededor de 3.2.

Para WPH, el ζ varió de 30.0 ± 0.75 mV a pH= 2,0 hasta -30.7 ± 1.2 mV a pH= 7,0. Un valor de ζ cero se produjo en el punto isoeléctrico (pI; pH de 4.27) de WPH. Los valores de ζ negativos que se produjeron a valores de pH > 4.27 se pueden atribuir a la ionización de los grupos carboxílicos (-COOH) en grupos carboxilatos (-COO⁻); mientras que los valores de ζ positivos a valores de pH < 4.27 son debidos a la protonación de los grupos amino (-NH₂) resultando en grupos amonio (-NH₃⁺). Esta tendencia concuerda con lo reportado por Jiménez-Alvarado *et al.* (2009); Hernández-Marín *et al.* (2013) usando concentrado de proteína de lacto suero; Jones *et al.* (2010); Jones *et al.* (2011) empleando β -lactoglobulina; Bengoechea *et al.* (2011) utilizando lactoferrina y

Hernández-Rodríguez *et al.* (2014) con aislado de proteína de lactosuero.

El pH del medio afectó fuertemente la densidad de carga de los biopolímeros estudiados, lo que repercute en consecuencia en la fuerza de acomplejamiento o interacción entre los mismos. La fuerza de interacción electrostática entre los polielectrolitos con cargas opuestas puede ser calculado como el producto del valor absoluto de ζ de ambas macromoléculas a diferentes valores de pH (de Kruif *et al.*, 2004). El intervalo de pH en el que los biopolímeros (WPH y pectinas) presentaron cargas eléctricas de signo opuesto, ocurrió entre $2.0 \leq \text{pH} < 4.25$ (Figura 3); aun cuando las pectinas presentaron carga negativa en todo el rango de pH estudiado, las moléculas de WPH mostraron carga positiva sólo a valores de pH menores a su pI. La presencia de cargas eléctricas de signo opuesto de máxima magnitud se presentó a un valor de pH de 3.25. A ese valor de pH, potencialmente ocurre la máxima interacción entre biopolímeros, causando la formación de complejos biopoliméricos solubles e insolubles (Espinosa-Andrews *et al.*, 2010; Klemmer *et al.*, 2012; Espinosa-Andrews *et al.*, 2013).

6.3. pH de máxima formación de complejos solubles hidrolizado de proteína de lactosuero-pectina

En la Figura 4 se presenta la variación en los valores de absorbancia de los complejos solubles formados entre WPH (6 % p/v) y las distintas pectinas (1 % p/v) como función de la longitud de onda, pudiendo observarse que las lecturas de absorbancia más elevadas se obtuvieron a una longitud de onda de 400 nm para todas las combinaciones WPH-pectinas. En contraste, a esta longitud de

onda, los biopolímeros individuales mostraron bajas lecturas de absorbancia (datos no mostrados). La turbidez de una disolución, medida como absorbancia, es un indicador de los sólidos disueltos presentes y es debida principalmente a la dispersión de la luz por estas partículas. Ha sido también usada como un indicador de la formación y disociación de complejos proteína- polisacárido (Ramírez-Santiago *et al.*, 2012; Hernández-Marín *et al.*, 2013; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2014). Con base en lo expuesto, una longitud de onda de 400 nm fue seleccionada para la determinación turbidimétrica del pH óptimo para la formación de CS WPH-pectinas (Figura 4). Esta longitud de onda concuerda con aquella informada por Ramírez-Santiago *et al.* (2012) como de máxima absorbancia para CS de aislado de proteína de lactosuero-pectina de bajo metoxilo y con aquella encontrada por Hernández-Marín *et al.* (2013) para CS de concentrado de proteína de lactosuero-carboximetilcelulosa.

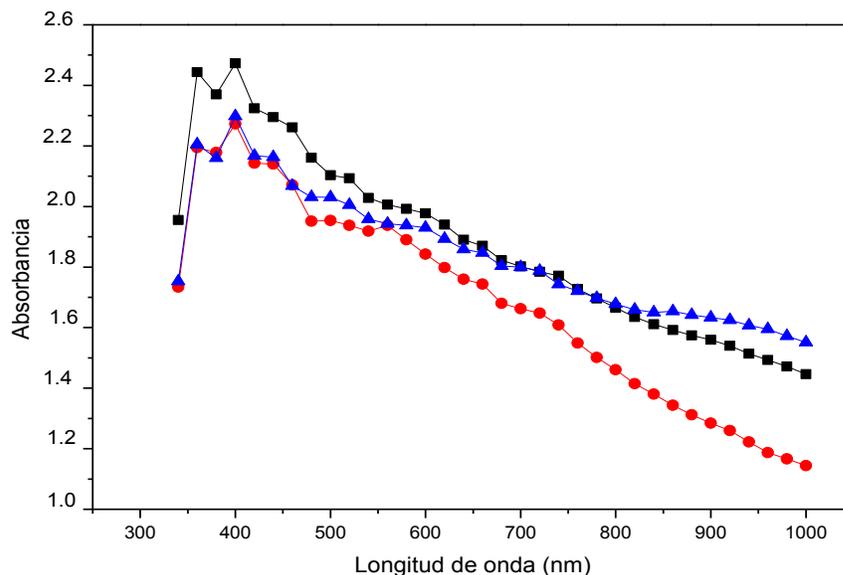


Figura 4. Variación de la absorbancia de los complejos solubles hidrolizado de proteína de lactosuero-pectinas como función de la longitud de onda. WPH: P_C (■), WPH: PT₂₆ (●) y WPH: PT₅₀ (▲).

Se ha informado que disoluciones acuosas de mezclas de proteína-polisacárido pueden exhibir una de las tres situaciones de equilibrio siguientes: (1) miscibilidad, (2) incompatibilidad termodinámica y (3) acomplejamiento. En esta última las interacciones atractivas entre los dos biopolímeros pueden llegar a ser evidentes en varias maneras: (a) formación de complejos soluble (CS), que se manifiesta por sí misma como soluciones turbias; (b) formación de un gel débil homogéneo, si las interacciones son débiles y (c) la precipitación de ambos biopolímeros, si las interacciones son fuertes (Walstra, 2003). El interés de este trabajo se centró en la formación de CS.

La Figura 5 muestra los perfiles de turbidez de los CS como función del pH. Todos los perfiles mostraron tendencias similares y se caracterizaron por tres regiones observadas de altos a bajos valores de pH de la siguiente manera:

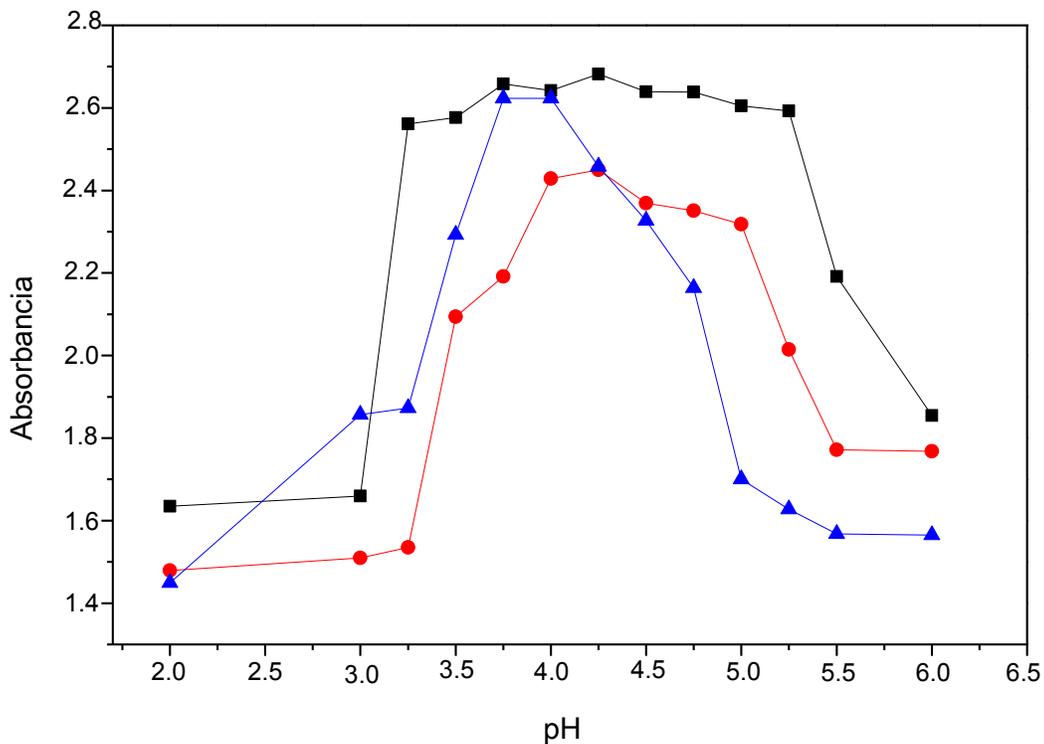


Figura 5. Absorbancia de mezclas de WPH (6% p/v): pectinas (1% p/v) en función del pH.

WPH: P_C (■), WPH: PT₂₆ (●) y WPH: PT₅₀ (▲).

Región A, en la cual a valores de pH relativamente elevados ($\text{pH} > 5.5$) se obtuvieron lecturas de absorbancia bajas, debido a la coexistencia de los biopolímeros individuales sin interactuar como resultado de la carga negativa de ambas. A estos valores de pH ambas macromoléculas presentaron carga negativa (Figura 5).

Región B, en la cual conforme los valores de pH disminuyeron de 5.5 hasta alrededor de 3.75, se observan incrementos en las lecturas de absorbancia hasta alcanzar un máximo, este último atribuido a la presencia de la máxima cantidad de CS. Esta región indica la unión de cadenas positivas del WPH a las cadenas negativas de las pectinas, formándose complejos biopoliméricos que permanecieron solubles, como resultado de la neutralización incompleta de los grupos de pectina cargados negativamente por grupos positivos de las cadenas de WPH (Park *et al.*, 1992). Las distintas combinaciones de WPH-pectinas presentaron máxima formación de CS en los siguientes rangos de pH: WPH: P_C (5.25 a 3.75), WPH: PT_{26} (4.25 a 4.0) y WPH: PT_{50} (4.0 a 3.75). De acuerdo a estos valores, se observa que la mezcla WPH: P_C , presentó una elevada formación de CS en un intervalo de pH relativamente amplio; mientras que las mezclas WPH: PT_{26} y WPH: PT_{50} mostraron un intervalo de pH más estrecho para una elevada formación de CS. A partir de los resultados mostrados en la Figura 5, se eligieron los valores de pH para cada mezcla WPH-pectinas correspondientes a la máxima absorbancia; relacionada esta última con la máxima formación de CS: WPH: P_C y WPH: PT_{26} ($\text{pH} = 4.25$) y WPH: PT_{50} ($\text{pH} = 4.0$).

Región C, en la cual al disminuir el pH a valores ≤ 3.5 para WPH: PT_{26} y WPH:

PT_{50} , y ≤ 4.0 para WPH: P_C , se observa una disminución pronunciada de las lecturas de absorbancia. Estos resultados indican la agregación progresiva de los CS, conforme se alcanza la neutralización completa de las cargas electrostáticas entre biopolímeros y la formación de complejos insolubles o coacervados complejos. La coacervación compleja de los biopolímeros, involucra la separación espontánea de dos fases, una rica en solvente y la otra reducida en solvente consistente de un co-precipitado de ambos biopolímeros (Dickinson, 1995).

Ru *et al.* (2012) mencionaron que el pH crítico en el que se produce la separación de fases cambia con la composición inicial de la proteína y el polisacárido y que cuando el pH disminuye a valores por debajo del pKa del polisacárido, coacervados de proteína- polisacárido pueden disociarse en complejos solubles o incluso en proteína individual no interactiva y moléculas de polisacárido, debido a las bajas cargas de la cadena del polisacárido y la fuerte repulsión entre las cargas positivas de las proteínas.

6.4. Condiciones de proceso para la obtención de micro y nanoemulsiones con tamaño de gota preestablecido

Las condiciones de proceso determinadas para la obtención de 18 emulsiones, nueve microemulsiones y nueve nanoemulsiones, así como sus tamaños de gota, expresados como diámetro volumétrico-superficial medio ($d_{3,2}$) se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Condiciones de obtención y diámetro volumétrico-superficial medio ($d_{3,2}$, nm) de micro y nanoemulsiones.

$d_{3,2}$ promedio (nm)	CS _{WPH, Pc}	CS _{WPH, PT26}	CS _{WPH, PT50}
4114.0 ± 130.2	5200 rpm, 2 min (3943.3 ± 25.2)	5200 rpm, 4 min + 7600 rpm, 2 min (4210.0 ± 26.5)	5200 rpm, 4 min + 7600 rpm, 2 min (4190.0 ± 17.3)
3022.2 ± 34.6	5200 rpm, 2 min + 7600 rpm, 4 min (3010.0 ± 10.0)	5200 rpm, 4 min + 7600 rpm, 2 min + 7600 rpm, 10 min (3053.3 ± 47.3)	5200 rpm, 4 min + 7600 rpm, 2 min + 7600 rpm, 10 min (3003.3 ± 15.3)
2598.9 ± 126.8	5200 rpm, 2 min + 7600 rpm, 4 min + 8800 rpm, 5 min (2473.3 ± 115.4)	5200 rpm, 4 min + 7600 rpm, 2 min + 7600 rpm, 10 min + 8800 rpm, 3 min (2590.0 ± 0.0)	5200 rpm, 4 min + 7600 rpm, 2 min + 7600 rpm, 10 min + 8800 rpm, 3 min (2733.3 ± 11.6)
203.2 ± 23.5	1 ciclo de 40 % amplitud, 2 min (213.5 ± 5.0)	1 ciclo de 40 % amplitud, 2 min + 1 ciclo de 70 % amplitud, 2 min (221.1 ± 10.0)	1 ciclo de 40 % amplitud, 2 min + 1 ciclo de 70 % amplitud, 2 min (173.5 ± 1.3)
102.7 ± 9.0	1 ciclo de 40 % amplitud, 2 min + 1 ciclo de 70 % amplitud, 2 min (112.5 ± 4.6)	1 ciclo de 40 % amplitud, 2 min + 1 ciclo de 70 % amplitud, 2 min + 3 ciclos de 70 % amplitud, 2 min (93.4 ± 0.5)	1 ciclo de 40 % amplitud, 2 min + 1 ciclo de 70 % amplitud, 2 min + 2 ciclos de 70 % amplitud, 2 min (101.9 ± 2.1)
37.7 ± 2.6	1 ciclo de 40 % amplitud, 2 min + 1 ciclo de 70 % amplitud, 2 min + 3 ciclos de 70 % amplitud, 2 min (35.4 ± 1.5)	1 ciclo de 40 % amplitud, 2 min + 1 ciclo de 70 % amplitud, 2 min + 3 ciclos de 70 % amplitud, 2 min + 2 ciclos de 70 % amplitud, 2 min (46.8 ± 1.4)	1 ciclo de 40 % amplitud, 2 min + 1 ciclo de 70 % amplitud, 2 min + 2 ciclos de 70 % amplitud, 2 min + 2 ciclos de 70 % amplitud, 2 min (37.2 ± 0.6)

CS_{WPH, Pc}: complejo soluble de hidrolizado de proteína de lactosuero- pectina cítrica; CS_{WPH, PT26}: complejo soluble de hidrolizado de proteína de lactosuero-pectina de tejocote accesión 26; CS_{WPH, PT50}: complejo soluble de hidrolizado de proteína de lactosuero- pectina de tejocote accesión 50. Valores en paréntesis se refieren al $d_{3,2}$ de cada emulsión.

Independientemente del CS usado para su formación y estabilización, se lograron obtener emulsiones con valores de $d_{3,2}$ acordes a aquellos preestablecidos, mediante el ajuste de las condiciones de proceso usadas para su preparación: tipo de equipo homogeneizador, velocidad y tiempo de homogeneización. Los valores medios de $d_{3,2}$ obtenidos para las variaciones de microemulsiones fueron: 4114 ± 130.2 (E_{4000}), 3022.2 ± 34.6 (E_{3000}) y 2598.9 ± 126.8 (E_{2500}) nm.

Para el caso de las nanoemulsiones, los valores de $d_{3,2}$ medios de las gotas de aceite obtenidos fueron: 203.2 ± 23.5 (E_{200}), 102.7 ± 9.0 (E_{100}) y 37.7 ± 2.6 (E_{30}) nm.

El tamaño de las gotas de aceite 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 gotas pequeñas y la coalescencia de estas últimas. Estos dos procesos se desarrollan concurrentemente y las velocidades relativas de ambos determinan el tamaño final de gota. Los agentes emulsificantes/estabilizantes tienen efectos sobre ambos procesos, mediante: (a) la reducción de la tensión superficial y la energía interfacial, promoviendo así la ruptura de la fase dispersa en pequeñas gotas y (b) la formación de una barrera contra la coalescencia; en este caso por una película biopolimérica interfacial constituida por los complejos WPH: pectinas, la cual impide el fenómeno de coalescencia cuando dos gotas colisionan (Lobo y Svereika, 2003).

Las condiciones necesarias para la preparación de las emulsiones variaron de acuerdo al tamaño de gota deseado y al tipo de pectina conformando los CS

usados como agentes emulsificantes/estabilizantes (Cuadro 2). Así, para obtener tamaños de gota menores, se requirió de aumentos en la velocidad y el tiempo de homogeneización. Se observó además que variaciones en el tipo de pectina acomplejada al WPH, involucraron diferencias en las condiciones de homogeneización necesarias para la obtención de un tamaño de gota en particular. En este sentido, el uso de CS incluyendo pectinas de tejocote ($CS_{WPH, PT26}$ y $CS_{WPH, PT50}$) como agentes emulsificantes y estabilizantes de las emulsiones, requirió de la aplicación de condiciones más severas de homogeneización para la obtención de un tamaño de gota en particular, en comparación con aquellas condiciones aplicadas al usar $CS_{WPH: PC}$. Por ejemplo, para obtener un $d_{3,2} \sim 4000$ nm usando $CS_{WPH: PC}$, fue suficiente la aplicación de un ciclo de homogeneización a 5200 rpm durante 2 min; mientras que para la obtención de ese mismo tamaño de gota en emulsiones formadas y estabilizadas con $CS_{WPH, PT26}$ y $CS_{WPH, PT50}$, se necesitaron dos ciclos de homogeneización, uno a 5200 rpm por 4 min y otro subsecuente a 7600 rpm durante 2 min. Las condiciones de homogeneización más severas requeridas cuando se utilizaron los $CS_{WPH, PT26}$ y $CS_{WPH, PT50}$, pueden ser atribuidas a la mayor viscosidad de estas fases acuosas, en comparación con aquella de las fases acuosas conteniendo $CS_{WPH: PC}$, ya que como lo han informado Wang *et al.* (2007) la viscosidad de pectinas de tejocote es de cuatro a seis veces superior en comparación de aquellas pectinas comerciales de limón y/o manzana.

De manera similar a lo observado durante la preparación de las microemulsiones, la aplicación de mayores amplitudes y tiempos de sonicación

rindieron nanoemulsiones con gotas de menor tamaño.

El uso de los $CS_{WPH, PT26}$ y $CS_{WPH, PT50}$, como agentes emulsificantes/estabilizantes también involucró la aplicación de condiciones más severas de homogeneización para la obtención de un tamaño de gota determinado. Sin embargo, a diferencia de lo observado durante la preparación de las microemulsiones, donde las condiciones de homogeneización para obtener valores de $d_{3,2}$ de ~4000, 3000 y 2500 nm fueron similares al usar indistintamente $CS_{WPH, PT26}$ y $CS_{WPH, PT50}$, en las nanoemulsiones no siempre se observó esta tendencia. En la mayoría de los casos, el uso de $CS_{WPH, PT26}$ requirió de la aplicación de un mayor número de ciclos de sonicación, en comparación con el uso del $CS_{WPH, PT50}$; además en general, los valores de $d_{3,2}$ de las gotas de las nanoemulsiones obtenidas con el $CS_{WPH, PT50}$ fueron menores que aquellas obtenidas con el $CS_{WPH, PT26}$. Estos resultados pueden explicarse con base en el mayor contenido de proteína asociado a la PT_{50} (3.6 %), en comparación con aquel asociado a la PT_{26} (1.8 %); efecto evidenciado al incrementarse el área superficial de las gotas de aceite en las nanoemulsiones. Se ha informado que el contenido de proteína asociada a la pectina desempeña un papel importante en la formación y la estabilidad de las emulsiones, dado su carácter anfifílico (Leroux *et al.*, 2003; Siew y Williams, 2008). El contenido de proteína asociada la PT_{50} pudo tener un efecto sinérgico con aquel presente en el WPH en relación a la capacidad de adsorción del CS_{PT50} en la interfase.

El contenido de proteína asociado a las pectinas no fue el único factor que determinó las condiciones de formación de las nanoemulsiones, también intervino la viscosidad de las fases acuosas conteniendo los CS; esta última

afectada predominantemente por el tipo de pectina acomplejada al WPH. Así, a pesar de que el contenido de proteína asociado a P_C (2.6 %) fue menor a aquel presente en la PT_{50} , se requirieron menos ciclos de sonicación para llegar al tamaño de gota deseado al utilizar el CS_{WPH, P_C} como agente emulsificantes/estabilizante, en comparación con aquellos requeridos cuando se usó el $CS_{WPH, PT_{50}}$. Lo anterior parece indicar que menores viscosidades de la fase acuosa favorecen la formación de las gotas de aceite de nanoemulsiones bajo condiciones de preparación menos severas (Wang *et al.*, 2007). Otro factor a considerar para el establecimiento de las condiciones de preparación de las emulsiones en general, lo constituye el grado de metoxilo de la pectina. Burapapadh *et al.* (2010), mencionaron que el grado de metoxilo influye en el tamaño de gota de nanoemulsiones, debido a que encontraron que pectinas de alto metoxilo brindan buenas propiedades a la emulsión en comparación con aquellas de bajo metoxilo; debido a la alta cantidad de moléculas hidrofóbicas (grupos éster de metilo, acetil y amida), que puede causar efecto emulsificante, proporcionando mayor estabilidad a la emulsión. Lo anterior coincide con lo encontrado en este estudio, debido a que el GE de las pectinas que contenían las fases acuosas variaron de la siguiente manera: $P_C > PT_{50} > PT_{26}$, por lo tanto, para la formación de nanoemulsiones con pectinas de mayor GE (P_C y PT_{50} ; 74.2 y 72.2 %, respectivamente) requirieron condiciones de preparación menos severas, de aquellas elaboradas con PT_{26} (GE= 66.2 %).

6.5. Estabilidad de micro y nanoemulsiones con el tiempo

La evaluación de la estabilidad de las micro y las nanoemulsiones durante 35

días a 5 ± 1 °C, se realizó mediante el análisis de la variación en los valores de $d_{3,2}$ de sus gotas (figuras. 6a y 6b).

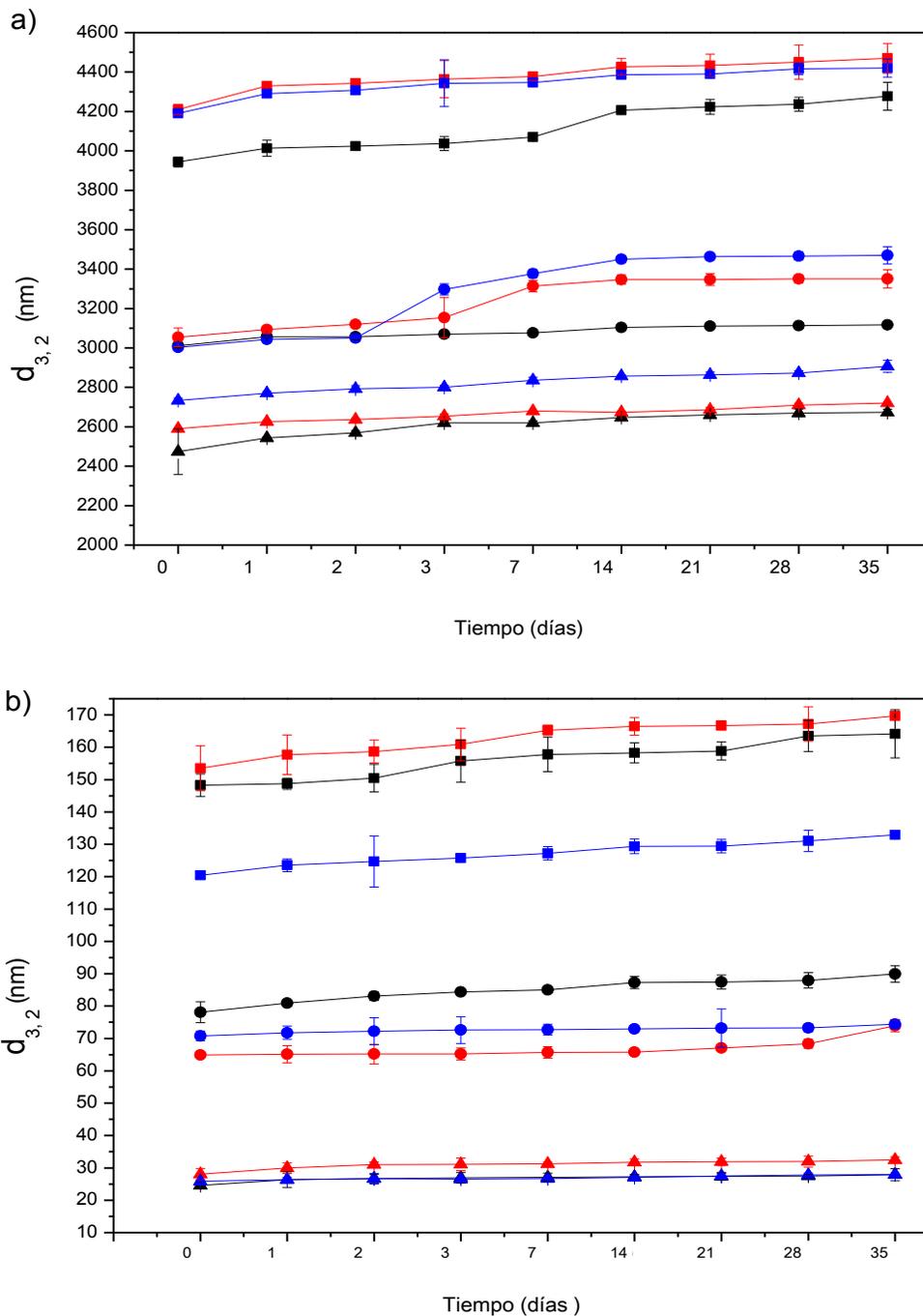


Figura 6. Variación del diámetro volumétrico-superficial de las gotas de aceite de las microemulsiones (a) y nanoemulsiones (b) durante su almacenamiento por 35 días a 5 ± 1 °C.

E_{PC}, (■), E_{PT26} (●) y E_{PT50} (▲).

Ambas, las micro y las nanoemulsiones mostraron ligeros aumentos en sus valores de $d_{3,2}$ conforme se incrementó el tiempo de almacenamiento (Cuadro 3), los cuales en general fueron más pronunciados en las microemulsiones.

Cuadro 3. Valores de diámetro volumétrico-superficial medio ($d_{3,2}$) inicial y final de micro y nanoemulsiones.

Código de emulsión	$d_{3,2}$ inicial (0 días) (nm)	$d_{3,2}$ final (35 días) (nm)
E _{PC, 4000}	3943.3 ± 25.2 ^a	4276.7 ± 70.9 ^b
E _{PT26, 4000}	4210.0 ± 26.5 ^a	4470.0 ± 75.5 ^b
E _{PT50, 4000}	4190.0 ± 17.3 ^a	4420.0 ± 45.8 ^b
E _{PC, 3000}	3010.0 ± 10.0 ^a	3116.7 ± 5.8 ^b
E _{PT26, 3000}	3053.3 ± 47.3 ^a	3350.0 ± 45.8 ^b
E _{PT50, 3000}	3003.3 ± 15.3 ^a	3470.0 ± 43.5 ^b
E _{PC, 2500}	2473.3 ± 115.5 ^a	2673.3 ± 15.3 ^b
E _{PT26, 2500}	2590.0 ± 0.0 ^a	2720.0 ± 0.0 ^b
E _{PT50, 2500}	2733.3 ± 11.6 ^a	2906.7 ± 30.6 ^b
E _{PC, 200}	213.5 ± 4.9 ^a	236.4 ± 10.7 ^b
E _{PT26, 200}	222.7 ± 11.5 ^a	244.4 ± 1.3 ^b
E _{PT50, 200}	173.5 ± 1.3 ^a	191.4 ± 1.3 ^b
E _{PC, 100}	112.8 ± 6.0 ^a	129.5 ± 3.7 ^b
E _{PT26, 100}	93.4 ± 0.5 ^a	106.5 ± 2.6 ^a
E _{PT50, 100}	101.9 ± 2.1 ^a	107.2 ± 2.0 ^a
E _{PC, 30}	35.4 ± 1.4 ^a	40.4 ± 2.6 ^a
E _{PT26, 30}	40.3 ± 2.6 ^a	45.7 ± 1.5 ^a
E _{PT50, 30}	37.2 ± 0.6 ^a	40.2 ± 0.3 ^a

E_{x,y}: emulsiones aceite-en-agua, donde x se refiere al tipo de pectina (P_C= pectina cítrica; PT₂₆= pectina de tejocote accesión 26 y PT₅₀= pectina de tejocote accesión 50) y y se refiere al diámetro volumétrico-superficial aproximado de las gotas de aceite. Superíndices distintos en la misma fila indican que las medias son diferentes ($p \leq 0.05$).

Sin embargo, es importante señalar que puede considerarse que todas las emulsiones fueron estables durante el periodo de almacenamiento, no observándose separación de fases debido a efectos gravitacionales (cremado o sedimentación) o de coalescencia.

A partir de los resultados obtenidos, puede inferirse que los complejos WPH: pectina se adsorbieron a la superficie de las gotas de aceite, formando una barrera vigorosa en la interfase, la cual evitó en gran medida que las gotas de aceite se agregaran o coalescieran. Mientras WPH tiene la capacidad de promover la formación y estabilización de las emulsiones mediante su acción interfacial, las pectinas, en especial aquellas de tejocote, pueden conferirles larga estabilidad, debido a que inmovilizan la fase continua al aumentar la viscosidad.

Los mecanismos mediante los cuales la película interfacial biopolimérica estabilizó a las emulsiones involucraron tanto efectos estéricos como electrostáticos, evitando así los fenómenos de desestabilización de las emulsiones (Dickinson, 2011). Para diseñar una emulsión estable a la agregación se debe asegurar que las interacciones repulsivas (electrostáticas y estéricas) dominen sobre las interacciones atractivas.

De manera individual, la actividad superficial de proteínas como el WPH y de polisacáridos como las pectinas, permite la formación de micro y nanoemulsiones (Sriamornsak *et al.*, 2004; Sriamornsak *et al.*, 2005; Piorkowski y McClements, 2013), y es a través de la formación de complejos biopoliméricos solubles proteína-polisacárido que las propiedades estabilizantes de emulsiones de estos biopolímeros son mejoradas (Hernández-Marín *et al.*, 2013).

Aun cuando todas las emulsiones fueron estables durante el periodo de almacenamiento, los valores $d_{3,2}$ iniciales y finales de las microemulsiones y las nanoemulsiones con valores de $d_{3,2}$ iniciales de ~ 200 nm difirieron significativamente; mientras que aquellos correspondientes a las nanoemulsiones con valores $d_{3,2}$ iniciales de ~ 100 y 30 nm fueron estadísticamente iguales ($p > 0.05$), a excepción de la E_{Pc100} (Cuadro 3). Así, la estabilidad con el tiempo aumentó a medida que disminuyó el tamaño de las gotas de aceite de las emulsiones. Huang *et al.* (2010) y Salvia-Trujillo *et al.* (2013) informaron que las nanoemulsiones tienen alta estabilidad a la agregación y a la separación gravitacional.

Así como el tamaño de gota ejerce efecto en la estabilidad de emulsiones, también la distribución y la polidispersidad se emplean con frecuencia para caracterizar este fenómeno. En este estudio se encontró que la distribución del tamaño de gota en microemulsiones fue bimodal (datos no presentados); mientras que aquella de las nanoemulsiones fue unimodal. Esto es, las nanoemulsiones presentaron una distribución de tamaño de gota estrecha, con un índice de polidispersidad (IPD) alrededor de 0.2. Troncoso *et al.* (2012) reportaron valores de $IPD \leq 0.1$ para nanoemulsiones preparadas por el método de emulsificación de alta energía, involucrando el uso de homogeneizadores de alta presión (microfluidizador), mientras que en este estudio se utilizó un método de sonicación. Los microfluidizadores son más eficientes en la disminución y distribución estrecha del tamaño de gota, en comparación con aquellas obtenidas por sonicación; sin embargo, los equipos de alta presión presentan desventajas en los costos de producción, gasto de energía y

contaminación del equipo, en comparación a los equipos de sonicación (Abismail *et al.*, 1999). Los equipos de sonicación pueden generar emulsiones muy estables e incluso producir emulsiones con tamaños de gota pequeños (Tadros, 2009; Kaltsa *et al.*, 2013) y este estudio no fue la excepción.

El comportamiento de estabilidad de micro y nanoemulsiones de este trabajo, concuerda con lo informado por Weiss *et al.* (2009), quien menciona que emulsiones termodinámicamente inestables se pueden convertir en completamente estables cuando el tamaño de gota cae por debajo de un valor crítico (diámetro de partícula ~ 100 nm). Lo anterior, debido a que los efectos del movimiento browniano de las gotas dominan los efectos gravitacionales, evitándose así la formación de cremado o sedimentación (McClements, 2005). En este estudio se demostró que la gran mayoría de las nanoemulsiones con valores iniciales de $d_{3,2}$ de ~ 100 nm, fueron cinéticamente estables durante 35 d; propiedad que las hace muy atractivas, no sólo para la industria alimentaria, sino también para la farmacéutica y cosmética (Junyaprasert *et al.*, 2009; Burapapadh *et al.*, 2010; Troncoso *et al.*, 2012).

Una herramienta muy útil para la obtención de emulsiones estables la constituye la modulación de su potencial zeta (ζ). El ζ describe la magnitud de la carga existente sobre una partícula coloidal. Es calculado a partir de la movilidad electroforética de un coloide y es definido como la carga sobre la partícula en el “plano de corte”. Este plano es una posición teórica fuera del coloide (más allá de la capa de Stern y las capas difusas, la así llamada “doble capa”), donde las partículas interaccionan libremente con el medio que las rodea.

Partículas con alto ζ se estabilizan así mismas, debido a que su carga inhibe el fenómeno de coalescencia y aumenta su estabilidad (Morrison y Ross, 2002). Puesto que los valores de ζ pueden proporcionar información sobre la naturaleza de la carga en interfaces aceite-agua de partículas coloidales, se estimó conveniente su determinación con la finalidad de explicar las diferencias en la estabilidad de las micro y nanoemulsiones obtenidas. En la Figura 7 puede observarse que todas las emulsiones exhibieron valores de ζ negativos, indicando ello el signo de la carga presente en sus interfaces aceite-agua. En adición, los valores de ζ de las emulsiones variaron al modificar tanto los valores de $d_{3,2}$ iniciales de sus gotas, como el tipo de pectina constituyendo el CS usado para su formación.

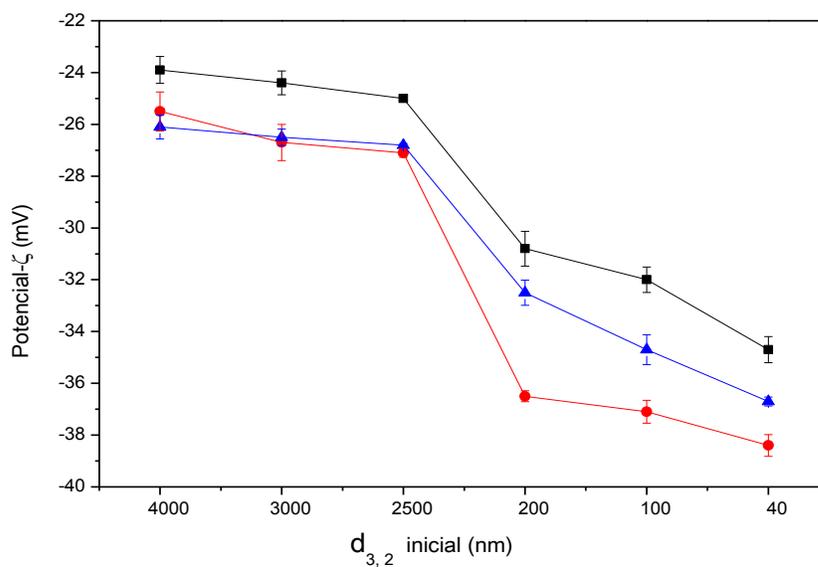


Figura 7. Potencial- ζ de micro y nanoemulsiones EP_c (■) EPT₂₆ (●) y EPT₅₀ (▲).

En efecto, el análisis de varianza multifactorial (Cuadro 4) mostró que ambos, los valores de $d_{3,2}$ iniciales de las gotas de aceite de las emulsiones y el tipo de pectina constituyendo el CS usado para su formación, influyeron

significativamente en los valores de ζ .

Cuadro 4. Análisis de varianza multifactorial de potencial zeta (mV) de micro y nanoemulsiones como función del diámetro volumétrico-superficial inicial promedio ($d_{3,2}$) y del tipo de pectina.

Tipo de pectina			$d_{3,2}$ inicial promedio(nm)					
PC	PT26	PT50	37.7	102.7	203.2	2598.9	3022.2	4114.0
-28.5 ^a	-31.9 ^c	-30.6 ^b	-37.0 ^c	-34.3 ^b	-33.3 ^b	-26.3 ^a	-25.9 ^a	-25.2 ^a

PC: pectina cítrica, PT₂₆: pectina de tejocote accesión 26, PT₅₀: pectina de tejocote accesión 50. Superíndices distintos en la misma fila indican que las medias difirieron significativamente ($p \leq 0.05$).

En términos generales, a medida que disminuyó el tamaño de gota de las emulsiones, la magnitud negativa de ζ incrementó (Figura 9, Cuadro 4), dicho comportamiento de ζ estuvo asociado a aumentos en el área superficial de las gotas de aceite, lo cual en turno, causó la adsorción de una mayor cantidad de CS con carga negativa en las interfases aceite-agua formadas. De acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey (Cuadro 4), puede observarse que los valores de ζ variaron en tres rangos de valores de $d_{3,2}$, en el siguiente orden ascendente: 4114.0 - 2598.9 nm (-25.2 a -26.3 mV) < 203.2 - 102.7 nm (-33.3 a -34.3 mV) < 37.7 nm (-37.0 mV). Este comportamiento es similar a lo informado por Lee *et al.* (2011) para emulsiones aceite-en-agua estabilizadas con aislado de proteína de lactosuero. Estos autores encontraron valores de ζ de -31.0 y -62.0 mV para emulsiones con radio de gota medio de 163 y 33 nm,

respectivamente, ellos mencionan que la razón más probable en torno a estas diferencias se deba a la fuerza iónica de las soluciones acuosas que rodean las gotas de aceite, debido a que las nanoemulsiones tienen mayor número de gotas por unidad de volumen y por lo tanto contenían mayor cantidad de proteína adsorbida a las gotas de aceite.

Por su parte, el tipo de pectina constituyendo el CS usado para la formación de las emulsiones influyó sobre los valores de ζ en orden ascendente de la siguiente manera: PC (-28.5 mV) < PT50 (-30.6 mV) < PT26 (-31.9 mV). La variación en los valores de ζ como función del tipo de pectina pueden ser explicados con base en variaciones en el GE de las pectinas. Un menor GE de la pectina, indica la presencia de mayor proporción de grupos carboxílicos (-COOH), que de grupos carboxilo esterificados (-COOCH₃), pudiendo los primeros ionizarse en grupos carboxilato (-COO⁻) bajo las condiciones de pH aplicadas en la preparación de las emulsiones, aumentando la carga negativa del sistema. La magnitud de los valores de ζ de las emulsiones estuvo relacionada negativamente con el GE de las pectinas, variando estos últimos en orden ascendente de la siguiente forma: PT₂₆ (66.2 %) < PT₅₀ (72.2 %) < P_C (74.2 %).

El comportamiento de los valores de ζ de las emulsiones al variar el GE de la pectina usada para su preparación, es acorde al informado por Krzeminski *et al.* (2014) para soluciones acuosas de pectina (1% p/v). Estos autores determinaron valores de ζ de -48.20 ± 0.80 mV y -36.33 ± 0.23 mV, para pectinas con GE de 53 y 70 %, respectivamente.

6.6. Propiedades reológicas

6.6.1. Barridos de amplitud

Las propiedades reológicas de materiales viscoelásticos pueden ser descritas a través de dos parámetros, el módulo de almacenamiento (G'), el cual es una medida de su naturaleza elástica y el módulo de pérdida (G''), el cual es una medida de su naturaleza viscosa (Lobato-Calleros *et al.*, 2006). En adición, el parámetro de factor de cedencia ($\text{Tan } \delta = G''/G'$), es un valor adimensional que indica si en un material predominan las propiedades viscosas o elásticas, debido a que compara la cantidad de energía pérdida durante un ciclo de prueba con la cantidad de energía almacenada durante este tiempo (Lobato-Calleros *et al.*, 2009).

En las figuras 8 a 10, se presentan las variaciones de los módulos G' y G'' como función de la deformación para las distintos CS y micro y nanoemulsiones. En general, los CS y las emulsiones mostraron perfiles similares de G' y G'' versus % de deformación, los cuales fueron caracterizados por una región viscoelástica lineal (RVL) a bajas deformaciones, en la que los valores de G' y G'' fueron constantes, seguida por una región no lineal en la que los valores de G' y G'' disminuyeron de manera más o menos pronunciada. La inflexión en los valores de G' y G'' sugieren el rompimiento de las estructuras de los CS y de las emulsiones. La cantidad de deformación que el material puede soportar antes de su rompimiento es evidenciada por el cambio en el punto de inflexión (Tunick *et al.*, 1990).

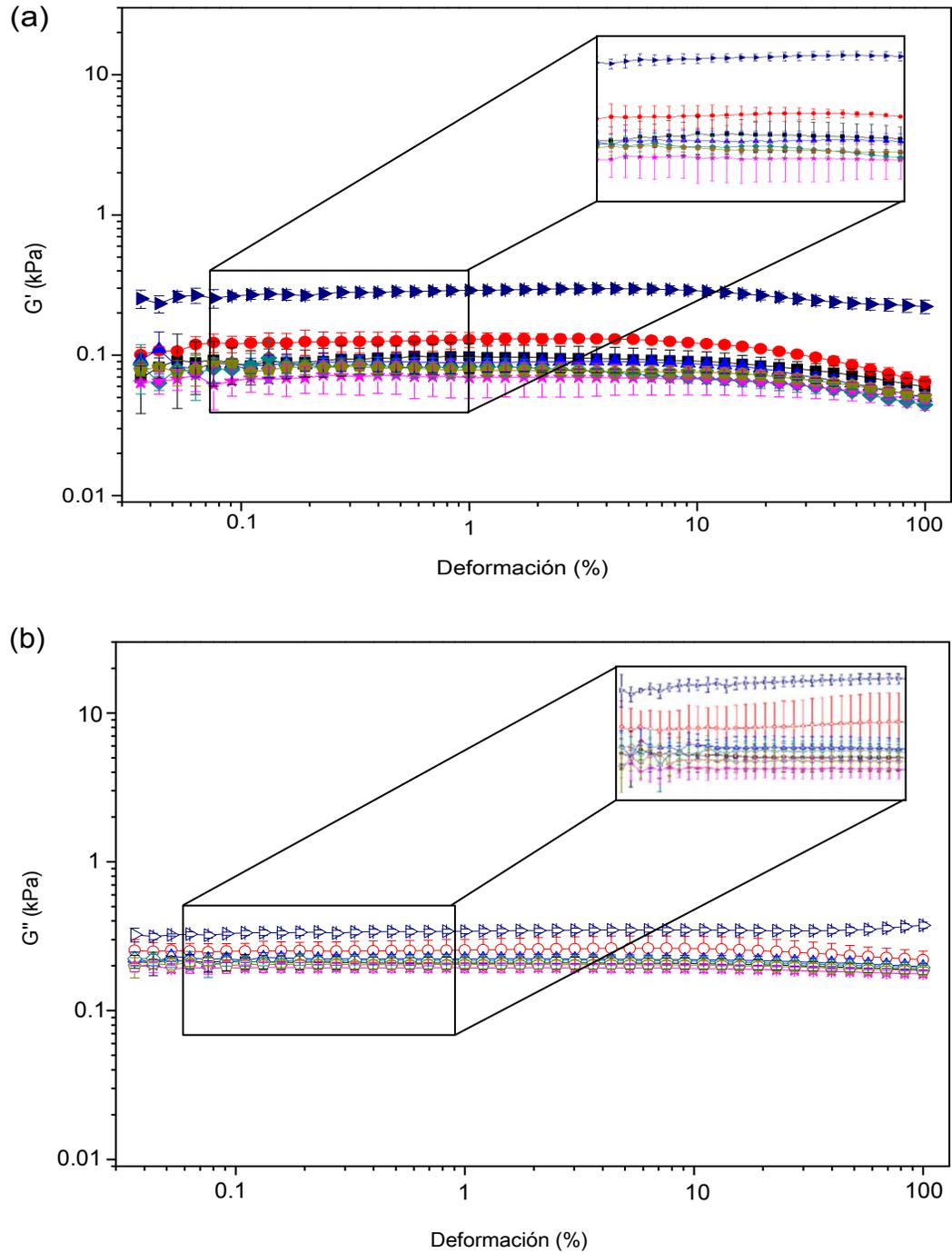


Figura 8. Variación de los módulos G' (símbolos rellenos) (a) y G'' (símbolos vacíos) (b) del $CS_{WPH, PC}$ y de micro y nanoemulsiones formadas con este complejo a $pH= 4.25$, como función de la deformación. $CS_{WPH, PC}$ (\blacksquare) y emulsiones $E_{PC, 4000}$ (\bullet), $E_{PC, 3000}$ (\blacktriangle), $E_{PC, 2500}$ (\blacklozenge), $E_{PC, 160}$ (\star), $E_{PC, 80}$ (\blacklozenge) y $E_{PC, 30}$ (\blacktriangleright).

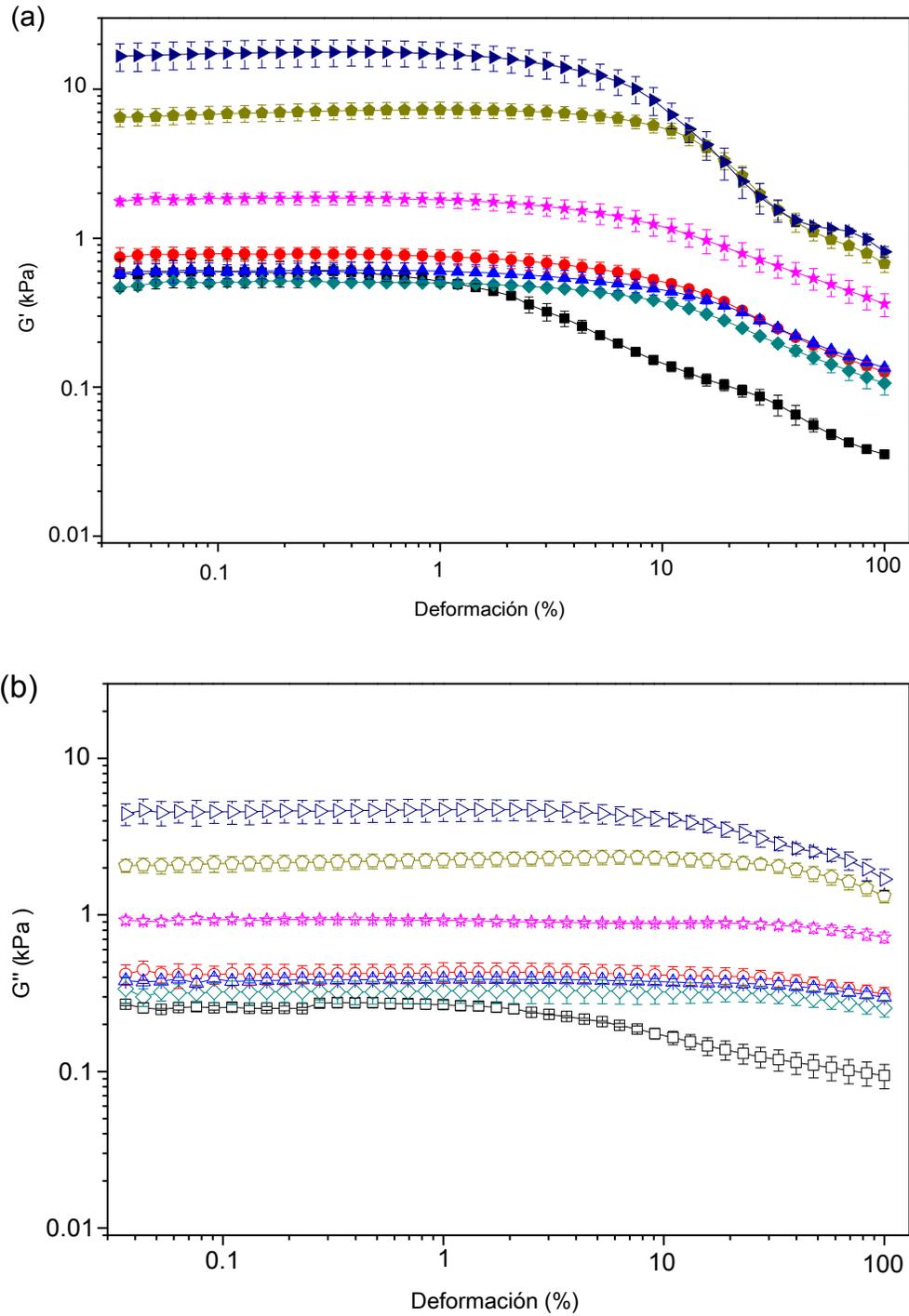


Figura 9. Variación de los módulos G' (símbolos rellenos) (a) y G'' (símbolos vacíos) (b) del $CS_{WPH, PT26}$ y de micro y nanoemulsiones formadas con este complejo a pH= 4.25, como función de la deformación. $CS_{WPH, PT26}$, (■) y emulsiones $E_{PT26, 4000}$ (●), $E_{PT26, 3000}$ (▲), $E_{PT26, 2500}$ (◆), $E_{PT26, 160}$ (★), $E_{PT26, 80}$ (◆) y $E_{PT26, 30}$ (▶)

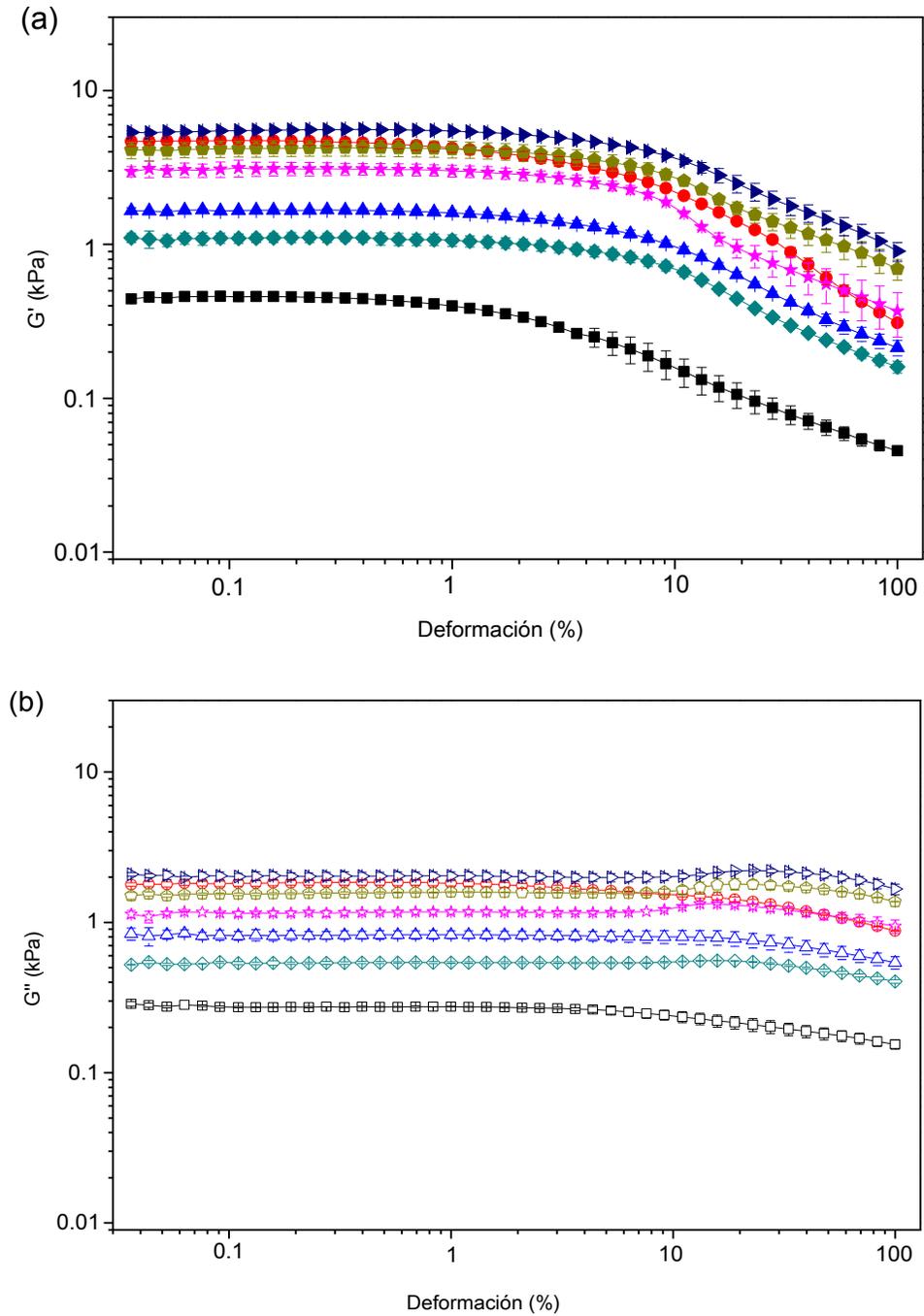


Figura 10. Variación de los módulos G' (símbolos rellenos) (a) y G'' (símbolos vacíos) (b) del CS_{WPH, PT50} y de micro y nanoemulsiones formadas con este complejo a pH= 4.0, como función de la deformación. CS_{WPH, PT50}, (■) y emulsiones E_{PT50, 4000} (●), E_{PT50, 3000} (▲), E_{PT50, 2500} (◆), E_{PT50, 160} (★), E_{PT50, 80} (◆) y E_{PT50, 30} (▶).

Los barridos de amplitud mostraron diferencias en el comportamiento reológico de los CS (figuras. 8 a 10). El $CS_{WPH, PC}$ (Figura 8) mostró valores de G' y G'' poco dependientes de la deformación, exhibiendo una RVL hasta 10 % de deformación. Sin embargo, este CS presentó un comportamiento predominantemente líquido ($G'' > G'$) en todo el rango de deformación estudiado, evidenciado por los valores de G'' mayores a aquellos de G' . Por su parte, los $CS_{WPH, PT26}$ y $CS_{WPH, PT50}$ (figuras 9 y 10), conteniendo pectinas de tejocote, mostraron una RVL hasta porcentajes de deformación de 0.8 y 0.4, respectivamente; valores de deformación menores a que aquel presentado por el $CS_{WPH, PC}$ (Figura 8). No obstante, estos CS, a diferencia del $CS_{WPH, PC}$, exhibieron comportamiento predominantemente elástico a bajos % de deformación, hasta 0.4 % para el $CS_{WPH, PT50}$ y hasta 0.6 % para el $CS_{WPH, PT26}$; a valores mayores de deformación su comportamiento reológico fue predominantemente viscoso.

El mayor carácter elástico de los $CS_{WPH, PT50}$ y $CS_{WPH, PT26}$ conteniendo pectina de tejocote, respecto al $CS_{WPH, PC}$ conteniendo pectina cítrica, se corrobora al comparar los valores de G' de estos CS en la RVL (Cuadro 5).

La magnitudes de G' de los $CS_{WPH, PT26}$ (0.6 kPa) y $CS_{WPH, PT50}$ (0.3 kPa) fueron considerablemente mayores el valor exhibido por el $CS_{WPH, PC}$ (0.1 kPa). Estos resultados indican que la pectina de tejocote impartió a los CS un mayor carácter elástico, respecto a aquel proporcionado por la pectina cítrica al $CS_{WPH, PC}$; esto es, las interacciones WPH: PT₂₆ y WPH: PT₅₀ contribuyeron a una respuesta más elástica en los CS generados, en comparación a aquella desarrollada mediante las interacciones WPH: P_C. La explicación a estas

diferencias puede deberse a variaciones en la composición, peso molecular, tamaño y forma de las moléculas de las pectinas. Sin embargo, no se cuenta con información al respecto y no estuvo dentro de los límites de este trabajo el generar esos conocimientos.

Cuadro 5. Análisis de varianza multifactorial de los valores del módulo de almacenamiento (G' , kPa) de micro y nanoemulsiones, correspondientes a la zona viscoelástica lineal.

Tipo de pectina			$d_{3,2}$ inicial promedio (nm)					
PC	PT26	PT50	37.7	102.7	203.2	2598.9	3022.2	4114.0
0.1 ^a	4.8 ^b	3.4 ^b	7.9 ^b	3.8 ^{ab}	1.7 ^a	0.6 ^a	0.8 ^a	1.8 ^a

PC: pectina cítrica, PT₂₆: pectina de tejocote accesión 26, PT₅₀: pectina de tejocote accesión 50. Superíndices distintos en la misma fila indican que las medias difirieron significativamente ($p \leq 0.05$).

Cuadro 6. Análisis de varianza multifactorial de los valores del módulo de perdida (G'' , kPa) de micro y nanoemulsiones, correspondientes a la zona viscoelástica lineal.

Tipo de pectina			$d_{3,2}$ inicial promedio(nm)					
PC	PT26	PT50	37.7	102.7	203.2	2598.9	3022.2	4114.0
0.2 ^a	1.5 ^b	1.3 ^b	2.3 ^b	1.3 ^{ab}	0.8 ^a	0.4 ^a	0.5 ^a	0.8 ^a

PC: pectina cítrica, PT₂₆: pectina de tejocote accesión 26, PT₅₀: pectina de tejocote accesión 50. Superíndices distintos en la misma fila indican que las medias difirieron significativamente ($p \leq 0.05$).

Cuadro 7. Análisis de varianza multifactorial del factor de cedencia ($Tan \delta$, kPa) de micro y nanoemulsiones, correspondientes a la zona viscoelástica lineal.

Tipo de pectina			$d_{3,2}$ inicial promedio(nm)					
PC	PT26	PT50	37.7	102.7	203.2	2598.9	3022.2	4114.0
2.2 ^b	0.5 ^a	0.4 ^a	0.6 ^a	1.0 ^{ab}	1.2 ^b	1.2 ^b	1.2 ^b	1.0 ^{ab}

PC: pectina cítrica, PT₂₆: pectina de tejocote accesión 26, PT₅₀: pectina de tejocote accesión 50. Superíndices distintos en la misma fila indican que las medias difirieron significativamente ($p \leq 0.05$).

El análisis de varianza multifactorial indicó que el comportamiento reológico de las micro y nanoemulsiones fue influenciado ($p \leq 0.05$) por el tipo de pectina del CS (cuadros 5 y 6). Los valores de G' y G'' de las emulsiones formadas con el CS_{WPH, PC}, fueron considerablemente menores que aquellos presentados por las emulsiones formadas con los CS_{WPH, PT26} y CS_{WPH, PT50}. En adición, todas las E_{WPH, PC} presentaron comportamiento reológico predominantemente viscoso, de manera similar al CS_{WPH, PC}. Por su parte las E_{WPH, PT26} y E_{WPH, PT50} exhibieron comportamiento reológico predominantemente elástico a deformaciones de alrededor del 20 %.

De manera acorde, los valores de $Tan \delta$ de las emulsiones formadas con los CS_{WPH, PT26} y CS_{WPH, PT50} no difirieron entre sí ($p > 0.05$) y fueron menores a la unidad (0.5 y 0.4, respectivamente) indicando ello un comportamiento reológico predominantemente elástico; en contraste, el valor de $Tan \delta$ de las emulsiones formadas con el CS_{WPH, PC} fue en promedio de 2.2, indicando ello un

comportamiento reológico predominantemente viscoso (Cuadro 7). Diferencias en la reología de las emulsiones al variar el tipo de pectina del CS, pueden ser explicadas en términos de las interacciones entre gotas vecinas de aceite, a través de las macromoléculas que conformaron sus películas interfaciales; así como de aquellas entre macromoléculas presentes en la fase acuosa o dispersante. En términos generales, entre mayor es el número de interacciones tomando lugar en la interfase y en la fase dispersante, mayor es el número de uniones en la estructura de la emulsión y mayor la elasticidad del sistema (Everett y Olson, 2000). Los resultados obtenidos, indican que existió un mayor número de interacciones en aquellas emulsiones formadas con los $CS_{WPH, PT26}$ y $CS_{WPH, PT50}$, en comparación con las que ocurrieron en las emulsiones formadas con el $CS_{WPH, PC}$.

El tamaño de gota también influyó significativamente sobre las propiedades viscoelásticas de las emulsiones (cuadros 5 y 6). El análisis de varianza multifactorial mostró que disminuciones en el tamaño de gota de las microemulsiones, de 4114.0 a 2598.9 nm, no causaron diferencias ($p > 0.05$) en sus valores de G' y G'' . En contraste, disminuciones en el tamaño de gota de las nanoemulsiones de 203.2 a 37.7 nm, resultaron en incrementos en los valores de G' y G'' , existiendo diferencia significativa entre los valores de estos parámetros correspondientes a las nanoemulsiones con valores de $d_{3,2}$ iniciales de 203.2 y 37.7 nm. Reducciones pronunciadas en el tamaño de gota de las nanoemulsiones, resultaron en un aumento en el número de gotas por unidad de volumen, lo cual pudo favorecer las interacciones entre los biopolímeros adsorbidos en la interfase aceite-agua de gotas vecinas y así generar una

respuesta mecánica más elástica de la emulsión (Hernández-Marín *et al.*, 2013). Las variaciones de los valores de $\tan \delta$ (Cuadro 7) siguieron un comportamiento similar al de G' y G'' , al modificar el tamaño de gota. Así, no se observaron diferencias significativas en los valores de $\tan \delta$ al disminuir el tamaño de gota de las microemulsiones, pero sí se observó una disminución significativa en su valor al reducir el tamaño de gota de las nanoemulsiones.

6.6.2. Barridos de frecuencia

Los barridos de frecuencia de los CS y las emulsiones se realizaron bajo deformaciones de 0.2 y 0.3 %, respectivamente, debido a que correspondieron a la RVL de estos sistemas, determinada mediante barridos de amplitud.

La información proporcionada por los barridos de frecuencia puede ser utilizada para caracterizar o clasificar una dispersión. Las cuatro clasificaciones más comunes son: solución diluida, solución concentrada o sistema de red enmarañada, gel débil y gel fuerte. Una solución diluida muestra valores de G'' mayores que G' en todo el rango de frecuencia, a pesar de que ambos módulos se aproximan a frecuencias más altas. El sistema de red enmarañada muestra curvas de G'' y G' que se intersectan a la mitad del rango de frecuencia indicando una clara tendencia a un mayor comportamiento viscoelástico sólido a altas frecuencias (Ross-Murphy, 1984; Steffe, 1996). Los geles débiles presentan valores de G' mayores que aquellos de G'' , encontrándose estos módulos casi paralelos uno respecto a otro. Los geles fuertes exhiben valores de G' mayores que aquellos de G'' ; sin embargo, G' tiene una pendiente de ~ 0 y G'' presenta un mínimo a frecuencias intermedias (Clark y Ross-Murphy, 1987).

Los cambios en G' y G'' de los distintos CS y emulsiones como función de la frecuencia se muestran en las figuras 11 a 13, pudiendo observarse diferencias de acuerdo al tipo de pectina acomplejada con WPH.

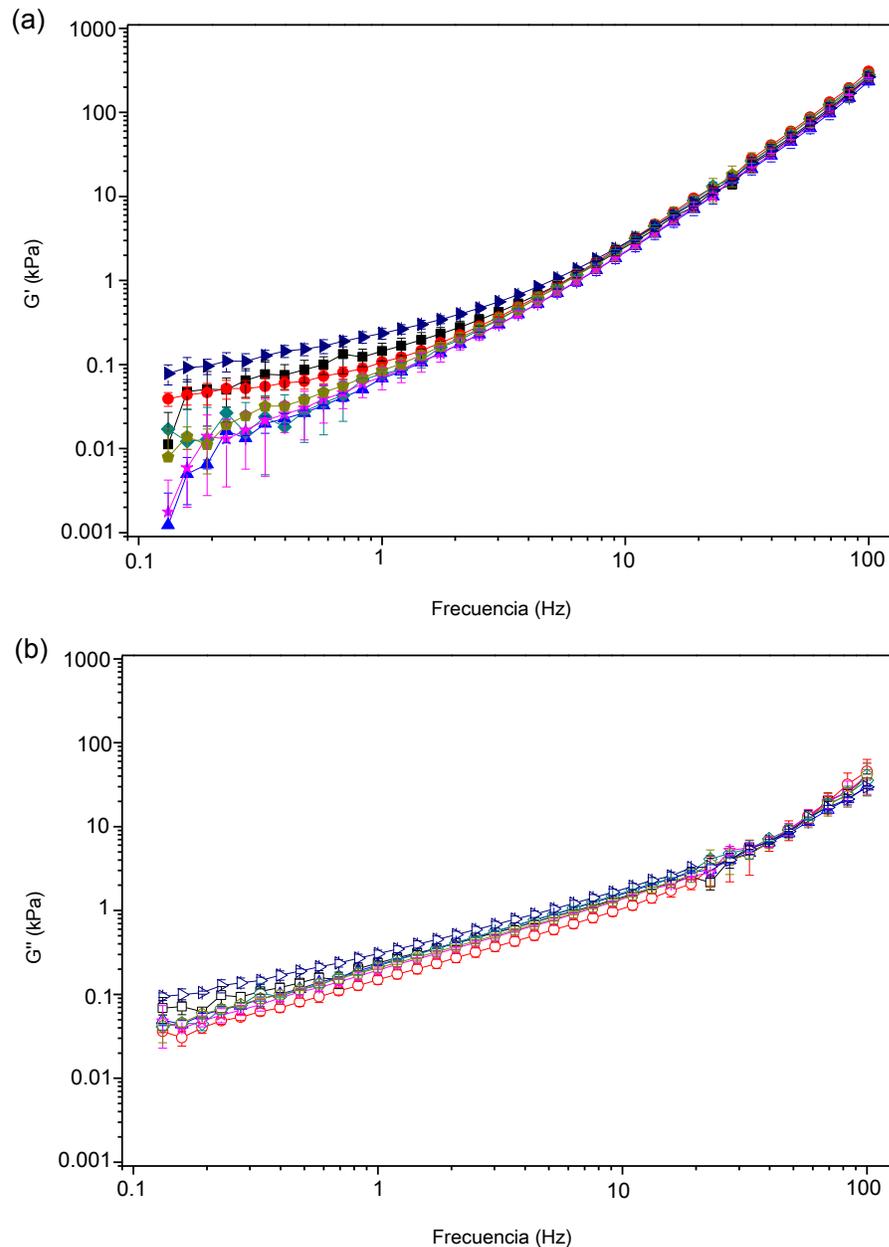


Figura 11. Variación de los módulos G' (símbolos rellenos) (a) y G'' (símbolos vacíos) (b) del $CS_{WPH, PC}$ y de micro y nanoemulsiones formadas con este complejo a $pH= 4.25$, durante el barrido de frecuencia. $CS_{WPH, PC}$ (■), $E_{PC, 4000}$ (●), $E_{PC, 3000}$ (▲), $E_{PC, 2500}$ (◆), $E_{PC, 160}$ (★), $E_{PC, 80}$ (◆) y $E_{PC, 30}$ (▶).

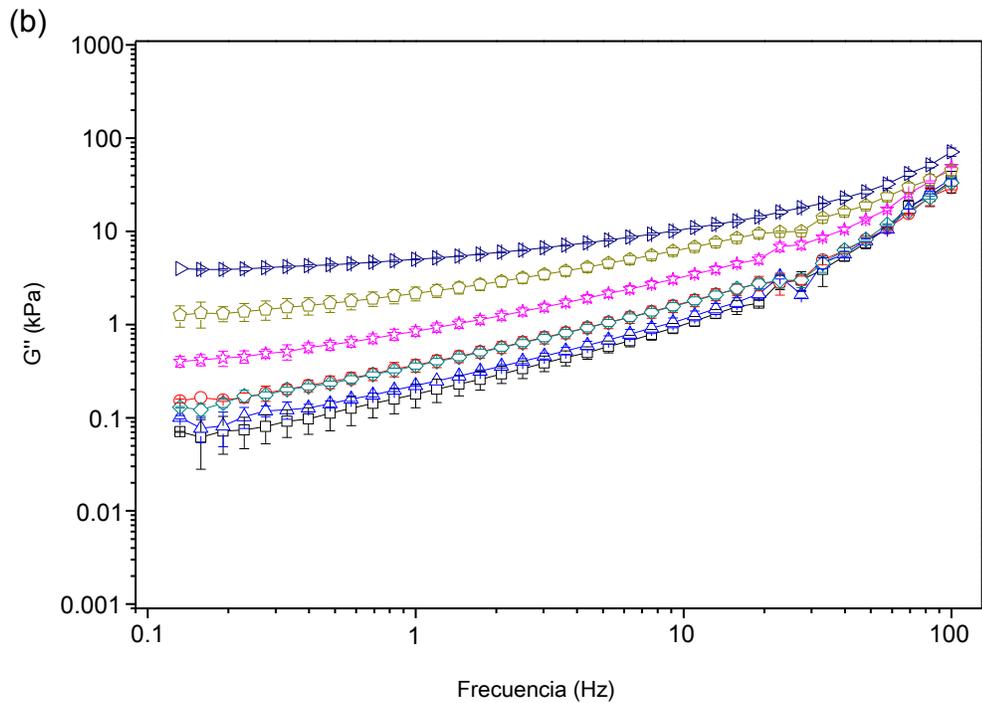
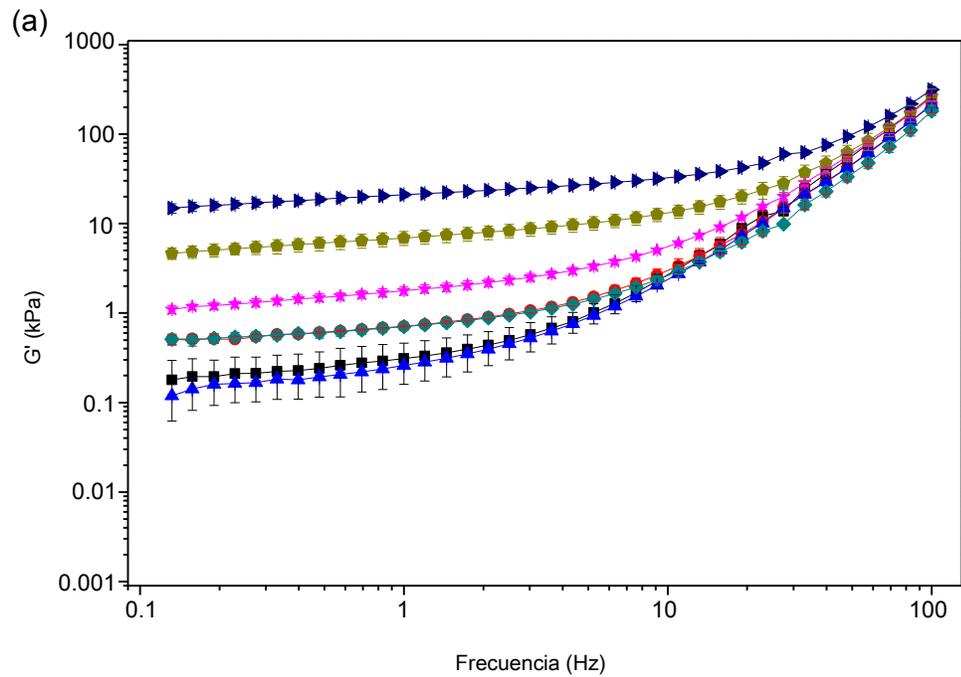


Figura 12. Variación de los módulos G' (símbolos rellenos) (a) y G'' (símbolos vacíos) (b) del $CS_{WPH, PT26}$ y de micro y nanoemulsiones formadas con este complejo a $pH= 4.25$, durante el barrido de frecuencia. $CS_{WPH, PT26}$ (■), $E_{PT26, 4000}$ (●), $E_{PT26, 3000}$ (▲), $E_{PT26, 2500}$ (◆), $E_{PT26, 160}$ (★), $E_{PT26, 80}$ (◆) y $E_{PT26, 30}$ (▶).

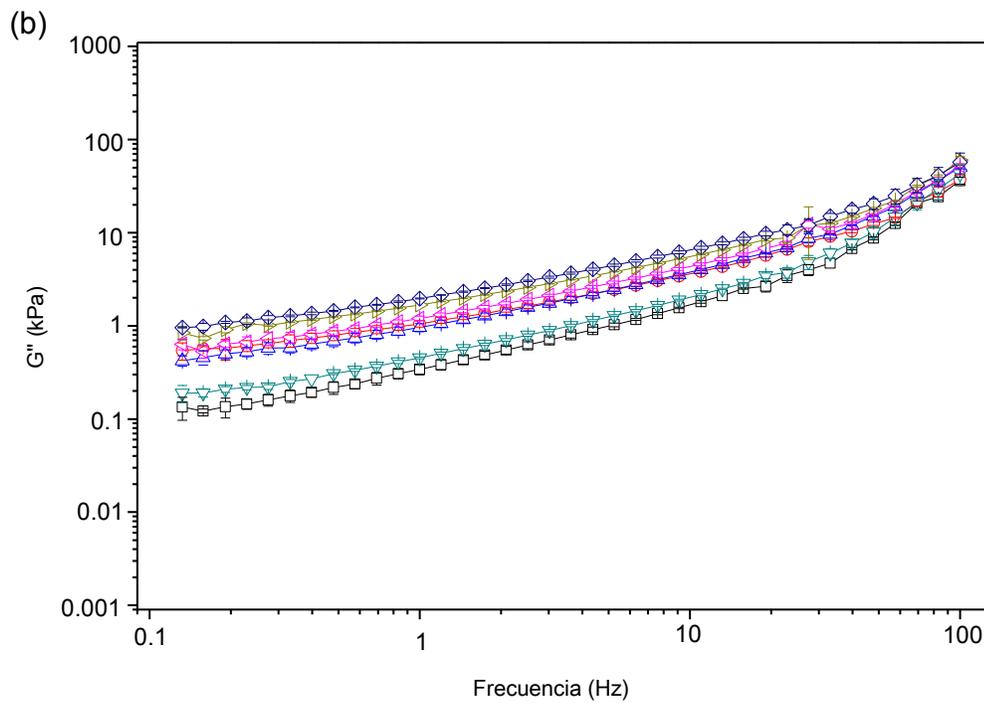
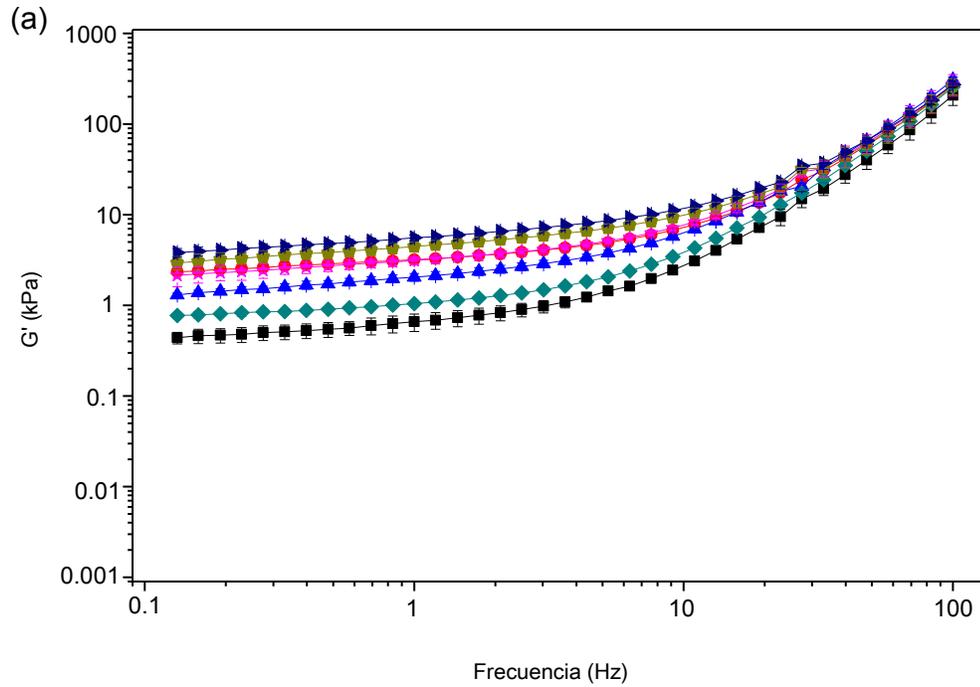


Figura 13. Variación de los módulos G' (símbolos rellenos) (a) y G'' (símbolos vacíos) (b) del $CS_{WPH, PT50}$ y de micro y nanoemulsiones formadas con este complejo a $pH= 4.0$, durante el barrido de frecuencia. $CS_{WPH, PT50}$ (■), $E_{PT50, 4000}$ (●), $E_{PT50, 3000}$ (▲), $E_{PT50, 2500}$ (◆), $E_{PT50, 160}$ (★), $E_{PT50, 80}$ (◆) y $E_{PT50, 30}$ (▶).

Los módulos G' y G'' del $CS_{WPH, PC}$ y las E_{PC} (Figura 11) fueron fuertemente dependientes de la frecuencia, incrementando sensiblemente conforme esta última se elevó. Solamente a bajas frecuencias (< 5 Hz) fue posible distinguir diferencias en los valores de G' del $CS_{WPH, PC}$ y las E_{PC} , observando que únicamente la $E_{PC, 30}$ exhibió valores de G' mayores a los presentados por el $CS_{WPH, PC}$, probablemente debido al reducido tamaño de gota de esta emulsión. Los valores de G'' fueron más altos que aquellos de G' a frecuencias menores a 5 Hz, pero a frecuencias mayores las curvas de G' traslaparon a aquellas de G'' , debido a que las pendientes de las curvas del primero fueron mayores que aquellas de las curvas de G'' . El comportamiento descrito indica que el $CS_{WPH, PC}$ y las E_{PC} presentaron comportamiento viscoelástico predominantemente líquido a bajos valores de frecuencia; mientras que exhibieron comportamiento predominantemente sólido a frecuencias relativamente altas. Murillo *et al.* (2011) informaron que el traslape de G' sobre G'' en ciertos rangos de frecuencia en emulsiones dobles estabilizadas con complejos biopoliméricos, puede relacionarse a una estructura consistente en una red embebida en una matriz más suave, y la rigidez en esas regiones puede ser producida por entrecruzamiento químico o físico (Rodríguez-González *et al.*, 2004). De acuerdo al comportamiento de G' y G'' como función de la frecuencia, el $CS_{WPH, PC}$ y las E_{PC} pueden ser clasificados como soluciones concentradas o sistemas de red enmarañados (Ross-Murphy, 1984; Steffe, 1996)

Los módulos G' y G'' de los $CS_{WPH, PT26}$ y $CS_{WPH, PT26}$ y de las E_{PT26} y E_{PT50} (figuras 12 y 13) mostraron sensiblemente menor dependencia de la frecuencia, que aquellos correspondientes al $CS_{WPH, PC}$ y las E_{PC} (Figura 11). En adición, los

valores de G' de los $CS_{WPH, PT26}$ y $CS_{WPH, PT26}$ y de las E_{PT26} y E_{PT50} fueron mayores a aquellos de G'' en todo el rango de frecuencia estudiado, no existiendo traslape entre sus curvas. Estos resultados indican que estos sistemas dispersos presentaron comportamiento viscoelástico predominantemente sólido y que su estructura correspondió a la de geles débiles (Clark y Ross-Murphy, 1987). Martínez-Ruvalcaba *et al.* (2007) y Hesarinejad *et al.* (2014) mencionan que geles débiles, muestran módulos G' y G'' con ligera dependencia de la frecuencia, siendo los valores de G' superiores a los de G'' en todo el rango de frecuencia.

Es interesante señalar, que las E_{PT26} y E_{PT50} mostraron valores de G' y G'' mayores que los presentados por los $CS_{WPH, PT26}$ y $CS_{WPH, PT26}$, comportamiento que fue más evidente a frecuencias relativamente bajas y conforme disminuyó el tamaño de gota. El comportamiento señalado, contrario al observado en las E_{PC} y el $CS_{WPH, PC}$, indica que la presencia de gotas de aceite emulsionadas y estabilizadas con los $CS_{WPH, PT26}$ y $CS_{WPH, PT26}$, resultaron en arreglos estructurales en las en las E_{PT26} y E_{PT50} con propiedades viscoelásticas aumentadas, en comparación con las presentadas por los $CS_{WPH, PT26}$ y $CS_{WPH, PT26}$ solos. Esto es, las gotas de aceite actuaron como agentes de relleno que reforzaron la estructura de gel de los CS. Se ha informado que la contribución de las gotas de aceite a las propiedades reológicas de emulsiones geladas aceite-en-agua, depende de la concentración y de las propiedades mecánicas de las gotas de aceite; así como de la naturaleza de las interacciones gotas de aceite-matriz gelada (Chen *et al.*, 2000). Diferencias en el comportamiento reológico de las E_{PT26} y E_{PT50} , respecto a la E_{PC} , pueden explicarse en términos

de diferencias en las interacciones a través de la interfase entre las gotas de aceite y la matriz gelada., siendo más fuertes las ocurridas en las E_{PT26} y E_{PT50} . Disminuciones en $d_{3,2}$ de las emulsiones, resultaron en un mayor número de gotas de aceite por unidad de volumen y en consecuencia en un mayor número de interacciones en la interfase.

6.6.3. Curvas de flujo

Cuando se aplica un esfuerzo de corte se provoca una ruptura de la estructura del material bajo estudio, lo que provoca que exhiba un comportamiento dependiente del corte (Darby, 1996). Los perfiles de viscosidad aparente (η_{ap}) versus tasa de corte para los distintos CS y emulsiones (figuras 14 a 16) fueron similares y estuvieron caracterizados por una región Newtoniana a bajas tasas de corte y una región adelgazante al corte a mayores tasas de corte.

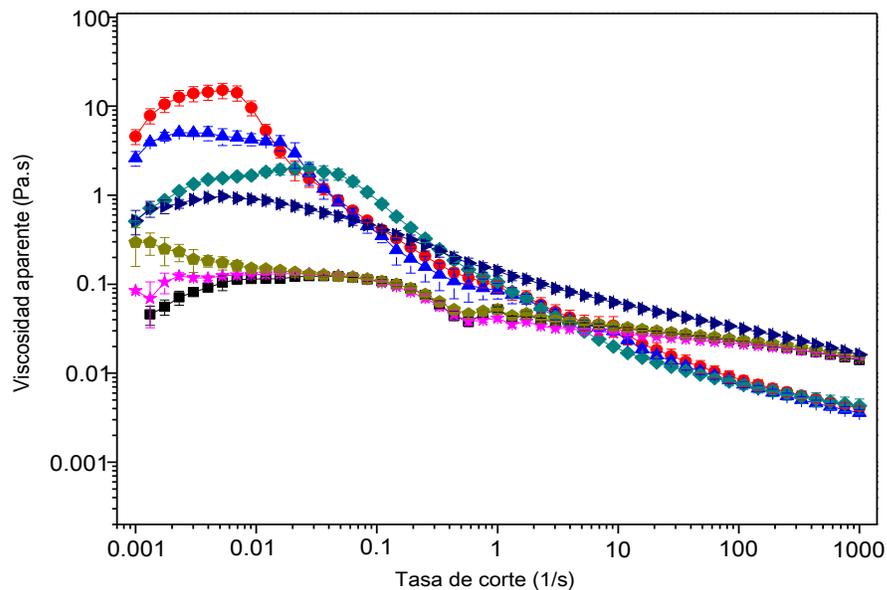


Figura 14. Cambios en la viscosidad aparente como función de la tasa de corte de $CS_{WPH, PT50}$ y de micro y nanoemulsiones formadas con este complejo a $pH= 4.25$. $CS_{WPH, PC}$ (\blacksquare), $E_{PC, 4000}$ (\bullet), $E_{PC, 3000}$ (\blacktriangle), $E_{PC, 2500}$ (\blacktriangledown), $E_{PC, 160}$ (\blacktriangleleft), $E_{PC, 80}$ (\blacktriangleright) y $E_{PC, 30}$ (\blacktriangleright).

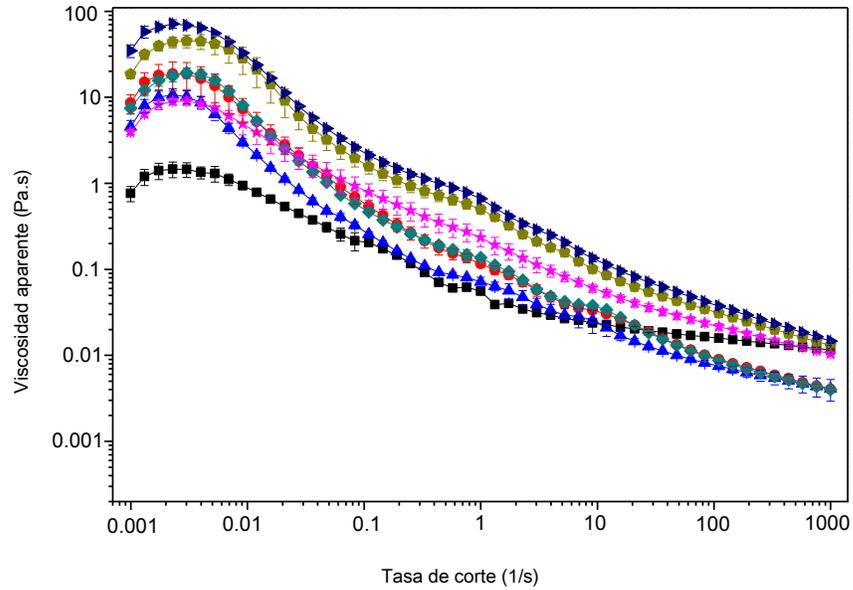


Figura 15. Cambios en la viscosidad aparente como función de la tasa de corte de los CS_{WPH} , PT_{26} y de micro y nanoemulsiones formadas con este complejo a $pH= 4.25$ CS_{WPH} , PT_{26} (■), E_{PT26} , 4000 (●), E_{PT26} , 3000 (▲), E_{PT26} , 2500 (◆), E_{PT26} , 160 (★), E_{PT26} , 80 (◆) y E_{PT26} , 30 (▶).

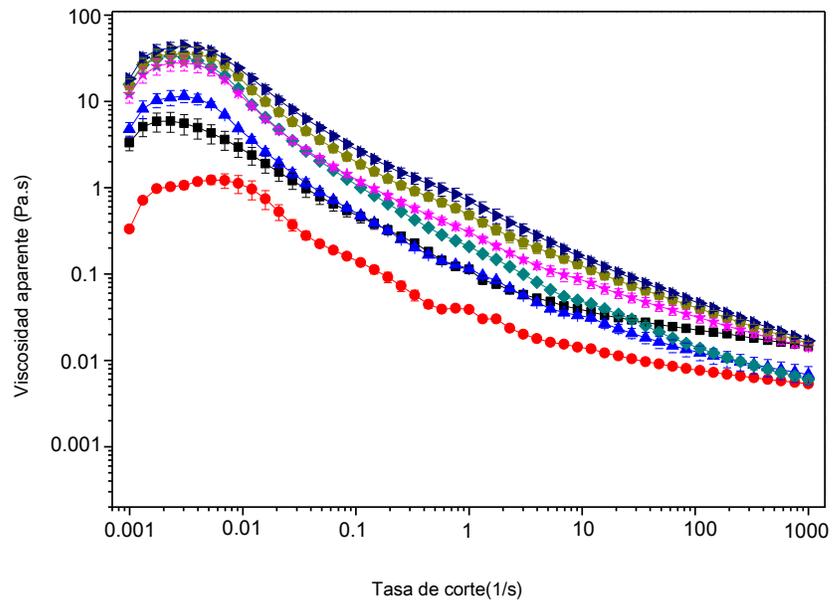


Figura 16. Cambios en la viscosidad aparente como función de la tasa de corte de los CS_{WPH} , PT_{50} y de micro y nanoemulsiones formadas con este complejo a $pH= 4.0$. CS_{WPH} , PT_{50} (■), E_{PT50} , 4000 (●), E_{PT50} , 3000 (▲), E_{PT50} , 2500 (◆), E_{PT50} , 160 (★), E_{PT50} , 80 (◆) y E_{PT50} , 30 (▶).

La presencia de una región Newtoniana es típica de materiales caracterizados por una viscosidad estructural, la cual se forma en reposo o en estado de equilibrio. La aplicación de pequeños esfuerzos provoca rupturas y reformaciones en las estructuras ordenadas, las interacciones cadena-cadena se rompen y se reforman llegando a un equilibrio; el resultado es que la viscosidad permanece constante.

El comportamiento adelgazante de corte asociado con disminuciones progresivas de η_{ap} , puede ser explicado por la alineación de las moléculas de los biopolímeros con el campo de corte, así como por la ruptura de interacciones entre cadenas de biopolímeros o interconexiones entre macromoléculas (McClements, 1999; (Bortnowska *et al.*, 2014). En esta región la velocidad de reformación de las interacciones inter-cadenas es menor que la velocidad de ruptura y el resultado neto es una disminución en la η_{ap} al incrementar la tasa de corte (Singthong, *et. al.*, 2004). El comportamiento de viscosidad como función de la tasa de corte presentado por los CS y las emulsiones es característico de muchos fluidos no—Newtonianos, tales como fluidos poliméricos, emulsiones dobles, dispersiones floculadas y coloides (Murillo *et al.*, 2011).

El modelo que ajustó mejor los datos de η_{ap} como función de la tasa de corte fue el de Ellis, ecuación 3 ($R^2 = 0.83$ a 096) (Steffe, 1996):

$$\eta_{ap} = \frac{\eta_0}{[1+(\lambda\dot{\gamma})^2]} \dot{\gamma} \quad (3)$$

Donde η_{ap} = viscosidad aparente; η_0 = viscosidad inicial a bajas tasas de corte;

λ = es un tiempo constante asociado al tiempo que toman los polímeros en solución para recuperarse del estiramiento y deformación provocados por el esfuerzo aplicado en todo el rango de tasa de corte; $\dot{\gamma}$ = tasa de corte y p = índice de adelgazamiento al corte (Steffe, 1996).

El análisis de varianza multifactorial de los valores de la ecuación de Ellis es presentado en los cuadros 8 a 10. Las E_{PC} mostraron valores de η_0 , λ y p menores ($p \leq 0.05$) que aquellos mostrados por las E_{PT26} y E_{PT50}

Cuadro 8. Análisis de varianza multifactorial de la viscosidad inicial (η_0 , (Pa.s) de micro y nanoemulsiones.

Tipo de pectina			$d_{3,2}$ inicial promedio (nm)					
PC	PT26	PT50	37.7	102.7	203.2	2598.9	3022.2	4114.0
3.2 ^a	31.4 ^b	22.6 ^b	42.4 ^b	27.5 ^{ab}	13.2 ^a	10.6 ^a	9.2 ^a	11.3 ^a

P_C : pectina cítrica, PT_{26} : pectina de tejocote accesión 26, PT_{50} : pectina de tejocote accesión 50. Superíndices distintos en la misma fila indican que las medias difirieron significativamente ($p \leq 0.05$).

Cuadro 9. Análisis de varianza multifactorial del tiempo de relajación (λ , s) de micro y nanoemulsiones.

Tipo de pectina			$d_{3,2}$ inicial promedio (nm)					
PC	PT26	PT50	37.7	102.7	203.2	2598.9	3022.2	4114.0
284.3 ^a	746.1 ^b	838.0 ^b	588.4 ^a	562.3 ^a	475.3 ^a	639.7 ^a	600.0 ^a	871.0 ^a

P_C : pectina cítrica, PT_{26} : pectina de tejocote accesión 26, PT_{50} : pectina de tejocote accesión 50. Superíndices distintos en la misma fila indican que las medias difirieron significativamente ($p \leq 0.05$).

Cuadro 10. Análisis de varianza multifactorial del índice de adelgazamiento al corte (p) de micro y nanoemulsiones.

Tipo de pectina			$d_{3,2}$ inicial promedio (nm)					
PC	PT26	PT50	37.7	102.7	203.2	2598.9	3022.2	4114.0
0.2 ^a	0.3 ^b	0.3 ^b	0.3 ^a	0.2 ^a	0.2 ^a	0.3 ^a	0.3 ^a	0.3 ^a

PC: pectina cítrica, PT₂₆: pectina de tejojote accesión 26, PT₅₀: pectina de tejojote accesión 50. Superíndices distintos en la misma fila indican que las medias difirieron significativamente ($p \leq 0.05$).

Estos datos indican que en términos generales las E_{PT26} y E_{PT50} fueron sistemas dispersos inicialmente más estructurados, con mayor consistencia; evidenciada esta última por sus valores de η_0 del orden de 7 a 10 veces mayores que aquellos presentados por las E_{PC} . Las diferencias en los valores de η_0 de las emulsiones pueden ser atribuidas a diferencias en las viscosidades producidas por las distintas pectinas. Es conocido que las dispersiones acuosas de pectinas de tejojote muestran viscosidades más elevadas que aquellas exhibidas por las pectinas de origen cítrico (Li *et al.*, 2008).

El valor de λ proporciona un orden de la tasa de corte crítica que marca el final de la región Newtoniana y el establecimiento de la región adelgazante al corte (Rao, 1999); así, valores bajos de λ en las E_{PC} indican que su estructura sufrió ruptura a tasas de corte menores a aquellas necesarias para las estructuras de las E_{PT26} y E_{PT50} . El parámetro p tiende a valores de $1-n$, donde n es el índice de comportamiento de flujo de la Ley de la Potencia (Rao, 1999). El más bajo valor de p para las E_{PC} indica que su comportamiento adelgazante fue menor al

presentado por las E_{PT26} y E_{PT50} . Diferencias en los valores de los parámetros reológicos del modelo de Ellis, presentados por la E_{PC} , respecto a aquellos mostrados por las E_{PT26} y E_{PT50} , corroboraron que las pectinas de tejocote contribuyeron de forma diferente a la estructura de las emulsiones, en comparación con la P_c .

El tamaño de gota influyó significativamente sobre los valores de η_0 , pero no sobre los valores de λ y p (cuadros 8 a 10). Las microemulsiones, independientemente de su tamaño de gota, mostraron valores de η_0 comparables ($p > 0.05$); sin embargo, las nanoemulsiones presentaron incrementos en los valores de η_0 al disminuir su tamaño de gota (Cuadro 9), existiendo una diferencia significativa entre los valores correspondientes a las E_{200} y E_{37} . Estos resultados indican que valores muy bajos de $d_{3,2}$ influyen marcadamente en la estructura y las propiedades mecánicas de las emulsiones, a través de la formación de una estructura más densa y partículas más pequeñas (Mousazadeh *et al.*, 2013). Noor El-Din *et al.* (2013) informaron un aumento significativo en la viscosidad de emulsiones estabilizadas por agentes tensoactivos iónicos cuando el tamaño de gota se redujo, atribuyéndolo a alteraciones en la relación entre el espesor de la capa de Debye y el diámetro de las gotas, causando ello un aumento "virtual" en la concentración de las gotas. Weiss y McClements, (2000) encontró que nanoemulsiones con una concentración de aceite del 25 % en peso, estabilizadas con dodecil sulfato de sodio (DSS), presentaron comportamiento reológico similar a la de emulsiones convencionales (micro-) conteniendo más del 70 % en peso de aceite.

VII. CONCLUSIONES

Los valores de pH óptimos para la formación de complejos solubles entre hidrolizado de proteína de lactosuero (WPH) y pectinas de tejocote accesiones 26 y 50, y pectina cítrica ($CS_{WPH, PT26}$, $CS_{WPH, PT50}$ y $CS_{WPH, PC}$, respectivamente), usando una relación en peso WPH: pectina de 6: 1, fueron 4.25, 4.0 y 4.25, respectivamente.

Mediante el uso de los $CS_{WPH: P}$ como agentes emulsificantes/estabilizantes y la aplicación de distintas condiciones de homogeneización, con o sin sonicación, se logró obtener microemulsiones con tamaño de gota, medido como diámetro volumétrico-superficial medio ($d_{3,2}$), de alrededor de 4000, 3000 y 2500 nm; así como nanoemulsiones con tamaños de gota de alrededor de 200, 100 y 30 nm.

Todas las emulsiones (E) fueron estables durante 35 días de almacenamiento; no obstante, aquellas con diámetro volumétrico-superficial medio ($d_{3,2}$) \leq 100 nm, y en particular aquellas estabilizadas con los $CS_{WPH, PT26}$, $CS_{WPH, PT50}$, sufrieron la variación más pequeña de tamaño de gota.

Ambos, el tipo de pectina y el tamaño de gota, influyeron sobre las propiedades reológicas de las emulsiones. Así, las E_{PT26} y E_{PT50} mostraron viscosidades aparentes y propiedades viscoelásticas relativamente elevadas

y un comportamiento reológico predominantemente sólido; mientras que las E_{PC} presentaron viscosidades aparentes y propiedades viscoelásticas muy bajas y un comportamiento reológico predominantemente líquido.

Disminuciones en el tamaño de gota en el rango nanométrico, resultaron en incrementos en los valores de los módulos elástico y viscoso de las nanoemulsiones.

A partir de los resultados de estabilidad y reológicos se puede inferir que las PT_{26} y PT_{50} de tejocote acomplejadas a WPH, contribuyeron a la formación de micro y nanoemulsiones estables, con propiedades mecánicas superiores a aquellas formadas usando P_C acomplejada con WPH.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Abismail, B., Canselier, J. P., Wilhelm, A. M., Delmas, H., Gourdon, C. (1999). Emulsification by ultrasound: Drop size distribution and stability. *Ultrasonics Sonochemistry*, 6: 75–83.

Aranberri, I., Binks, B. P., Clint, J. H., Fletcher, P. D. I. (2006). Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensoactivos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 7(3): 211–231.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1995). *Official Methods of Analysis* (15a. ed). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.

Bagherian, H., Ashtiani, F. Z., Fouladitajar A., Mohtashamy, M. (2011). Comparisons between conventional, microwave and ultrasound-assisted methods for extraction of pectin from grapefruit. *Chemical Engineering and Processing*, 50: 1237–1243.

Bengoechea, C., Jones, O. G., Guerrero, A., McClements, D. J. (2011). Formation and characterization of lactoferrin/pectin electrostatic complexes: Impact of composition, pH and thermal treatment. *Food Hydrocolloids*, 25: 1227-1232.

Benichou, A., Aserin, A., Garti, N. (2007). W/O/W double emulsions stabilized with WPI–polysaccharide complexes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 294: 20– 32.

Bortnowska, G., Balejko, J., Tokarczyk, G., Romanowska-Osuch, A., Krzeminska, N. (2014). Effects of pregelatinized waxy maize starch on the

physicochemical properties and stability of model low-fat oil-in-water food emulsions. *Food Hydrocolloids*, 36: 229–237.

Burapapadh, K., Kumpugdee-Vollrath, M., Chantasart D., Sriamornsak, P. (2010). Fabrication of pectin-based nanoemulsions loaded with itraconazole for pharmaceutical application. *Carbohydrate. Polymers*, 82: 384–393.

Burapapadh, K., Takeuchi, H., Sriamornsak, P. (2012). Novel pectin-based nanoparticles prepared from nanoemulsion templates for improving in vitro dissolution and in vivo absorption of poorly water-soluble drug. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 82: 250–261.

Chanamai, R., Horn, G., McClements, D. J. (2002). Influence of oil polarity on droplet growth in oil-in-water emulsions stabilized by a weakly adsorbing biopolymer or a nonionic surfactant. *Colloid and Interface Science*, 247 (1): 167–176.

Charoen, R., Jangchud, A., Jangchud, K., Harnsilawat, T., Naivikul, O., y McClements, D. J. (2011). Influence of biopolymer emulsifier type on formation and stability of rice bran oil-in-water emulsions: whey protein, gum arabic, and modified starch. *Journal of Food Science*, 76 (1): 165-172.

Chen, J., Dickinson, E., Langton, M., Hermansson, A. M. (2000). Mechanical properties and microstructure of heat-set whey protein emulsion gels: effect of emulsifiers. *LWT-Food Science and Technology*, 33: 299-307.

Chebil, A., Desbrières, J., Nouvel C., Six, J. L., Durand, A. (2013). Ostwald ripening of nanoemulsions stopped by combined interfacial adsorptions of molecular and macromolecular nonionic stabilizers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, 425: 24– 30.

Clark, A. H., Ross-Murphy, S. B. (1987). Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Advances in Polymer Science*, 83: 57-192.

Darby, R. (1996). *Chemical Engineering fluid Mechanics*. Nueva York: Marcel Dekker.

de Kruif, C. G., Weinbreck, F., de Vries, R. (2004). Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Colloid and Interface Science*, 9: 340-349.

Dickinson, E. (1995). Emulsion stabilization by polysaccharides and protein polysaccharide complexes. En: *Food Polysaccharides and Their Applications*, (Stephen, A. M., ed.), pp. 501-515. Nueva York: Marcel Dekker.

Dickinson, E. (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17(1), 25–39.

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

Dickinson, E. (2010). Flocculation of protein-stabilized oil-in-water emulsions. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 81 (1): 130-140.

Dickinson, E., (2011). Mixed biopolymers at interfaces: Competitive adsorption and multilayer structures. *Food Hydrocolloids*, 25: 1966–1983.

Edwards, J. E. Brown, P. N., Talent, N., Dickinson, T. A., Shipley P. R. (2012). A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. *Phytochemistry*, 79: 5–26

Espinosa-Andrews, H., Enríquez-Ramírez, K. E., García-Márquez, E., Ramírez-Santiago, C., Lobato-Calleros, C., Vernon-Carter J. (2013). Interrelationship between the zeta potential and viscoelastic properties in coacervates complexes. *Carbohydrate Polymers*, 95: 161–166

Espinosa-Andrews, H., Sandoval-Castilla, O., Vázquez-Torres, H., Vernon-Carter, E. J., Lobato-Calleros, C. (2010). Determination of the gum Arabic–chitosan interactions by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates. *Carbohydrate Polymers*, 79: 541–546.

Everett, D. W., Olson, N. F. (2000). Dynamic rheology of renneted milk gels containing fat globules stabilized with different surfactants. *Journal of Dairy Science*, 83: 1203–1209.

Friberg, S., Larsson, K., Sjöblom, J. (2004). *Food Emulsions* (4 ed.). Nueva York: Marcel Dekker.

Gharibzahedi, S. M. T., Mousavi, S. M., Hamed, M., Ghasemlou, M. (2012). Response surface modeling for optimization of formulation variables and physical stability assessment of walnut oil-in-water beverage emulsions. *Food Hydrocolloids*, 26: 293–301

Given, P. S., Jr. (2009). Encapsulation of flavors in emulsions for beverages. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 14(1), 43-47.

Grinberg, V. Ya., Tolstoguzov, V. B. (1997). Thermodynamic incompatibility of protein and polysaccharide in solution. *Food Hydrocolloids*, 11: 145–158.

Guzey, D., McClements, D. J. (2006). Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. *Advances in Colloid and Interface Science*, 128: 227-248.

Hernández-Jaimes, C., Fouconnier, B., Pérez-Alonso, C., Munguía-Guillen, J. L., Vernon-Carter E. J. (2013). Antioxidant activity degradation, formulation optimization, characterization, and stability of *Equisetum arvense*

extract nanoemulsion. *Dispersion Science and Technology*, 34: 64–71.

Hernández-Marín, N. Y., Lobato-Calleros, C., Vernon-Carter, E. J. (2013). Stability and rheology of water-in-oil-in-water multiple emulsions made with protein-polysaccharide soluble complexes. *Food Engineering*, 119: 181–187.

Hernández-Rodríguez, L., Lobato-Calleros, C., Pimentel-González, D. J., Vernon-Carter, E. J. (2014). *Lactobacillus plantarum* protection by entrapment in whey protein isolate: κ -carrageenan complex coacervates. *Food Hydrocolloids*, 36: 181–188.

Hesarinejad, M. A., Koocheki, A., Razavi, S. M. A. (2014). Dynamic rheological properties of *Lepidium perfoliatum* seed gum: Effect of concentration, temperature and heating/cooling rate. *Food Hydrocolloids*, 35: 583–589.

Huang, Q., Yu, H., Ru, Q. (2010). Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. *Food Science*, 75: 50-57.

Hunter, R. J. (1986). *Foundations of Colloid Science* (Vol. 1). Oxford: Oxford University Press.

Israelachvili, J. (2011). *Intermolecular and Surface Forces* (3a. ed.). Londres : Academic Press.

Jafari, S. M., He, Y., Bhandari, B. (2007). Optimization of nano-emulsions production by microfluidization. *European Food Research Technology*, 225: 733–741.

Jiménez-Alvarado, R., Beristain, C. I., Medina-Torres, L., Román-Guerrero, A., Vernon-Carter, E. J. (2009). Ferrous bisglycinate content and release in $W_1/O/W_2$ multiple emulsions stabilized by protein–polysaccharide

complexes. *Food Hydrocolloids*, 23: 2425–2433.

Jones, O. G., Handschin, S., Adamcik, J., Harnau, L., Bolisetty, S., Mezzenga, R. (2011). Complexation of β -Lactoglobulin fibrils and sulfated polysaccharides. *Biomacromolecules*, 12: 3056–3065.

Jones, O. G., Lesmes, U., Dubin, P., McClements, D. J. (2010). Effect of polysaccharide charge on formation and properties of biopolymer nanoparticles created by heat treatment of β -lactoglobulin–pectin complexes. *Food Hydrocolloids*, 24: 374–383.

Junyaprasert, V. B., Teeranachaideekul, V., Souto, E. B., Boonme, P., Müller, R. H. (2009). Q₁₀-loaded NLC versus nanoemulsions: Stability, rheology and in vitro skin permeation. *International Journal of Pharmaceutics*, 377: 207–214.

Kabalnov, A. (2001). Ostwald ripening and related phenomena. *Dispersion Science and Technology*, 22 (1): 1–12.

Kaltsa, O., Michon, C., Yanniotis, S., Mandala, I. (2013). Ultrasonic energy input influence on the production of sub-micron o/w emulsions containing whey protein and common stabilizers. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20: 881–891.

Khwaldia, K., Banon, S., Perez, C., Desobry, S. (2004). Properties of sodium caseinate film-forming dispersions and films. *Journal of Dairy Science*, 87: 2011-2016.

Kim, H. J., Decker, E. A., McClements, D. J. (2002). Role of postadsorption conformation changes of β -lactoglobulin on its ability to stabilize oil droplets against flocculation during heating at neutral pH. *Langmuir*, 18 (20): 7577-7583.

Klemmer, K. J., Waldner, L., Stone, A., Low, N. H., Nickerson, M. T. (2012). Complex coacervation of pea protein isolate and alginate polysaccharides. *Food Chemistry*, 130: 710–715.

Kralova, I., Sjoblom, J. (2009). Surfactants used in food industry: a review. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 30 (9): 1363-1383.

Krzeminski, A., Prell, K. A., Weiss, J., Hinrichs J. (2014). Environmental response of pectin-stabilized whey protein aggregates. *Food Hydrocolloids*, 35: 332-340

Lam, R S.H., Nickerson, M. T. Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure–function approach. *Food Chemistry*, 141 975–984.

Leal-Calderon, F., Thivilliers, F., Schmitt, V. (2007). Structured emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 12: 206-212.

Lee, S. J., Choi, S. J., Li, Y., Decker, A., McClements, D. J. (2011). Protein-stabilized nanoemulsions and emulsions: comparison of physicochemical stability, lipid oxidation, and lipase digestibility. *Agricultural and Food Chemistry*, 59: 415-427.

Leong, T. S. H., Wooster, T. J., Kentish, S. E., Ashokkumar, M. (2009). Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16: 721-727.

Leroux, J., Langendorff, V., Schick, G., Vaishnav, V., Mazoyer, J. (2003). Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydrocolloids*, 17: 455–462.

Li, T., Li, S., Wang, N., Liu J. (2008). Physicochemical properties and partial structural features of haw pectin. *European Food Research*

Technology, 227:1035–1041

Lobato-Calleros, C., Recillas-Mota, M.T., Espinosa-Solares, T., Álvarez-Ramírez, J., Vernon-Carter, E.J. (2009). Microstructural and rheological properties of low-fat stirred yoghurts made with skim milk and multiple emulsions. *Journal of Texture Studies*, 40: 657-675.

Lobato-Calleros, C., Rodríguez, E., Sandoval-Castilla, O, Vernon-Carter, E.J., Álvarez-Ramírez, J. (2006). Reduced-fat white fresh cheese-like products obtained from $W_1/O/W_2$ multiple emulsions: viscoelastic and high-resolution image analyses. *Food Research International*, 39: 678-685.

Lobato-Calleros, C., Sosa-Pérez, A., Rodríguez-Tafoya, J., Sandoval-Castilla, O., Pérez-Alonso, C., Vernon-Carter, E. J. (2010). Structural and textural characteristics of reduced-fat cheese-like products made from $W_1/O/W_2$ emulsions and skim milk. *LWT - Food Science and Technology*, 41(10): 1847-1856.

Lobo, Ll., Svereika, A. (2003). Coalescence during emulsification. 2. Role of small molecule surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science*, 261: 498-507.

Martínez-Ruvalcaba, A., Chornet, E., Rodríguez, D. (2007). Viscoelastic properties of dispersed chitosan/xanthan hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, 67(4): 586-595.

Mason, T. G., Wilking, J. N., Meleson, K., Chang, C. B., Graves, S. M. (2006). Nanoemulsions: Formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18 (41): 635-666.

Mayer, S., Weiss, J., McClements, D. J. (2013). Behavior of vitamin E acetate delivery systems under simulated gastrointestinal conditions: *Lipid*

digestion and bioaccessibility of low-energy nanoemulsions. *Colloid and Interface Science*, 404: 215–222

McClements, D. J. (2005). *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques*, 2a. ed. Boca Raton: CRC Press.

McClements, D. J., Rao, J. (2011). Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical Reviews. En: Food Science and Nutrition*, 51(4): 285-330.

Morrison, I. D., Ross, S. (2002). *Colloidal dispersions: Suspensions, Emulsions, and Foams*. Nueva York: Wiley.

Mousazadeh, M., Mousavi, S. M., Emam-Djomeh, Z., Hadi-Nezhad, M., Rahmati, N. (2013). Stability and dynamic rheological characterization of spread developed based on pistachio oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 56:133–139.

Muñoz, J., Alfaro, M. C., Zapata, I. (2007). Avances en la formulación de emulsiones. *Grasas y Aceites*, 58 (1): 64–73.

Murillo-Martínez, M. M., Pedroza-Islas, R., Lobato-Calleros, C., Martínez-Ferez, A., Vernon-Carter, E. J. (2011). Designing $W_1/O/W_2$ double emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes for producing edible films: Rheological, mechanical and water vapour properties. *Food Hydrocolloids*, 5: 577-585.

Nam, Y. S., Kim, J-W., Park, J-Y., Shim, J., Lee, J. S., Han, S. H. (2012). Tocopheryl acetate nanoemulsions stabilized with lipid–polymer hybrid emulsifiers for effective skin delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 94: 51–57.

Nieto-Ángel, R., Pérez-Ortega, S. A., Nuñez-Colín, C. A., Martínez-

Solís, J., González-Andrés, F. (2009). Seed and endocarp traits as markers of the biodiversity of regional sources of germplasm of tejocote (*Crataegus spp.*) from Central and Southern Mexico. *Scientia Horticulturae*, 121: 166–170.

Noor El-Din, M. R., El-Gamal, I. M., El-Hamouly, S. H., Mohamed, H. M., Mishrif, M. R., Ragab, A. M. (2013). Rheological behavior of water-in-diesel fuel nanoemulsions stabilized by mixed surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 436: 318–324.

Ostertag, F., Weiss, J., McClements, D. J. (2012). Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. *Journal of Colloid and Interface Science*, 388: 95–102.

Ogawa, S., Decker, E. A., McClements, D. J. (2003). Influence of environmental conditions on stability of O/W emulsions containing droplets stabilized by lecithin-chitosan membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18): 5522-5527.

Paraskevopoulou, A., Boskou, D., Kiosseoglou, V. (2004). Stabilization of olive oil–lemon juice emulsion with polysaccharides. *Food Chemistry*, 90: 627–634.

Park, J. M., Muhoberac, B. B., Dubin, P. L., Xia, J. (1992). Effects of protein charge heterogeneity in protein polyelectrolyte complexation. *Macromolecules*, 25: 290–295.

Pérez, G. M. B., Krochta, J. (2001). Lipid particle size effect on the water vapor permeability and mechanical properties of whey protein/beeswax emulsion films. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 49: 996-1002.

Perrechil, F. A., Cunha R. L. (2010). Oil-in-water emulsions stabilized by sodium caseinate: Influence of pH, high-pressure homogenization and locust bean gum addition. *Food Engineering*, 97: 441–448.

Peshkovsky, A. S., Peshkovsky, S. L., Bystryak, S. (2013). Scalable high-power ultrasonic technology for the production of translucent nanoemulsions. *Chemical Engineering and Processing*, 69: 77–82.

Piorkowski, D. T., McClements, D. J. (2013). Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications *Food Hydrocolloids*, 1–37.

Qian, C., Decker, E. A., Xiao, H., McClements, D. J. (2011). Comparison of biopolymer emulsifier performance in formation and stabilization of orange oil-in-water emulsions. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 88 (1): 47-55.

Quintanilla-Carvajal, M., Camacho-Díaz, B., Meraz-Torres, L., Chanona-Pérez, J., Alamilla-Beltrán, L., Jiménez-Aparicio, A. (2010). Nanoencapsulation: A new trend in food engineering processing. *Food Engineering Reviews*, 2: 39-50.

Ramírez-Santiago, C., Lobato-Calleros, C., Espinosa-Andrews, H., Vernon-Carter, E. J. (2012). Viscoelastic properties and overall sensory acceptability of reduced-fat Petit-Suisse cheese made by replacing milk fat with complex coacervate. *Dairy Science and Technology*, 92: 383–398.

Rao, J. J., McClements, D. J. (2010). Stabilization of phase inversion temperature nanoemulsions by surfactant displacement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 7059-7066.

Rao, J., McClements, D. J. (2011). Food-grade microemulsions and

nanoemulsions: Fabrication from sucrose monopalmitate & lemon oil. *Food Hydrocolloids*, 25: 1413–1423.

Rao, J., McClements, D. J. (2012) Food-grade microemulsions and nanoemulsions: Role of oil phase composition on formation and stability. *Food Hydrocolloids*, 29: 326-334.

Rao, M. A. (1999). *Rheology of Fluid and Semisolid Foods*. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc.

Rodríguez-González, F. J., Ramsay, B. A., Favis, B. D. (2004). Rheological and thermal properties of thermoplastic starch with high glycerol content. *Carbohydrate Polymers*, 58: 139-147.

Ross-Murphy, S. B. (1984). Rheological methods. En: *Biophysical Methods in Food Research*. (Cham, H. W. S., ed.) (pp. 138-199). Palo Alto CA: Blackwell.

Ross-Murphy, S. B. (1988). Small deformation measurements. En *Food Structure- Its Creation and Evaluation*. (pp. 387-400) (Blanshard, J. M. V., Mitchel, J. R. Mitchel, eds.). Londres: Woodhead Publishing in Food Science, Technology and Nutrition Series.

Ru, Q., Wang, Y., Lee, J., Ding, Y., Huang, Q., (2012). Turbidity and rheological properties of bovine serum albumin/pectin coacervates: Effect of salt concentration and initial protein/polysaccharide ratio. *Carbohydrate Polymers*, 88: 838–846.

Saberi, A. H., Fang, Y., McClements, D. J. (2013). Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: Factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *Journal of Colloid and Interface Science*, 391: 95–102.

Salvia-Trujillo, L., Qian, C., Martín-Belloso, O., McClements, D. J. (2013). Influence of particle size on lipid digestion and β -carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions. *Food Chemistry*, 141: 1472–1480.

Schultz, T. H. (1965). Determination of the degree of esterification of pectin, determination of the ester methoxyl content of pectin by saponification and titration. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 5: 189–194.

Siew, C. K., Williams, P. A. (2008). Role of protein and ferulic acid in the emulsification properties of sugar beet pectin. *Agricultural and Food Chemistry*, 56: 4164–4171.

Singh, R., Hussein, G. A., Pitt, W. G. (2012). Phase transitions of nanoemulsions using ultrasound: Experimental observations. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19: 1120–1125.

Singthong, J., Cui, S. W., Ningsanond, S., Goff, H. D. (2004). Structural characterization, degree of esterification and some gelling properties of Krueo Ma Noy (*Cissampelospareira*) pectin. *Carbohydrate Polymers*, 58: 391-400.

Sonneville-Aubrun, O.; Simonnet, J. T., L'Alloret, F. (2004). Nanoemulsions: A new vehicle for skincare products. *Colloid Interface Science*, 108: 145-149.

Sonneville-Aubrun, O., Babayan, D., Bordeaux, D., Lindner, P., Rata, G., Cabane, B. (2009). Phase transition pathways for the production of 100 nm oil-in-water emulsions. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 11 (1): 101-110.

Sriamornsak, P., Thirawong, N., Puttipatkhachorn, S. (2004).

Morphology and buoyancy of oil-entrapped calcium pectinate gel beads. *The AAPS Journal*, 6, article 24.

Sriamornsak, P., Thirawong, N., Puttipatkhachorn, S. (2005). Emulsion gel beads of calcium pectinate capable of floating on the gastric fluid: Effect of some additives, hardening agent or coating on release behavior of metronidazole. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24: 363–373.

Stauffer, C. E. (1999). *Emulsifiers*. St. Paul, MN: Eagen Press.

Steffe, J. F. (1996). *Rheological Methods in Food Process Engineering*. Michigan: East Lansing: Freeman Press.

Tadros, F. T. (2009). *Emulsion Science and Technology*, 1a. ed. Weinheim, Alemania: Wiley-VCH.

Tadros, F. T. (1994). Fundamental principles of emulsion rheology and their applications. *Colloids and Surfaces A*, 91: 39–55.

Thomas, J.C. (1986). The determination of log normal particle size distributions by dynamic light scattering. *Colloid Interface Science*, 117: 187-192.

Troncoso, E., Aguilera, J. M., McClements, D. J. (2012). Fabrication, characterization and lipase digestibility of food-grade nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*, 27: 355-363.

Tunick, M. H., Nolan, E. J., Shieh, J. J., Basch, J. J., Thompson, M. P., Maleeff, B. E., Holsinger, V. H. (1990). Cheddar and cheshire rheology. *Journal of Dairy Science*, 73: 1671–1675.

Vivar-Vera, M. A., Salazar-Montoya, J.A., Calva-Calva, G., Ramos-Ramírez, E. G. (2007). Extraction, thermal stability and kinetic behavior of

pectinmethylesterase from hawthorn (*Crataegus pubescens*) fruit. *LWT-Food Science and Technology*, 40: 278–284

Walstra, P. (2003). *Physical Chemistry of Foods*. Nueva York: Marcel Decker.

Wang, N., Zhang, C., Qi, Y., Li, T. (2007). Extraction and food chemical characterizations of haw pectins. *Science and Technology of Food Industry*, 11: 87–92.

Weiss, J., Gaysinsky, S., Davidson, M., McClements, D. J. (2009). Nanostructured encapsulation systems: food antimicrobials. En *Global issues in food science and technology*. (pp. 425-479) (Gustavo, B. C., Alan, M., David, L., Walter, S., Ken, B., Paul, C., eds.). San Diego: Academic Press.

Weiss, J., McClements, D. J. (2000). Influence of Ostwald ripening on rheology of oil-in-water emulsions containing electrostatically stabilized droplets. *Langmuir*, 16 (5): 2145–2150.

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

Yapo, B. M., (2009a). Pectin quantity, composition and physicochemical behaviour as influenced by the purification process. *Food Research International*, 42: 1197–1202.

Yapo, B. M., (2009b). Lemon juice improves the extractability and quality characteristics of pectin from yellow passion fruit by-product as compared with commercial citric acid extractant. *Bioresource Technology*, 100: 3147–3151.