



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

“MORFOLOGÍA, ESTABILIDAD Y PROPIEDADES REOLÓGICAS DE EMULSIONES MÚLTIPLES $W_1/O/W_2$ AL USAR COMPLEJOS PROTEÍNA DE LACTOSUERO-CARBOXIMETILCELULOSA COMO PELÍCULAS INTERFACIALES”

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN

CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

PRESENTA:

NANCY YARED HERNÁNDEZ MARÍN



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

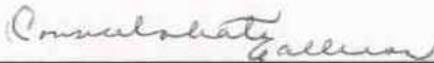


Chapingo, Estado de México, Agosto de 2011

**MORFOLOGÍA, ESTABILIDAD Y PROPIEDADES REOLÓGICAS DE
EMULSIONES MÚLTIPLES W₁/O/W₂ AL USAR COMPLEJOS PROTEÍNA DE
LACTOSUERO-CARBOXIMETILCELULOSA COMO PELÍCULAS
INTERFACIALES**

Tesis realizada por **Nancy Yared Hernández Marín** bajo la dirección del
Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito para
obtener el grado de:

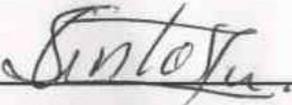
**MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
AGROALIMENTARIA**

DIRECTOR: 

DRA. CONSUELO SILVIA OLIVIA LOBATO CALLEROS

ASESOR: 

DR. EDUARDO JAIME VERNON CARTER

ASESOR: 

M.C. ARMANDO SANTOS MORENO

Chapingo, Texcoco, México, Agosto de 2011

DEDICATORIAS

*Por la valentía, el coraje y el esfuerzo,
esto, un ejemplo de lo que me han enseñado...*

...a mis mejores maestros...

- Mis Padres -

Blanca y Fausto

Por lo agradecido que está mi corazón

en compartir mi vida contigo

Al infinito y más allá

- Mi vida -

Angel

Por compartir la vida en el mismo camino

- Mis hermanos -

Dali y Pancho

Y a todos los que creyeron en mí.

pero sobre todo a los que me hicieron más fuerte...

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por financiar mis estudios de posgrado.

A la Universidad Autónoma Chapingo por haberme formado académicamente a lo largo de estos 10 años.

A la Dra. Consuelo Lobato C. por compartirme sus conocimientos, sus experiencias y consejos, pero sobre todo por haberme brindado su tiempo, amistad y confianza.

Al Dr. E. Jaime Vernon C. por su disposición y sus críticas tan atinadas y constructivas.

Al M.C. Armando Santos Moreno sus disposición confianza.

A la Dra, Ofelia Sandoval y al Dr. César por su colaboración y asesoramiento en la presente tesis.

Al Dr. Eliseo Sosa por su gran colaboración en el proyecto y sobre todo por la confianza brindada.

A Mau, Rocio y Carmina por facilitarme todos los recursos a su disposición.

A todos mis amigos y compañeros que me han brindado su amistad, sus consejos y experiencias, en especial a Lupe, Ana, Gabi, Rosi, Dzul, Abraham, Gus, Tavo, Carlos, Chuy, Elviu, Noña, Juan Carlos, por su constante apoyo humano y profesional.

Con sincero respeto y admiración...

Nancy Yared Hernández Marín

DATOS BIOGRÁFICOS

Nancy Yared Hernández Marín, obtuvo el título de Ingeniero Agroindustrial en la Universidad Autónoma Chapingo con la tesis “Manual para identificación de proteínas en leche y queso por electroforesis”. Ha recibido capacitación profesional en las áreas de Lácteos, Reología de Alimentos, Microencapsulación, Calorimetría, Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución y en Evaluación Sensorial de Alimentos.

MORFOLOGÍA, ESTABILIDAD Y PROPIEDADES REOLÓGICAS DE EMULSIONES MÚLTIPLES $W_1/O/W_2$ AL USAR COMPLEJOS PROTEÍNA DE LACTOSUERO-CARBOXIMETILCELULOSA COMO PELÍCULAS INTERFACIALES

Hernández-Marín, N.Y.; Lobato-Calleros, C; Vernon-Carter, E. J.

RESUMEN	SUMMARY
<p>El objetivo de este trabajo fue determinar la morfología, la estabilidad y las propiedades reológicas de emulsiones múltiples $W_1/O/W_2$(EM) al usar complejos proteína de lactosuero(WPC)-carboximetilcelulosa (CM) como películas interfaciales. Los valores de relación en peso WPC:CMC ($P_{WPC}:P_{CMC}$) y de pH de interacción (pH_i) para generar complejos WPC-CMC, fueron establecidos mediante determinaciones de potencial Zeta y turbidimetría.</p> <p>Se prepararon doce variaciones de EM variando los siguientes factores: pH_i (3.7, 4.0 y 4.3); relación $P_{WPC}:P_{CMC}$ (2:1 y 3:1) e incorporación secuencial (SE) y mixta (MI) de los biopolímeros.</p> <p>Las EM obtenidas estuvieron formadas por gotas de aceite teniendo 2.6 a 5.5 μm de diámetro volumétrico-superficial ($D_{3,2}$), las cuales contuvieron numerosas gotas de agua (0.2 μm de diámetro). El tamaño de gota, la estabilidad y las propiedades reológicas de las EM fueron significativamente afectados por los factores de preparación estudiados. Así el valor de pH_i más alto (4.3), una relación $P_{WPC}:P_{CMC}$ de 2:1 y la incorporación SE de WPC y CMC resultaron en EM mostrando los</p>	<p>The aim of this work was to determinate the morphology, stability, and rheological properties of multiple emulsions $W_1/O/W_2$(EM) using whey protein concentrate (WPC)-carboxymethylcellulose (CMC) complexes as interfacial films. WPC:CMC weight ratio ($P_{WPC}:P_{CMC}$) and interaction pH (pH_i) values to generate WPC-CMC complexes were established by Zeta potential and turbidimetry determinations.</p> <p>Twelve EM variations were prepared varying the following factors: pH_i (3.7, 4.0 y 4.3); $P_{WPC}:P_{CMC}$ ratio (2:1 and 3:1), and sequential (SE) and mixed (MI) incorporation of the biopolymers. The EM obtained were formed by oil droplets having 2.6 to 5.5 μm of volume-surface diameter ($D_{3,2}$), which contained numerous water droplets (0.2 μm of diameter). The droplet size, stability and rheological properties of the EM were significantly affected by the studied preparation factors. Thus, the highest pH_i value (4.3), a $P_{WPC}:P_{CMC}$ ratio of 2:1, and SE incorporation of WPC and CMC resulted in EM showing the highest values ($p \leq 0.05$) of elastic and viscous moduli (G' and G'', respectively), consistency index (K)</p>

<p>valores más altos ($p \leq 0.05$) de módulos elástico y viscoso (G' y G'', respectivamente), índice de consistencia (K) y carácter pseudoplástico. La estabilidad de las EM fue mejorada al usar un pH_i de 4.3, una relación $P_{WPC}:P_{CMC}$ de 2:1 y la incorporación SE de WPC y CMC.</p> <p>Palabras clave: emulsiones múltiples, carboximetilcelulosa, proteína de lactosuero, complejos biopoliméricos, Reología.</p>	<p>and pseudoplastic character. EM stability was improved using a pH_i of 4.3, a $P_{WPC}:P_{CMC}$ ratio of 2:1, and SE incorporation of WPC and CMC.</p> <p>Key words: multiple emulsions, carboxymethylcellulose, whey protein, biopolymer complexes, Rheology.</p>
---	--

**MORFOLOGÍA, ESTABILIDAD Y PROPIEDADES REOLÓGICAS DE
EMULSIONES MÚLTIPLES $W_1/O/W_2$ AL USAR COMPLEJOS PROTEÍNA DE
LACTOSUERO-CARBOXIMETILCELULOSA COMO PELÍCULAS
INTERFACIALES**

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Biopolímeros	3
2.1.1. Concentrado de proteína de lactosuero	5
2.1.2. Carboximetilcelulosa	5
2.2. Microencapsulación	5
2.3. Complejos biopoliméricos	6
2.4. Tensoactivos	7
2.5. Emulsiones	10
2.5.1. Estabilidad de las emulsiones	13
2.5.2. Mecanismos de desestabilización de las emulsiones	15
2.5.3. Propiedades de las emulsiones	16
2.6. Propiedades reológicas	17
2.7. Clasificación de los fluidos	18
2.7.1. Fluidos newtonianos	19

2.7.2. Fluidos no newtonianos	19
2.7.3. Materiales viscoelásticos	19
2.8. Pruebas dinámicas	20
3. OBJETIVOS	22
3.1. Objetivo general	22
3.2. Objetivos particulares	22
4. MATERIALES Y MÉTODOS	23
4.1. Materiales	23
4.2. Metodología	24
4.2.1. Determinación de los valores de potencial Zeta (Z) de los biopolímeros como función del pH.	24
4.2.2. Evaluación de la formación de complejos WPC-CMC	24
4.2.3. Variaciones de emulsiones múltiples ($W_1/O/W_2$)	25
4.2.4. Proceso de elaboración de las emulsiones múltiples	25
4.2.5. Caracterización de las emulsiones	27
4.2.5.1. Determinación del tamaño de gota de las emulsiones múltiples	27
4.2.5.2. Determinación de la tasa de coalescencia de las emulsiones múltiples	27
4.2.5.3. Análisis reológico de las emulsiones múltiples	28

4.2.6. Análisis de datos	29
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
5.1. Valores de potencial Zeta de WPC y CMC como función del pH	30
5.2. Efecto del pH y la relación en peso entre biopolímeros sobre la formación de complejos WPC-CMC	32
5.3. Tamaño de partícula y tasa de coalescencia de las emulsiones múltiples	34
5.4. Propiedades reológicas de las emulsiones múltiples	42
6. CONCLUSIONES	52
7. LITERATURA CITADA	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de microesferas y microcápsulas	6
Figura 2. Diagrama del método de elaboración de emulsiones múltiples.	12
Figura 3. Morfologías de las emulsiones múltiples caracterizadas por el número de gotas de la fase interna.	13
Figura 4. Variación del potencial Zeta de las dispersiones de CMC (0.5 % p/p) y WPC (2.0 % p/p) como función del pH.	31
Figura 5. Fotografías de mezclas de concentrado de proteína de lactosuero y carboximetilcelulosa en diferentes relaciones en peso entre biopolímeros y valores de pH.	33
Figura 6. Valores de turbidez de mezclas de concentrado de proteína de lactosuero y carboximetilcelulosa en diferentes relaciones en peso y valores de pH.	34
Figura 7. Microfotografía de gotas de emulsión interna (W_1/O). (Amplificación 100x).	35
Figura 8. Microfotografías de las gotas de aceite de las emulsiones múltiples, conteniendo numerosas gotas de agua en su interior: $EM_{2:1, pH 4.3, SE}$ (Amplificación 100 x).	36
Figura 9. Variación de los valores de diámetro volumétrico-superficial medio ($D_{3,2}$) de las gotas W_1/O de las emulsiones múltiples con el tiempo.	38
Figura 10. Variación del módulo de almacenamiento (G') de las diferentes emulsiones, en función de la deformación.	46

Figura11. Variación del módulo de pérdida (G'') de las diferentes emulsiones, en función de la deformación.	46
Figura 12. Variación del módulo de almacenamiento (G') de las diferentes emulsiones, en función de la frecuencia.	47
Figura 13. Variación del módulo de pérdida (G'') de las diferentes emulsiones, en función de la frecuencia.	48
Figura 14. Variación de la viscosidad compleja de las diferentes emulsiones como función de la frecuencia.	48
Figura 15. Variación de los valores de viscosidad aparente de las emulsiones múltiples, en función de la tasa de corte.	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de materiales de pared utilizados para la microencapsulación de distintos ingredientes alimentarios.	4
Tabla 2. Usos de algunos agentes tensoactivos de acuerdo al valor de su balance hidrofílico-lipofílico (HLB).	8
Tabla 3. Valores del balance hidrofílico-lipofílico (HLB) de tensoactivos.	9
Tabla 4. Composición de la emulsión interna (W_1/O).	26
Tabla 5. Valores de potencial zeta (\pm DE) de las dispersiones de CMC y WPC como función del pH.	31
Tabla 6. Valores del diámetro volumétrico-superficial ($D_{3,2}$) y tasa de coalescencia (C)(\pm DE) de las emulsiones múltiples.	37
Tabla 7. Análisis de Varianza Multifactorial del diámetro volumétrico-superficial y parámetros reológicos de las emulsiones múltiples.	41
Tabla 8. Valores medios de los módulo de almacenamiento (G') y de pérdida (G'')(\pm DE) de las emulsiones múltiples en la región viscoelástica lineal.	43
Tabla 9. Valores medios (\pm DE) de los parámetros ajustados al modelo de la Ley de la Potencia de las emulsiones.	51

1. INTRODUCCIÓN

Avances en el campo de la Biotecnología han permitido el descubrimiento de numerosos compuestos bioactivos con beneficios potenciales importantes para la salud del ser humano; siendo señalada la ruta oral como la forma más conveniente para su administración (Delie y Blanco-Príeto, 2005). Puesto que la biofuncionalidad de los compuestos bioactivos depende en gran medida de la preservación de su naturaleza hasta alcanzar su sitio activo, se requiere de la disponibilidad de sistemas dispersos grado alimenticio que constituyan reservorios y matrices, que permitan su protección y regulen la velocidad de su liberación (Limet *al.*, 2010). Entre estos sistemas pueden citarse micro o nanocápsulas, películas comestibles, complejos biopoliméricos, hidrogeles y micro o nanoemulsiones. Comúnmente se utilizan biopolímeros individuales o sus mezclas -polisacáridos y/o proteínas-, como materiales formadores y de pared de estos sistemas; no obstante, en la gran mayoría de los casos la funcionalidad esperada no es lograda satisfactoriamente, debido a limitantes en las propiedades de los biopolímeros y/o a la aplicación de técnicas basadas predominantemente en conocimientos empíricos. Así, las proteínas son degradadas por las enzimas de los jugos gástrico e intestinal ricos en proteasas como tripsina y quimotripsina, presentando una vida corta en el tracto gastrointestinal (Delie y Blanco-Príeto, 2005); en contraste, las proteínas exhiben excelentes propiedades emulsificantes y formadoras de películas. Por su parte los polisacáridos, en general, no poseen propiedades de actividad superficial, y no son agentes emulsificantes efectivos, pero son agentes espesantes que modifican la viscosidad de los sistemas y tienen además la capacidad de formar estructuras tipo gel (Lobato-Callero *et al.*, 2009). En adición, los polisacáridos como las gomas, son considerados como fibra soluble, por no ser metabolizados por el organismo humano (Pszczola, 2008).

Una alternativa interesante a explorar para el desarrollo de nuevos sistemas de protección y liberación controlada de agentes bioactivos, la constituye el desarrollo de complejos biopoliméricos vía interacciones electrostáticas

biopolímero-biopolímero. Las propiedades de estos complejos -mecánicas, térmicas, físicas, etc.- en general, son mejores que las de los biopolímeros individuales o sus mezclas (Van de Velde y Kiekens, 2002; Ye, 2008), con la ventaja adicional de que pueden ser moduladas a través de la variación de los factores que intervienen en las interacciones biopolímero-biopolímero.

Para la finalidad en particular de la elaboración y la estabilización de emulsiones múltiples agua-en-aceite-en-agua ($W_1/O/W_2$), sistemas termodinámicamente inestables, es factible el aprovechamiento de las interacciones entre un biopolímero con actividad superficial (de naturaleza proteínica) y otro con propiedades espesantes y de retención de agua (de naturaleza polisacárida). El complejo biopolimérico -proteína-polisacárido- formado en la interfase agua-en-aceite, pudiera dar origen a una película interfacial gruesa, viscoelástica, que favorezca la formación y la estabilidad de gotas de aceite de tamaños relativamente pequeños y homogéneos (Benichou, 2002). Las propiedades de estas emulsiones, dependerán en gran medida de la funcionalidad del complejo biopolimérico formado, por lo cual el entendimiento y el control de las interacciones presentes en complejos biopoliméricos puede contribuir al diseño de nuevos productos con una estructura, textura y funcionalidad deseada (Turgeonet *al.*, 2003). En este sentido, las propiedades reológicas de las emulsiones múltiples, pueden proporcionar bases para el entendimiento de la estructura y el proceso de formación de películas interfaciales vía interacciones entre las moléculas de los biopolímeros involucrados (Lobato-Calleros *et al.*, 2004).

Con base en lo expuesto, el objetivo de este trabajo fue determinar la morfología, la estabilidad y las propiedades reológicas de emulsiones múltiples $W_1/O/W_2$, al usar complejos carboximetilcelulosa-proteína de lactosuero como películas interfaciales.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En los países industrializados, se ha observado en los últimos años una modificación importante en los patrones dietéticos de la población, dando prioridad a una alimentación orientada a la salud. Las recomendaciones van dirigidas a la disminución de la ingesta de alimentos con altos contenidos de grasa, azúcar, colesterol y sodio, lo que ha provocado un gran auge en el consumo de productos “light” o ligeros (Martinez-Torrijos, 2003), con el fin de mantener una buena salud en general y reducir el riesgo de enfermedades del corazón (Akalin *et al.*, 2007). La obesidad en México, va en ascenso, más de la mitad de su población tiene sobrepeso y más del 15 % son obesos, acentuándose en los niños, ya que uno de cada cuatro niños de 4 a 10 años de edad tiene sobrepeso o presenta obesidad (Fausto-Guerra *et al.*, 2006). A nivel mundial, se estima que cerca de 287 millones de niños para el año 2010 tendrán obesidad y el total de la población obesa podría subir a 700 millones para el año 2015 (Donnelly *et al.*, 2008).

2.1. Biopolímeros

En la formulación de sistemas dispersos; por ejemplo emulsiones, normalmente se distinguen dos tipos de ingredientes, los emulsificantes y los estabilizantes, los cuales promueven su formación y estabilización mediante su acción interfacial. Los estabilizantes son generalmente macromoléculas (polímeros), término que comprende a las proteínas y polisacáridos; ambas macromoléculas contribuyen a la estructura, la textura y la estabilidad de los sistemas alimenticios (Jafari, 2008). Los agentes emulsificantes y encapsulantes son llamados también materiales de barrera o de pared.

Las proteínas pueden participar como agentes emulsionantes debido a que presentan actividad superficial y por tanto influyen en la formación de espumas y emulsiones aceite en agua (O/W); mientras que los polisacáridos son

conocidos como agentes espesantes o gelificantes que modifican y controlan las propiedades de flujo de la fase dispersante o continua; estos biopolímeros pueden ser de origen natural o sintético y sus propiedades son mostradas en la Tabla 1.

Tabla 1. Tipos de materiales de pared utilizados para la microencapsulación de distintos ingredientes alimentarios.

Naturaleza del biopolímero	Biopolímeros	Propiedades
Polisacáridos	Pectina, almidón, almidones químicamente modificados, alginatos, carragenina, maltodextrinas, jarabes de maíz, ciclodextrinas y derivados, sacarosa, quitosano, gomas vegetales, carboximetil-celulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, nitrocelulosa, acetilcelulosa.	Agentes espesantes, blandos e insípidos, sus dispersiones acuosas muestran viscosidad variable, proporcionan excelente protección a componentes volátiles y sobre todo son de bajo costo,
Proteínas	Gluten, caseinatos, proteína de suero de leche, gnetina, proteína de soya, albúmina.	Agentes emulsificantes, exhiben solubilidad elevada en agua y habilidad de interacción con el agua.

Fuente: Jafari (2008).

En la mayoría de los sistemas alimenticios tanto las proteínas como los polisacáridos se encuentran mezclados bajo condiciones que influyen directamente en su interrelación y formación de complejos biopoliméricos; ejemplo de ello es el pH, la concentración total y la proporción en peso entre

biopolímeros y la fuerza iónica. Las condiciones mencionadas definirán el grado de estabilidad de sistemas dispersos como las emulsiones, mediante mecanismos estéricos y electrostáticos (Benichou, 2002).

2.1.1. Concentrado de proteína de lactosuero

El concentrado de proteína de lactosuero(WPC) está constituido fundamentalmente por las proteínas solubles en el suero lácteo. Estas últimas representan alrededor del 20% del total de las proteínas de la leche y están compuestas principalmente por la β -lactoglobulina, α lactoalbúmina, albúmina sérica bovina, inmunoglobulinas y fragmentos de β -caseína (Girardet *al.*, 2002).

2.1.2. Carboximetilcelulosa

La carboximetilcelulosa (CMC) es un polisacárido aniónico lineal derivado de la celulosa y su solubilidad incrementa en función del grado de sustitución. La CMC tiene un valor de pKa de 4.0, por lo que puede ser usada para solubilizar proteínas del suero a valores de pH ácidos o para recubrir compuestos a través de la formación de complejos insolubles que pueden dar lugar a la formación de películas (Girardet *al.*, 2002);

2.2. Microencapsulación

La microencapsulación desde el punto de vista tecnológico puede definirse como el proceso de recubrimiento de compuestos, bajo la forma de moléculas, partículas sólidas o glóbulos líquidos, con materiales de distinta naturaleza, para dar lugar a partículas de tamaño micrométrico. En algunos trabajos el objetivo principal de la microencapsulación es la liberación controlada de sabores, colores, aromas, perfumes, drogas, fertilizantes, vitaminas, aceites esenciales, precursores en impresiones, compuestos de actividad biológica (ADN, fármacos, proteínas, probióticos, enzimas, etc.) e incluso células animales o

vegetales, evitando de tal forma su pérdida por oxidación ante la luz u oxígeno o la reacción con otros compuestos presentes en el alimento. El producto resultante de este proceso tecnológico recibe la denominación de “microesfera” o “microcápsula”, dependiendo de cuál sea su morfología y estructura interna. Las microcápsulas se diferencian de las microesferas principalmente por el tipo de estructura interna (Figura1). En el primer caso, el principio activo, que puede ser de naturaleza líquida o sólida, se encuentra incluido en una especie de reservorio recubierto por una fina película de material. En el caso de las microesferas, el principio activo se encuentra altamente disperso bajo la forma de diminutas partículas o de moléculas en una matriz de material que puede el mismo del recubrimiento. La obtención de un tipo de estructura u otro, depende de las propiedades fisicoquímicas del principio activo y del material de recubrimiento, así como del proceso tecnológico elegido (Lopretti, 2007).

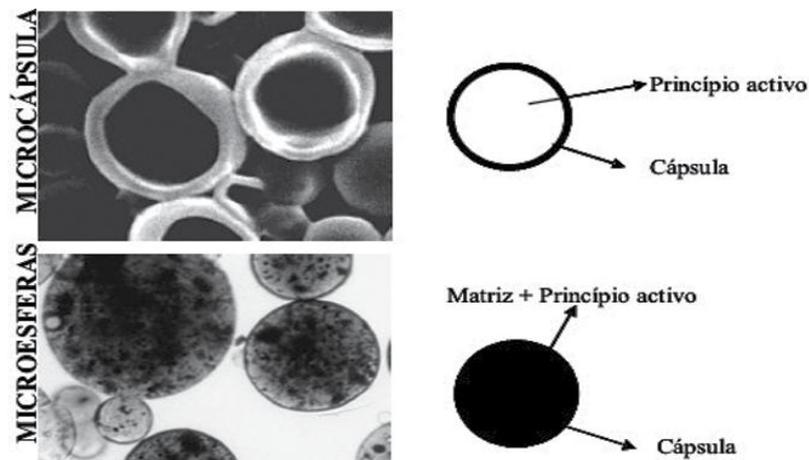


Figura 1. Estructura de microesferas y microcápsulas
Fuente: Lopretti (2007).

2.3. Complejos biopoliméricos

Las mezclas de biopolímeros determinan la capacidad hidrofílica de unamicrocápsula y por tanto su hidratación durante el almacenamiento. Su concentración en una emulsión está definida por el tamaño de gota y su

distribución unimodal, así como por su estabilidad en el tiempo. Se ha propuesto el uso de mezclas de biopolímeros, uno con actividad de adsorción superficial (proteínas) y otro con propiedades espesantes y retención de agua (polisacáridos), que interactúen entre ellos. El complejo interfacial resultante, deberá dar origen a una membrana gruesa viscoelástica y a la formación de gotas de tamaños relativamente grandes y homogéneos, este resultante da en principio, una mayor estabilidad a la fase externa de una emulsión doble (Benichou, 2002). Se ha informado que el uso de polielectrolitos con cargas opuestas da origen a la formación de complejos interpoliméricos capaces de formar y estabilizar emulsiones y espumas (Fredheim y Christensen, 2003).

Las propiedades de las emulsiones no sólo dependen de la funcionalidad de cada biopolímero por separado, sino también de las fuerzas de interacción proteína-polisacárido, las cuales pueden ser fuertes o débiles, específicas (enlaces covalentes) o no específicas (iónicas, dipolo-dipolo, van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, etc.). El entendimiento y el control de las interacciones biopolímero-biopolímero puede contribuir al diseño de nuevos productos con estructura, textura y funcionalidad deseada (Turgeonet *al.*, 2003).

La determinación del potencial Zeta -medida de la magnitud de repulsión o atracción entre partículas o potencial eléctrico entre el volumen de solución y el plano de deformación alrededor de la partícula-tanto de la proteína como del polisacárido como función del pH, permiten obtener el valor de pH en el que la interacción entre biopolímeros para formar complejos es óptima. La máxima interacción entre biopolímeros coincide con la máxima diferencia estequiométrica de cargas electrostáticas entre ambos (Weinbreck, 2004).

2.4. Tensoactivos

Un tensoactivo es un compuesto químico o mezcla de compuestos de bajo peso molecular que promueve la formación de una emulsión y le brinda estabilidad a corto plazo como consecuencia de su actividad superficial anfifílica. Estos compuestos poseen una región hidrofílica (afin al agua) y otra lipofílica (afin al aceite) (Tesch y Schubert, 2002).

Los tensoactivos forman capas monomoleculares en la interfase, aunque en ciertas condiciones pueden formar multicapas de naturaleza líquido-cristalina, que aumenta la viscoelasticidad de la interfase, favoreciendo el procesado y estabilidad de las emulsiones.

Muñoz (2007) indica que un concepto importante para la selección de un emulsionante o una mezcla de estos es el balance hidrófilo lipófilo (HLB) (Tabla 2). Los emulsionantes son de naturaleza anfifílica, pero pueden tener una mayor o menor tendencia a solubilizarse en medio oleoso o acuoso, dependiendo de la proporción de sus grupos hidrofílicos (cabezas polares o grupos etoxilados) e hidrofóbicos (cadenas hidrocarbonadas largas, $C \geq 12$) y pueden clasificarse como sigue:

Tabla 2. Usos de algunos agentes tensoactivos de acuerdo al valor de su balance hidrofílico-lipofílico (HLB).

HLB	USOS
4-6	Emulsionante (agua en aceite)
7-9	Humectante
8-18	Emulsionante (aceite en agua)
13-15	Detergente
15-18	Solubilizante

Fuente: Muñoz (2007).

Si el emulsionante es soluble en agua será útil para la preparación de emulsiones O/W y si es soluble en medio oleoso será útil para la formación de emulsiones W/O.

Otra clasificación importante de los agentes tensoactivos se basa en su carga eléctrica: aniónicos (sales de ácidos grasos, estearoil-2-lactato de sodio); catiónicos, anfóteros o zwitteriónicos (lecitina) y no iónicos (monoacilgliceroles, ésteres de ácidos grasos de sacarosa). También existen tensoactivos sintéticos, derivados de la industria del petróleo (dodecil sulfato de sodio, alcoholes grasos polietoxilados, sales alquílicas de amonio cuaternarias, alquil-betaínas) o tensoactivos derivados de materias primas alternativas (fosfolípidos a partir de lecitinas de soya y de huevo, monoglicéridos a partir de grasas y aceites interesterificados con glicerol, ésteres de sacarosa, ésteres de sorbitan, polisorbatos, etc). Se utilizan además ésteres de monoglicéridos con ácidos orgánicos del tipo: acético, láctico, diacetiltartárico y cítrico, con lo que se logran emulsionantes con propiedades anfifílicas diferentes a aquellas de los monoglicéridos (Krog, 1997). Algunos tensoactivos comerciales se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores del balance hidrofílico-lipofílico (HLB) de algunos tensoactivos utilizados como emulsionantes en la industria agroalimentaria.

Emulsionante	HLB
Ácido oleico	1.0
Monoglicéridos acetilados (ACETEM)	1.5
Trioleato de sorbitan (Spam 85)	1.8
Triestearato de sorbitan (Spam 65)	2.1
Monoestearato de propilenglicol	3.4
Monoestearato de glicerol (Monestriol GE)	3.8
Monooleato de sorbitan (Spam 80)	4.3
Poliglicerol Polirricinoleato (Grindsted PGPR)	4.3
Monoestearato de sorbitan (Spam 60)	4.6
Hexadecileterdietoxilado (Brij 52)	5.3
Monoestearato de diglicerido	5.5
Monopalmitato de sorbitan (Spam 40)	6.7

Monoestearato de triglicerol	7.0
Ésteres del ácido acetyl tartárico (Panodan DATEM)	8.0
Monopalmitato de lactoilo	8.1
Monolaurato de sorbitan (Spam 20)	8.6
Dioleato de hexaglicerol	9.0
Laurileterpolietoxilado (Brij 30)	9.7
Trioleato de sorbitan y polioxietileno (Tween 85)	10.5
Triestearato de sorbitan y polioxietileno (Tween 65)	10.9
Oleileterpolietoxilado (Brij 97)	12.4
Monogliceridoetoxilado	13.0
Octifenolpolietoxilado (Triton X-100)	13.5
Monooleato de decaglicerol	14.0
Monolaurato de sorbitanpolietoxilado (Tween 20)	14.9
Monooleato de sorbitanpolietoxilado (Tween 80)	15.0
Monopalmitato de sorbitanpolietoxilado (Tween 40)	15.6
Monolaurato de sorbitanpolietoxilado (Tween 20)	16.7
Oleato de sodio	18
Oleato de potasio	20
Estearoíl 2 lactilato de sodio	21

Fuente: Muñoz (2007);McClements (2005).

2.5. Emulsiones

Una emulsión es una dispersión coloidal de dos líquidos inmiscibles. La fase dispersa se obtiene al romper uno de los líquidos por medios mecánicos en pequeñas gotas entre 0.1 y 10 μm , que se distribuyen en la fase continua o dispersante. Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables y se pueden romper a través de diferentes procesos fisicoquímicos, dependiendo de su composición, microestructura, etc. (McClements, 2005). Las emulsiones pueden convertirse en cinéticamente estables en presencia de agentes tensoactivos (emulsionantes) que se adsorben en las superficies de las gotas y reducen la tensión superficial. Una emulsión estable es aquella que no muestra cambios notables en el tamaño y la forma de sus gotas, en su estado de agregación o en el arreglo espacial, a través de un tiempo de almacenamiento establecido (Aranberri, 2006).

Existen dos tipos posibles de emulsiones sencillas, dependiendo cuál fase esté dispersa en la otra; en una emulsión aceite-en-agua (O/W), el aceite es disperso en forma de gotas en la fase continua que es el agua y el fenómeno contrario ocurre en una emulsión agua-en-aceite (W/O). Las emulsiones múltiples o dobles son denominadas “emulsiones de emulsiones”, debido a que son sistemas de emulsión donde las gotas de la fase dispersa contienen dentro de ellas otras gotas pequeñas dispersas. Cada glóbulo disperso en una emulsión múltiple forma una estructura vesicular con un comportamiento simple o múltiple separado por una capa de aceite o de agua. Un tipo de emulsión múltiple es aquella constituida por agua-en-aceite-en-agua ($W_1/O/W_2$) (Garti, 1997). En una emulsión múltiple agua-en-aceite-en-agua ($W_1/O/W_2$) se pueden encapsular compuestos bioactivos dentro de la fase acuosa interna, de la fase oleosa intermedia y/o de la fase acuosa externa, haciendo posible el desarrollo de un sólo sistema de liberación conteniendo múltiples compuestos bioactivos, los cuales pueden ser liberados en un sitio específico, como la boca, estómago o intestino delgado (Weisset *al.*, 2006).

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

La formación de una emulsión sencilla puede realizarse en presencia de emulsificantes de bajo peso molecular y biopolímeros, tales como las proteínas lácteas (Lobato-Calleros *et al.*, 2002). La emulsión (O/W) es elaborada mediante homegenización de una fase oleosa y una fase acuosa en la presencia de uno o más emulsificantes. Durante la homogenización, los emulsificantes se adsorben en la superficie de las gotas recién formadas y reducen la tensión interfacial formando una capa protectora alrededor de las gotas, lo cual ayuda a protegerlas de la agregación mediante fuerzas repulsivas (McClements, 2006; McClements, 2007).

Para la preparación de una emulsión $W_1/O/W_2$, primero se forma una emulsión interna (W_1/O) (Figura 2) mediante el uso de emulsificantes de bajo peso molecular, en cuya fase acuosa u oleosa se encuentra solubilizado el principio activo. Posteriormente, la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ es obtenida a través de la dispersión de la emulsión interna en una dispersión acuosa de biopolímeros con actividad superficial (Musashino *et al.*, 2001; Allouche *et al.*, 2003). Los polisacáridos son usualmente añadidos a la fase acuosa de emulsiones alimenticias aceite-en-agua para mejorar su estabilidad al cremado. Su eficiencia depende de la concentración del polímero en la fase acuosa, así como también de características estructurales del polímero en sistema acuoso. La formación de una estructura de gel débil del polímero en la fase continua, causa viscosidades altas en el rango de bajo estrés e imparte propiedades elásticas adicionales al sistema completo, así el cremado de la emulsión es fuertemente inhibido (McClements, 2000).

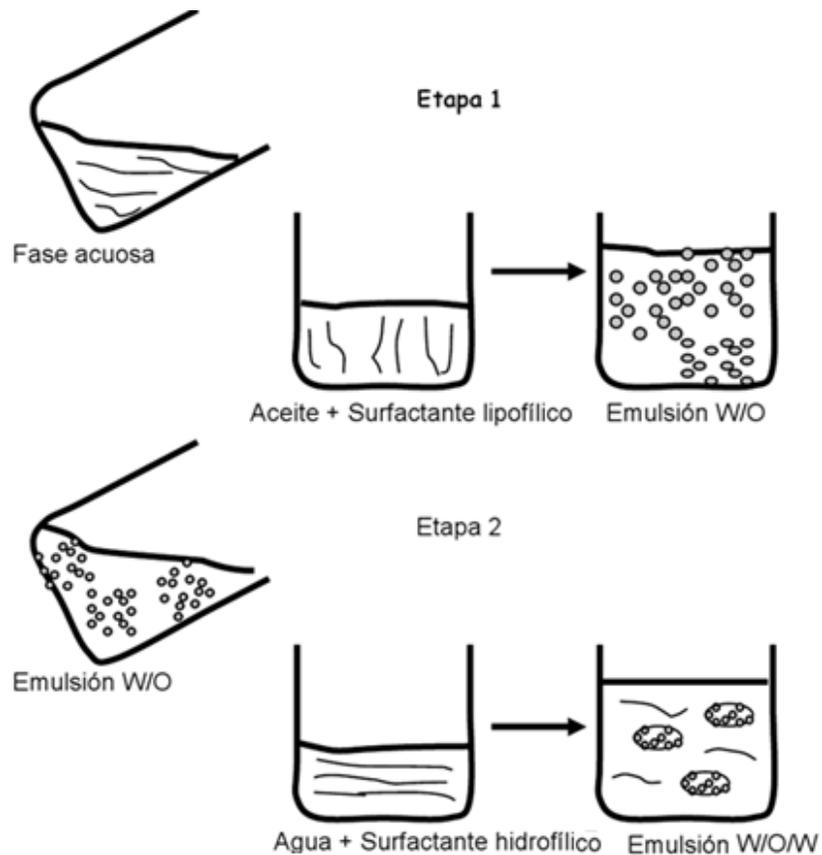


Figura 2. Diagrama del método de elaboración de emulsiones múltiples.

Dickinson y Houg (1996), informaron que conforme se incrementa la relación molar emulsificante hidrofílico (Tween 20, monolaurato de sorbitán polioxietileno) : proteína, en geles de proteínas de lactosuero conteniendo gotas de aceite emulsionadas, más proteína de la interfase es desplazada, lo cual reduce el módulo elástico del gel. Los autores antes citados, atribuyen este comportamiento a una reducción en la extensión de las interacciones entre las gotas de emulsión con la red proteínica.

La morfología de las emulsiones múltiples es variada y suelen presentarse morfologías denominadas del tipo A, cuyas gotas de la emulsión múltiple contienen una sola gota de fase interna; del Tipo B, que presentan un número pequeño de gotas internas; y del tipo C, en donde la mayoría de las gotas de la

emulsión múltiple contienen varias gotas internas, que por lo general se encuentran flocladas y cercanamente empacadas (Figura3). De acuerdo a la aplicación de la emulsión múltiple es el tipo de morfología que se prefiere; por ejemplo, si se desea tener un mejor control para la liberación de una especie, se prefiere la del tipo C, pues presenta mayor área de transferencia; si sólo se desea encapsular y proteger algún compuesto, puede emplearse la del tipo B o A (Florence y Whitehill, 1981).

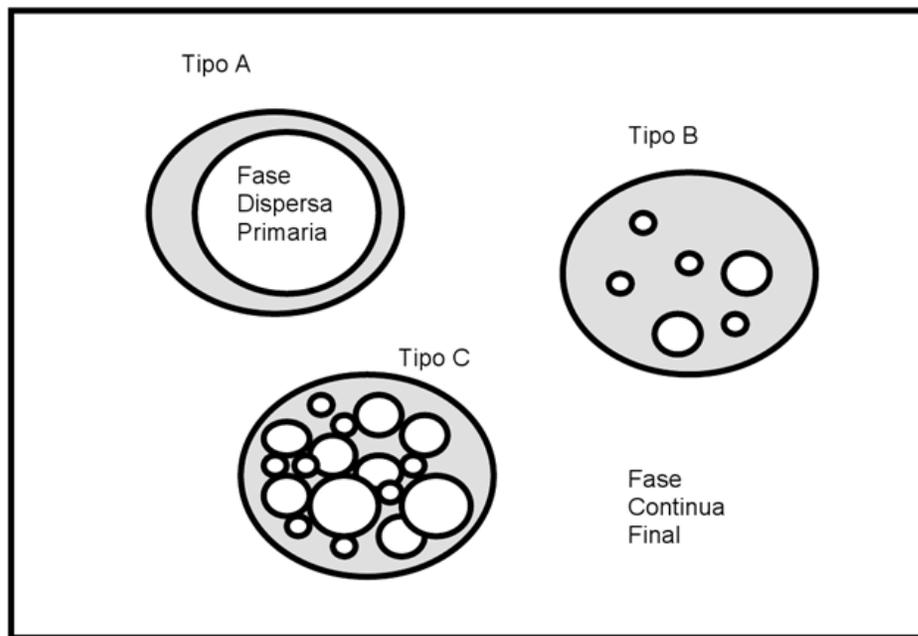


Figura 3. Morfologías de las emulsiones múltiples caracterizadas por el número de gotas de la fase interna.

Fuente: Dickinson y Houg (1996).

2.5.1. Estabilidad de las emulsiones

Existen varios factores que afectan la estabilidad de una emulsión $W_1/O/W_2$, algunos de ellos son: migración del emulsionante lipofílico de la emulsión interna (W_1/O) a la fase acuosa externa (W_2); inversión de fases de la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ a una emulsión sencilla O/W , debido al uso de emulsionante hidrofílico

en elevadas concentraciones durante la re-emulsificación de la emulsión interna en W_2 , lo que causa la formación de gotas externas tan pequeñas que ocurre una desestabilización de las gotas acuosas internas (Sela *et al.*, 1995; Jager-Lezer, 1997) y migración de agua entre la fases W_1 y W_2 , provocada por las magnitudes de los gradientes de presiónosmótica entre ambas fases y en consecuencia dependiente de la naturaleza y la concentración de los emulsionantes de la fase oleosa y de todos los ingredientes que se encapsulan en la fase acuosa interna o de aquellos que se separan de la fase acuosa externa (Ozeret *et al.*, 2000).

Otros factores físicos que intervienen en la estabilidad de las emulsiones son por un lado, la estabilización por sólidos finamente divididos, donde las partículas pequeñas de sólidos (sales básicas de metales y fragmentos celulares de plantas) pueden estabilizar una emulsión al localizarse en la interfase de los dos líquidos, donde actuarán como barrera mecánica para prevenir la coalescencia de las gotas; la distribución de las partículas sólidas en una emulsión depende de las tensiones de interfase del sistema, principalmente de la tensión entre sólido y agua (γ_{SW}); la tensión entre agua y aceite (γ_{WO}) y la tensión entre sólido y aceite (γ_{SO}) y por el otro lado, la estabilización por macromoléculas, donde las sustancias de elevado peso molecular (gomas y proteínas) son capaces de formar películas relativamente gruesas alrededor de las gotas de una emulsión, formando una barrera física contra la floculación y coalescencia. Cuando estas macromoléculas son proteínas, las moléculas se extienden y adsorben en la interfase, de forma que sus grupos no polares se orientan hacia la fase oleosa y los grupos polares hacia la fase acuosa. El efecto estabilizante sobre la emulsión se ve reflejado sobre las características reológicas o viscoelásticas y del grosor de la película proteínica (Fennema, 2000).

Según Kabalnov (1998) y Dalgleish (2006), los factores más importantes que determinan la estabilidad de una emulsión son: una barrera energética que es eléctrica en origen y que influye sobre la tasa de floculación y la distancia, que en términos finales, separa a las gotas en los agregados tridimensionales, y una barrera mecánica alrededor de las gotas de la fase dispersa, cuya estructura y propiedades afectan su resistencia a la ruptura y consecuentemente a la tasa de coalescencia.

2.5.2. Mecanismos de desestabilización de las emulsiones

El proceso de ruptura de las emulsiones puede ocurrir mediante cinco mecanismos:

Cremado o sedimentación. Se trata de un proceso causado por la acción de la gravedad y produce un gradiente de concentración vertical de las gotas, sin variar la distribución del tamaño de las mismas. El cremado describe el movimiento de las gotas hacia la parte superior del sistema, esto es debido a que la densidad de la fase dispersa es menor que la de la fase continua. Mientras que en la sedimentación las gotas migran hacia la parte inferior.

Floculación. Consiste en la adhesión o agregación de las gotas dispersas sin fusionarse, debido a las colisiones provocadas por el movimiento Browniano, y no existe una variación en la distribución de tamaño de gotas. Este proceso es reversible y está controlado por un equilibrio global entre las fuerzas de atracción electrostáticas, de van der Waals, repulsivas, de tipo estérico y de hidratación.

Coalescencia. Involucra la colisión o fusión irreversible de las gotas dispersas para crear gotas más grandes con la eliminación de parte de la interfase líquido/líquido, conduce a una reducción del área interfacial, y por ende de la energía libre superficial del sistema. Este cambio irreversible requeriría un

aporte extra de energía para restablecer la distribución de tamaño de partícula original.

Engrosamiento de gotas (Ostwaldripening). Se debe al crecimiento de las gotas más grandes a costa de las más pequeñas, hasta que estas últimas prácticamente desaparecen. Este proceso ocurre a una velocidad que es función de la solubilidad de la fase dispersa en la fase continua y se debe a que la presión interna de las gotas (presión de Laplace) es mayor en las gotas más pequeñas.

Inversión de fases. Es el proceso mediante el cual una emulsión de agua en aceite se convierte en una emulsión de aceite en agua, o viceversa.

En general, el complejo proceso de la inestabilidad de las emulsiones suele ocurrir mediante la combinación de los cuatro posibles procesos de inestabilidad, los cuales pueden suceder simultáneamente a diferentes velocidades. La mayoría de las veces, dos de los procesos anteriormente citados se suelen acoplar; por ejemplo, las velocidades de flotación en las emulsiones diluidas son más rápidas en sistemas floculados que en los no-floculados, debido al aumento del tamaño de partícula flotante en el primer caso (Aranberri, 2006).

2.5.3. Propiedades de las emulsiones

Las propiedades de las emulsiones más importantes son: facilidad de dilución (generalmente con agua, y en ocasiones con algún disolvente selectivo), viscosidad, color, estabilidad y propiedades mecánicas.

Estas propiedades dependen de las propiedades de la fase continua, el tamaño promedio de partícula de la emulsión, la relación entre la fase continua y la fase dispersa y la tensión superficial de la partícula. Por lo anterior en la formulación de una emulsión, es importante considerar el tipo, cantidad y calidad del

emulsionante, la relación entre ingredientes (agente emulsionante y agente emulsificado) y el orden en que se añaden los ingredientes de la emulsión (Mc Clements, 2005; Dalgleish, 2006).

2.6. Propiedades reológicas

Una mejor descripción del comportamiento de un sistema disperso como efecto de su estructura, puede adquirirse mediante los datos de viscosidad aparente como función de la tasa de corte. Lobato-Calleros (1987) define las características mecánicas de un material como el grupo de características físicas que surgen de la forma en la cual sus componentes estructurales están arreglados en una macro y microestructura; estas características además están relacionadas a la deformación, la desintegración y el flujo del material, bajo una fuerza, y se miden objetivamente a través de funciones de masa, tiempo y distancia (Giese, 2003).

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

La reología es la ciencia de la deformación y flujo de la materia. En otras palabras se involucra con la respuesta de los materiales a la aplicación de fuerzas y deformaciones. Los conceptos básicos de esfuerzo (fuerza por área) y deformación (deformación por longitud) son importantes para todas las evaluaciones reológicas (Tabilo-Munizaga y Barbosa-Cánovas, 2005). Todos los materiales tienen propiedades reológicas y el área de aplicación es relevante en algunos campos de estudio (Steffe, 1996).

El esfuerzo es la medida de fuerza por unidad de área superficial, expresada en Pascales (Pa). La dirección de la fuerza con respecto a la incidencia sobre el área superficial determina el tipo de esfuerzo. El esfuerzo normal (σ) ocurre cuando la fuerza es directamente perpendicular a la superficie y puede realizarse durante tensión o compresión. El esfuerzo de corte (τ) ocurre cuando la fuerza actúa en paralelo a la superficie (Tabilo-Munizaga y Barbosa-Cánovas, 2005).

Todo esfuerzo aplicado a un material le produce deformación. Las deformaciones pueden ser angulares o longitudinales, según sea el tipo de esfuerzo aplicado. Los esfuerzos normales producen deformaciones longitudinales, que pueden ser alargamientos o acortamientos, dependiendo si el esfuerzo es de tracción o compresión. Los esfuerzos tangenciales producen deformaciones angulares (Ibarz y Barbosa-Cánovas, 2005).

La deformación es una cantidad adimensional de la deformación relativa de un material; si el esfuerzo aplicado es de tensión o compresión, la deformación se conoce como ϵ y si el esfuerzo aplicado es de corte, la deformación se denota como γ (Tabilo-Munizaga y Barbosa-Cánovas, 2005).

Debido a la gran diversidad y comportamiento de los materiales, se toman puntos de referencia constituidos por sustancias ideales: al sólido ideal se le conoce como sólido de Hooke, en memoria de Robert Hooke descubridor de la elasticidad; mientras que al líquido ideal se le conoce como líquido Newtoniano, en honor a Isaac Newton (Giese, 2003).

2.7. Clasificación de los fluidos

De un modo muy general puede hacerse una primera distinción entre fluidos con comportamiento newtoniano y no newtoniano, según si su comportamiento reológico puede describirse mediante la ley de Newton de la viscosidad o no.

Además, existen alimentos en los que su comportamiento depende del tiempo de actuación del esfuerzo realizado sobre ellos. Los fluidos cuyo comportamiento es únicamente función del esfuerzo cortante se denominan independientes del tiempo, y su viscosidad, a una determinada temperatura, sólo depende de la velocidad de deformación. Los fluidos dependientes del tiempo son aquellos en los que su viscosidad depende, no sólo del gradiente de velocidad, sino también del tiempo que actúa dicho gradiente. Además, existen fluidos que presentan conjuntamente comportamiento de fluido viscoso y sólido elástico, es decir son fluidos viscoelásticos (Ibarz y Barbosa-Cánovas, 2005).

2.7.1. Fluidos newtonianos

Cuando se somete un fluido a un esfuerzo cortante, fluye y se deforma con una velocidad que crece al mismo tiempo que el esfuerzo cortante. Los líquidos simples, soluciones verdaderas, disolventes de baja masa molecular, dispersiones macromoleculares diluidas, soluciones de polímeros que no interaccionan y pastas con bajo contenido en sólidos presentan comportamiento ideal newtoniano (Ibarz y Barbosa-Cánovas, 2005).

2.7.2. Fluidos no newtonianos

Roudot (2004) señala que los fluidos no newtonianos pueden clasificarse en varias categorías relacionadas con los diferentes comportamientos reológicos; entre estos, algunos tienen un comportamiento newtoniano, con la diferencia de que es preciso alcanzar un esfuerzo cortante mínimo antes de que se produzca el flujo. Se les da el nombre de plásticos o plástico de tipo Bingham; los fluidos pseudoplásticos agrupan a la mayoría de los fluidos no newtonianos, los fluidos dilatantes tienen un comportamiento reológico opuesto al de los pseudoplásticos y son aquellos que aumentan su viscosidad al incrementar la velocidad de corte, no es común que este tipo de comportamiento se encuentre en materiales alimenticios, pero puede encontrarse en alimentos que fueron

adicionados con hidrocoloides (Hegedus *et al.*, 2000), y los fluidos plásticos de tipo Casson están próximos a los pseudoplásticos pero necesitan un esfuerzo mínimo.

2.7.3. Materiales viscoelásticos

Algunos productos semi-líquidos presentan conjuntamente propiedades de flujo viscoso y sólido elástico, denominándose viscoelásticos. El conocimiento de las propiedades viscoelásticas es muy útil en el diseño y la predicción de la estabilidad de muestras almacenadas. Los materiales viscoelásticos presentan comportamientos característicos que los diferencian notablemente de los otros fluidos (Ibarz y Barbosa-Cánovas, 2005).

Los fluidos a base de leche muestran un comportamiento reológico complejo, dependiendo principalmente de la concentración de sólidos, la temperatura, y el estado físico de sus grasas y proteínas. En leche que no ha sido calentada, los glóbulos de grasa son los que mayormente contribuyen a la reología de un producto; sin embargo, durante la elaboración de bebidas lácteas fermentadas, donde se somete la leche a un sobre calentamiento, la estructura cuaternaria de las proteínas cambia, y se producen re-arreglos que dan como resultado la formación de un gel compuesto por una compleja red de proteínas, que domina las propiedades reológicas resultantes (Steventon *et al.*, 1990) La acidificación de la fase acuosa de la leche convierte a la dispersión coloidal de la leche (comportamiento líquido) en un agregado suave de comportamiento sólido (Dickinson, 2001).

La percepción de la consistencia de un producto líquido depende casi enteramente del esfuerzo cortante que es percibido en la boca. En contraste con los sistemas newtonianos simples, muchos alimentos fluidos, incluyendo particularmente aquellos que incorporan polisacáridos, no tienen una viscosidad única ni invariable, pero muestran un marcado descenso en la viscosidad (η)

incrementando la tasa de corte. Por lo que escoger apropiadamente el régimen de corte es un punto central de atención para relacionar la viscosidad definitiva de un alimento a aquella percibida en la boca (Rao, 1999).

2.8. Pruebas dinámicas

Se utilizan pruebas dinámicas para evaluar las propiedades de sistemas viscoelásticos, determinando los valores de: módulo de almacenamiento (G'), que es una medida de la energía de deformación almacenada en la muestra durante la aplicación de esfuerzos cortantes y representa el comportamiento elástico de la muestra; módulo de pérdida (G''), que es el valor que mide la energía de deformación usada en la muestra durante la aplicación de esfuerzos cortantes y representa el carácter viscoso de la muestra (Tabino-Munizaga *et al.*, 2005; Rao, 1999; Steffe, 1996). Si G' es mayor que G'' , el material se comportará predominante como un sólido; esto es, las deformaciones pueden ser esencialmente elásticas o recuperables. En contraste, si G'' es mayor que G' , la energía usada para deformar el material es disipada por el flujo y el material se comporta predominantemente como líquido (Rao, 1999).

El factor de cedencia $\tan(\delta)$ (G''/G') revela la proporción del comportamiento viscoso al elástico ante la deformación. Un valor de $\tan(\delta)$ igual a cero corresponde a una respuesta elástica; si $\tan(\delta)$ es igual a infinito se trata de una respuesta viscosa y si $\tan(\delta)$ se encuentra mayor a cero y menor a infinito, el material muestra respuesta viscoelástica (Tabino-Munizaga y Barbosa-Cánovas, 2005).

La región viscoelástica lineal, es el rango de amplitud en el cual el módulo de almacenamiento (G') es constante. Al seleccionar grandes valores de esfuerzos y deformaciones, este rango de viscoelasticidad lineal queda fuera, y la muestra es deformada a tal grado que las uniones secundarias de las moléculas son

destruidas. La región viscoelástica lineal se puede determinar a través de barridos de esfuerzo o deformación, y la información recabada sirve para realizar otro tipo de análisis, como las pruebas de frecuencia (Steffe, 1996; Gunasekaran y Mehmet, 2000).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Determinar la morfología, la estabilidad y las propiedades reológicas de emulsiones múltiples $W_1/O/W_2$ (EM), al usar complejos proteína de lactosuero (WPC)-carboximetilcelulosa (CMC) como películas interfaciales.

3.2. Objetivos particulares

Establecer las condiciones de pH y relación en peso que permiten la formación de complejos WPC-CMC.

Establecer las variaciones y el proceso de elaboración de EM, en las los complejos WPC-CMC sirvan como agentes emulsificantes/estabilizantes de la interfase aceite-agua.

Determinar la morfología, la estabilidad y las propiedades reológicas de las EM.

Relacionar las características de las EM con los factores de formación estudiados.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

Para la preparación de los complejos biopoliméricos se utilizó concentrado de proteína de lactosuero (WPC, conteniendo 83.7% de proteína y 6.4% de grasa, Hilmar 8000, Hilmar, California 95324 EUA) y carboximetilcelulosa (CMC, CMC® CEROL 50 000, Grupo Dermat, S. A. de C. V. México). Los materiales usados para la elaboración de las emulsiones múltiples (EM), además de los complejos WPC-CMC, fueron CMC, aceite de canola (AC, Maravilla, Aceites, Grasas y Derivados, S.A. de C.V., México), mono y diglicéridos esterificados con ácido diacetiltartárico como emulsificante hidrofílico (EH, Panodan® SDK

DATEM, Danisco, S. A. de C. V., México) y ricinoleato de propilénglicol como emulsificante lipofílico (EL, GRINDSTED® PGPR 90, Danisco S. A. de C. V., México). Para ajustar los valores de pH de las dispersiones de los biopolímeros se usaron ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido de sodio, ambos en concentraciones 0.1 N y 0.5 N (J.T. Baker, Xalostoc, Estado de México, México).

4.2. Metodología

4.2.1. Determinación de los valores de potencial Zeta (Z) de los biopolímeros como función del pH.

Se prepararon dispersiones acuosas de WPC (2 % p/p) y CMC (0.5 % p/p), a temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), aplicando agitación constante durante 2 h. Posteriormente, las dispersiones se mantuvieron bajo refrigeración ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) durante 24 h para lograr hidratación completa de las moléculas de los biopolímeros. Se ajustó el valor de pH de las dispersiones de WPC y CMC en el rango de 1 a 7, usando disoluciones de NaOH y HCl, ambas en concentraciones de 0.1 y 0.5 N y un potenciómetro (Hanna Instruments®, HI98240; pH/°C Meter R-4-45 FC231D, Padova, Italia). Se determinó el

potencial zeta de las dispersiones usando el equipo Zetasizer Nano ZS90 modelo ZEN3690, Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, RU). Se construyeron gráficas de potencial Z de los biopolímeros versus pH de sus dispersiones, y a partir de éstas se determinó el rango de valores de pH, en el que existió una máxima diferencia en la magnitud de las cargas electroestáticas de signo contrario de las moléculas de los biopolímeros.

4.2.2. Evaluación de la formación de complejos WPC-CMC

La evaluación de la formación de complejos WPC-CMC se realizó espectrofotométricamente (Savant y Torres, 2000), variando el valor de pH de interacción (pH_i) entre biopolímeros en 2, 3, 4, 5 y 6 y la relación en peso WPC:CMC ($P_{WPC}:P_{CMC}$) en 1:1, 2:1, 3:1 y 4:1, respectivamente. Para este último caso se mantuvo constante la concentración de CMC en 0.5 % p/p y se varió aquella de WPC en 0.5, 1, 1.5 y 2 % p/p. Las dispersiones acuosas conteniendo WPC y CMC se ajustaron a los distintos valores de pH_i estudiados y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente. El porcentaje de transmitancia (% T) de las mezclas WPC: CMC se determinó después de 24 h de reposo a temperatura ambiente usando un espectrofotómetro (SpectronicsGenesys 5 UV/Vis, SpectronicUnicam, Rochester, N.Y. EUA) a una longitud de onda de 600 nm.

La turbidez (τ) de las combinaciones WPC:CMC se calculó mediante la siguiente ecuación (Skoog, et al. 1995):

$$(\text{Turbidez}) \tau = \left(\frac{1}{L}\right) \ln \left(\frac{I_o}{I_t}\right)$$

Donde:

τ : turbidez(cm^{-1}).

L: longitud óptica (1 cm)

I_t : intensidad de luz transmitida (%T)

I_o : intensidad de luz incidente (100)

4.2.3. Variaciones de emulsiones múltiples ($W_1/O/W_2$)

Se prepararon emulsiones múltiples $W_1/O/W_2$ (EM) usando complejos WPC-CMC como agentes emulsificantes/estabilizantes de la interfase aceite-en-agua (O- W_2). Las EM difirieron en las siguientes condiciones de formación de los complejos WPC-CMC: relación $P_{WPC}:P_{CMC}$ (2:1 y 3:1), valor de pH_i entre CMC y WPC (3.7, 4.0 y 4.3) y procedimiento de incorporación de CMC y WPC [incorporación mixta (MI) e incorporación secuencial (SE)]. A las 12 variaciones de EM resultantes de la aplicación de un experimento factorial $2 \times 3 \times 2$, les fueron asignados códigos EM con subíndices que indican la relación $P_{WPC}:P_{CMC}$, el valor de pH_i y el procedimiento de incorporación de los biopolímeros (MI y SE), respectivamente: $EM_{2:1, pH\ 3.7, MI}$; $EM_{2:1, pH\ 4.0, MI}$; $EM_{2:1, pH\ 4.3, MI}$; $EM_{3:1, pH\ 3.7, MI}$; $EM_{3:1, pH\ 4.0, MI}$; $EM_{3:1, pH\ 4.3, MI}$; $EM_{2:1, pH\ 3.7, SE}$; $EM_{2:1, pH\ 4.0, SE}$; $EM_{2:1, pH\ 4.3, SE}$; $EM_{3:1, pH\ 3.7, SE}$; $EM_{3:1, pH\ 4.0, SE}$ y $EM_{3:1, pH\ 4.3, SE}$.

4.2.4. Proceso de elaboración de las emulsiones múltiples

Las EM se prepararon mediante un procedimiento de emulsificación en dos etapas (Lobato-Callero *et al.*, 2008). En la primera etapa se preparó una emulsión interna W_1/O teniendo 40 g de fase acuosa interna (W_1) 100 g^{-1} de EM (fracción en peso $\phi_1 = 0.4$). W_1 estuvo constituida por 37.8 g de agua destilada, 0.1 g de CMC y 2.1 g de EH; mientras que la fase oleosa (O) estuvo conformada por 51.47 g de AC y 8.53 g de EL (Tabla 4). La fase acuosa W_1 se incorporó gota a gota a la fase oleosa (O) usando un homogenizador (Ultraturrax® T50 basic IKA Works, Inc. Wilmington, EUA), operado a 6 400 rpm durante 5 min.

Tabla 4. Composición de la emulsión interna (W_1/O).

Componente	Fase acuosa (W_1)	Fase oleosa (O)
------------	-----------------------	-----------------

	$\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$	$\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$
Agua destilada	37.8	-
Emulsificante hidrofílico (EH)	2.1	-
Carboximetilcelulosa (CMC)	0.1	-
Aceite canola	-	51.47
Emulsificante lipofílico (EL)	-	8.53

En la segunda etapa, la emulsión interna W_1/O ($30 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de EM, fracción en peso $\phi_2 = 0.3$) fue re-emulsificada en dispersiones acuosas externas (W_2 , $70 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ de EM), que variaron en su composición en biopolímeros y pH, de acuerdo a lo establecido para cada variación de EM. Así, para el caso de las EM en las que WPC y CMC se incorporaron por procedimiento mixto (MI), las fases W_2 contuvieron 1 o 1.5 g de WPC y 0.5 g de CMC ($P_{WPC}:P_{CMC}$ de 2:1 y 3:1, respectivamente). El valor de pH de estas fases se ajustó al pH_i establecido para las variaciones de EM mediante la adición de HCl 0.1 N, inmediatamente antes del procedimiento de re-emulsificación; este último se realizó mediante el uso del homogenizador a 4 000 rpm durante 5 min.

Para el caso de las EM en las que WPC y CMC se incorporaron por procedimiento secuencial (SE), la fase acuosa externa W_2 fue dividida en dos sub-fases: $W_{2, WPC}$ conteniendo WPC y $W_{2, CMC}$ conteniendo CMC. La fase $W_{2, WPC}$ contuvo 1 o 1.5 g de WPC y la fase $W_{2, CMC}$ contuvo 0.5 g de CMC, para obtener relaciones de $P_{WPC}:P_{CMC}$ de 2:1 o 3:1, respectivamente. La emulsión W_1/O se re-emulsificó en la fase $W_{2, WPC}$ operando el homogenizador a 4 000 rpm durante 5 min, y después de 1 h a temperatura ambiente, se adicionó la fase $W_{2, CMC}$, incorporándola mediante homogenización a 4 000 rpm durante 5 min. El pH de las fases $W_{2, WPC}$ y $W_{2, CMC}$ se ajustó previamente a los valores establecidos para cada variación de EM usando HCl 0.1 N. Todos los procesos de homogenización se realizaron usando un baño de hielo para mantener la temperatura por debajo de 40°C .

Las variaciones de EM se prepararon por triplicado aplicando un diseño experimental completamente al azar.

4.2.5. Caracterización de las emulsiones

4.2.5.1. Determinación del tamaño de gota de las emulsiones múltiples

El diámetro volumétrico-superficial medio ($D_{3,2}$) de las gotas de aceite de las EM fue medido mediante la técnica de difracción de rayo láser, usando un equipo analizador de tamaño de partícula y gota (Mastersizer 2000 modelo APA2000, Malvern Instruments, Worcestershire, RU). El diámetro lineal medio ($D_{1,0}$) de las gotas de agua de la fase acuosa interna W_1 de las EM se determinó usando un microscopio óptico (Olympus BX45, OlympusOptical Co., Tokio, Japón) acoplado a un sistema analizador de imagen (cámara digital Olympus C3030, OlympusAmerica Inc., EUA y paquete Image Pro-Plus version 4.5, Media Cybernetics, Inc., L.P., SilverSpring, EUA). Los análisis se realizaron por triplicado antes de 1 h después de preparadas las emulsiones.

4.2.5.2. Determinación de la tasa de coalescencia de las emulsiones múltiples

Se determinó la tasa de coalescencia (C) de las EM, para lo cual se mantuvieron bajo refrigeración ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) durante 28 días, periodo durante el cual se determinaron los valores $D_{3,2}$ de sus gotas de aceite y analizaron variaciones entre los mismos. Para el cálculo de la tasa de coalescencia de las EM se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$N_t = N_0 e^{(-Ct)}$$
$$N_t = 6\phi_2 10^{12} / \pi (D_{3,2} t)^3$$

Donde:

N_t : número de gotas de aceite mL^{-1} de EM con el tiempo

N_0 : número inicial de gotas de aceite mL^{-1} de EM (antes de 1 h después de elaboradas)

ϕ_2 : fracción en peso de la fase oleosa (en este caso $\phi_2 = 0.3$).

$D_{3,2}(t)$: diámetro volumétrico-superficial medio (μm) en el tiempo

t: tiempo (s)

C: tasa de coalescencia (s^{-1})

Para cada emulsión se graficó $\ln(N_i)$ contra tiempo (s) obteniéndose rectas cuyas pendientes correspondieron a los valores de C (s^{-1}) de las EM. A partir de los valores de C, las EM se clasificaron en: muy estables ($<10^{-11}$), estables (10^{-6} - 10^{-11}) e inestables ($>10^{-6}$) (Sherman, 1968).

4.2.5.3. Análisis reológico de las emulsiones múltiples

Las EM se sometieron a pruebas oscilatorias dinámicas en un reómetro Physica MCR 301 (AntonPaar, Messtechnik, Stuttgart, Alemania. La geometría usada fue cono-plato (CP50-1-SN5550), en la cual el cono rotatorio tuvo 50 mm de diámetro y un ángulo de 1° . La distancia entre cono y plato se fijó en 0.051 mm y todas las mediciones se llevaron a cabo a una temperatura de $5^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, utilizando un sistema de control y medición de temperatura Physica TEK 150P. Muestras de emulsiones (~ 2 mL) se colocaron cuidadosamente en el plato, posteriormente se sometieron a barridos de amplitud para determinar la región viscoelástica lineal, aplicando una deformación de 0.01 a 100 % y una frecuencia de 1 Hz (Sandoval-Castilla *et al.*, 2004). Posteriormente las emulsiones fueron sometidas a barridos de frecuencia a una deformación de 0.5% correspondiente, a la región en la que las EM mostraron comportamiento viscoelástico lineal, y una frecuencia de 0.1 a 10 Hz. Los valores de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') se calcularon mediante el software del reómetro (RHEOPLUS/32 V2.62).

Para determinar el comportamiento de flujo de las EM, éstas se sometieron a tasas de corte desde 10^{-3} a 10^3 s^{-1} . Mediante el software del reómetro se determinó el modelo reológico al que mejor se ajustaron los datos de las curvas de viscosidad de las EM, analizando los modelos de Ley de la potencia, Carreau, Carreau-Yasuda, Casson, Cross y Herschel-Bulkley.

Todas las mediciones reológicas de las emulsiones se realizaron por triplicado después de 24 h de su elaboración.

4.2.6. Análisis de datos

Los datos de las variables de respuesta de las EM ($D_{3,2}$, C y reológicas) se sometieron a Análisis de Varianza de Clasificación Simple, y en los casos pertinentes a pruebas de comparación de medias de Tukey. Análisis de Variancia Multifactorial se aplicó a los datos de las EM para determinar cuáles factores (pH, relación en peso entre biopolímeros, procedimiento de incorporación de los biopolímeros y/o sus interacciones) tuvieron efecto significativo sobre las variables de respuesta evaluadas en las EM. Para cada factor significativo se utilizaron pruebas de comparación de medias de Tukey para determinar cuáles medias fueron significativamente distintas de otras. La significancia se estableció en $p \leq 0.05$. El análisis estadístico se realizó con los paquetes SAS versión 9 en español (Instituto SAS, 2002) y Statgraphics Plus software (StatisticalGraphics Corp., Manugistics, Inc., Cambridge, MA).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Valores de potencial Zeta de WPC y CMC como función del pH

En la Figura 4 y Tabla 5 se muestra la variación de los valores de potencial Zeta (Z) de las dispersiones acuosas de CMC (0.5 % p/p) y WPC (2 % p/p), como función del pH. Los valores de potencial Z de CMC variaron en el rango de -6.06 mV (pH=2) a -105 mV (pH=8.0). Las moléculas de CMC exhibieron valores negativos de potencial Z en todo el intervalo de pH estudiado, debido a la presencia de grupos carboxilato ($-\text{COO}^-$) en su estructura. Los valores de potencial Z de CMC se redujeron con incrementos en la acidez de sus dispersiones, debido a disminución en la ionización de sus grupos carboxilato ($-\text{COO}^-$), acompañada de aumento en la presencia de grupos carboxílico ($-\text{COOH}$) sin carga eléctrica neta. Por su parte WPC presentó valores de potencial Z que variaron de 21.7 mV (pH=2) a -24.6 mV (pH=8.0). Las proteínas de lactosuero incluidas en WPC, presentaron una magnitud de carga global de cero a pH 4.2 (Figura4), indicativa de su punto isoeléctrico (pI). A valores de pH superiores a 4.2, las proteínas de WPC exhibieron carga negativa, como consecuencia de la ionización de sus grupos carboxílico ($-\text{COOH}$) en grupos carboxilato ($-\text{COO}^-$); en contraste, a valores de pH menores a 4.2, las proteínas contenidas en WPC adquirieron carga positiva como resultado de la ionización de sus grupos amino ($-\text{NH}_2$) en grupos $-\text{NH}_3^+$. Otros autores han informado valores de potencial Z para dispersiones de WPC, similares a los encontrados en este trabajo (Weinbrecket *al.*, 2004; Jiménez-Alvarado *et al.*, 2009; Koupantsis y Kiosseoglou, 2009).

En la Figura 4, puede observarse que el rango teórico de pH en el que las moléculas de CMC y aquellas de las seroproteínas de WPC pueden interactuar con mayor intensidad, comprende valores alrededor de 3 ± 0.5 , bajo los cuales las moléculas de WPC se encuentran cargadas positivamente y aquellas de CMC se encuentran cargadas negativamente. Los valores de

potencial Z constituyen un criterio para la selección del valor de pH al cual existirá mayor interacción atractiva entre biopolímeros para la formación de coacervados estables (Espinosa-Andrewset *al.*, 2010). Por tanto, la combinación de CMC y WPC a valores de pH cercanos a 3, deberá inducir la formación de complejos biopoliméricos insolubles o coacervados complejos.

Tabla 5. Valores de potencial zeta (\pm DE) de las dispersiones de CMC y WPC como función del pH.

pH	CMC	WPC
	Potencial Zeta (mV)	Potencial Zeta (mV)
2	-6.1 \pm 5.8	21.7 \pm 7.5
3	-25.7 \pm 3.7	15.9 \pm 4.7
4	-69.6 \pm 3.4	1.76 \pm 3.8
5	-87.2 \pm 3.5	-10.9 \pm 3.1
6	-87.6 \pm 3.3	-18.5 \pm 4.7
7	-102 \pm 3.8	-23.9 \pm 4.5
8	-105 \pm 3.3	-24.6 \pm 5.7

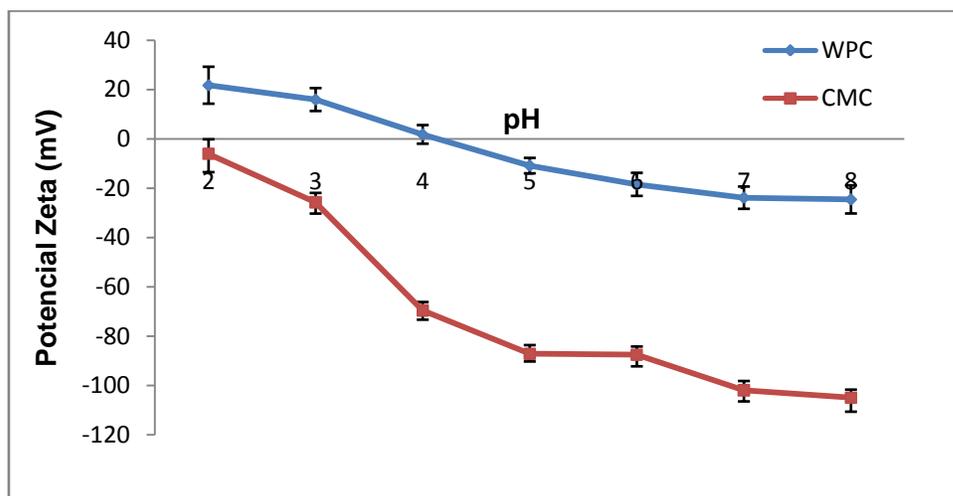


Figura 4. Variación del potencial Zeta de las dispersiones de CMC (0.5 % p/p) y WPC (2.0 % p/p) como función del pH.

5.2.Efecto del pH y la relación en peso entre biopolímeros sobre la formación de complejos WPC-CMC

Con el fin de evaluar el efecto de la relación en peso entre biopolímeros ($P_{WPC}:P_{CMC}$) y el valor de pH en la obtención de complejos WPC-CMC, se realizaron determinaciones de turbidez a mezclas de dispersiones de estos biopolímeros en relaciones $P_{WPC}:P_{CMC}$ 1:1, 2:1, 3:1 y 4:1, bajo valores de pH de 2 a 6. Al observar las fotografías tomadas a los tubos en los que se mezclaron las dispersiones de biopolímeros (Figura 5), puede apreciarse la formación de un precipitado de color blanco al mezclar dispersiones de CMC y WPC a un valor de pH de 3, en relaciones $P_{WPC}:P_{CMC}$ de 3:1 y 4:1. La naturaleza de este precipitado es atribuida a la formación del coacervado complejo WPC-CMC, cuya precipitación o insolubilización puede explicarse como resultado de la neutralización de las cargas eléctricas de las moléculas involucradas en su formación. Cuando se mezclan biopolímeros en una relación en peso y valor de pH en los que las cargas opuestas de sus moléculas presentan magnitud similar, la fuerza de atracción entre éstas es máxima y una interacción intensa se desarrolla. En este punto, los grupos ionizados de ambos biopolímeros son mutuamente neutralizados llevando a la formación de complejos insolubles (Espinosa-Andrews *et al.*, 2010).

Para relaciones $P_{WPC}:P_{CMC}$ de 1:1 y 2:1 también a un valor de pH de 3, puede observarse una marcada aparición de turbidez, pero no la formación de un precipitado, indicando ello una neutralización incompleta de las cargas eléctricas de las moléculas de CMC y WPC. Valores de pH menores o mayores a 3 estuvieron relacionados con la aparición de turbidez en menor grado que la observada a pH 3, relacionada con la formación de complejos parcialmente solubles de WPC-CMC. Los resultados expuestos pueden ser apreciados

mediante la variación de los valores de turbidez de las mezclas WPC-CMC (Figura6), pudiendo confirmarse que condiciones de pH de 3, previamente determinado como el valor de pH en el que los biopolímeros presentaron magnitudes elevadas en sus cargas de signo contrario, y relaciones $P_{WPC}:P_{CMC}$ de 3:1 y 4:1, rindieron la formación de un coacervado complejo entre las moléculas de estos biopolímeros. Ha sido demostrado que biopolímeros catiónicos y aniónicos pueden formar complejos solubles e insolubles dependiendo del pH de la solución y de las relaciones en peso de los biopolímeros en la mezcla, como una función de la carga neta del complejo (Vinayahan *et al.*, 2010).

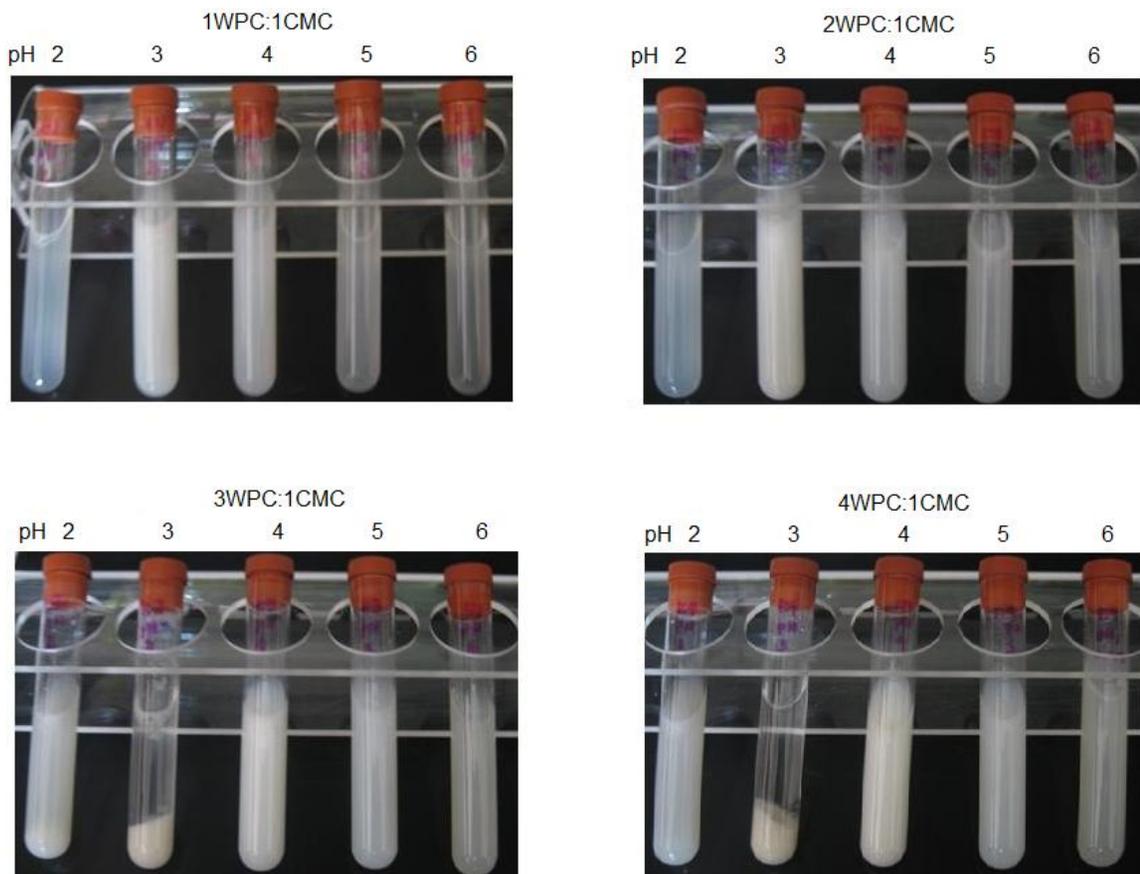


Figura 5. Fotografías de mezclas de concentrado de proteína de lactosuero y carboximetilcelulosa en diferentes relaciones en peso entre biopolímeros y valores de pH.

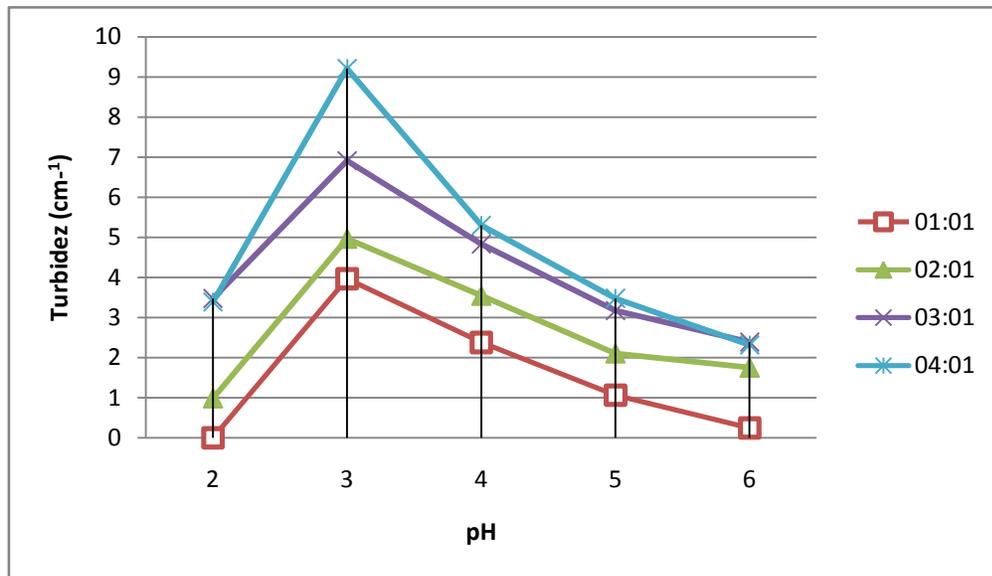


Figura 6. Valores de turbidez de mezclas de concentrado de proteína de lactosuero y carboximetilcelulosa en diferentes relaciones en peso entre biopolímeros y valores de pH.

5.3. Tamaño de partícula y tasa de coalescencia de las emulsiones múltiples

La emulsión interna (W_1/O) $\phi_{1=0.4}$ (Figura 7) estuvo formada por pequeñas gotas de agua distribuidas en la fase oleosa continua. La estabilidad de las emulsiones depende de la distribución de los tamaños de las gotas, el estado de agregación de las mismas y de la reología de la fase continua. La distribución del tamaño de las gotas se determina a partir de la energía aplicada durante la emulsificación y la naturaleza y la cantidad del agente emulsificante (Dickinson, 1992). Para el caso específico de las emulsiones internas, el emulsificante lipofílico tiene el papel de mayor importancia debido al carácter oleoso de la fase continua. Durante la preparación de las emulsiones

internas W_1/O , las moléculas del emulsificante lipofílico usado, ricinoleato de propilenglicol, se difundieron a la interfase agua-aceite, disminuyendo la tensión interfacial y confiriendo estabilidad a las gotas recién formadas (Pomeranz, 1991). En emulsiones W_1/O las cadenas lipofílicas de los emulsificantes lipofílicos adsorbidos a la superficie de las gotas de agua, penetran en la fase oleosa continua, ocurriendo interacciones hidrofóbicas emulsificante-fase oleosa llamadas fuerzas de atracción de van der Waals (Pomeranz, 1991). El proceso descrito, resulta en la formación de una película superficial que confiere estabilidad a la emulsión. La película del emulsificante lipofílico se extiende sobre el lado oleoso y la fase acuosa queda encerrada en forma de pequeñas gotas. En contraste, las moléculas del emulsificante hidrofílico usado, mono y diglicéridos esterificados con ácido diacetiltartárico, se difundieron a la interfase, penetrando a la fase acuosa mediante interacciones dipolo-dipolo (Pomeranz, 1991; Dickinson, 1992; Owusu y Zhu, 1996).

El diámetro lineal medio ($D_{1,0}$) de las gotas de agua de la fase acuosa interna W_1 en la fase oleosa fue de $0.2 \pm 0.05 \mu\text{m}$. En la Figura 7 se muestra una microfotografía de la emulsión W_1/O .

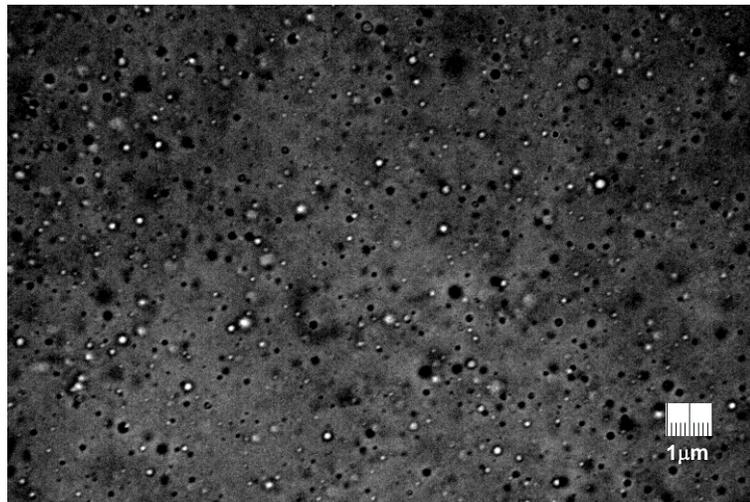


Figura 7. Microfotografía de la emulsión interna (W_1/O). (Amplificación 100x).

Las emulsiones múltiples ($W_1/O/W_2$) consistieron de gotas de aceite de emulsión interna W_1/O ($\phi_1, 0.4$) conteniendo numerosas gotas pequeñas de agua, dispersas en una fase acuosa externa W_2 ($\phi_2, 0.3$) (Figura 8). La presencia de numerosas gotas de agua en las gotas de aceite, fue la característica morfológica que permitió clasificar a las emulsiones múltiples, como del tipo C. Cuando las gotas de emulsión interna contienen una sola gota de fase dispersa, la emulsión múltiple se clasifica como tipo A; cuando la emulsión interna contiene pocas gotas de fase dispersa, la emulsión múltiple se consideran de tipo B y cuando la emulsión interna contienen numerosas gotas de fase dispersa, la emulsión múltiple se clasifica como tipo C (Garti, 1997).

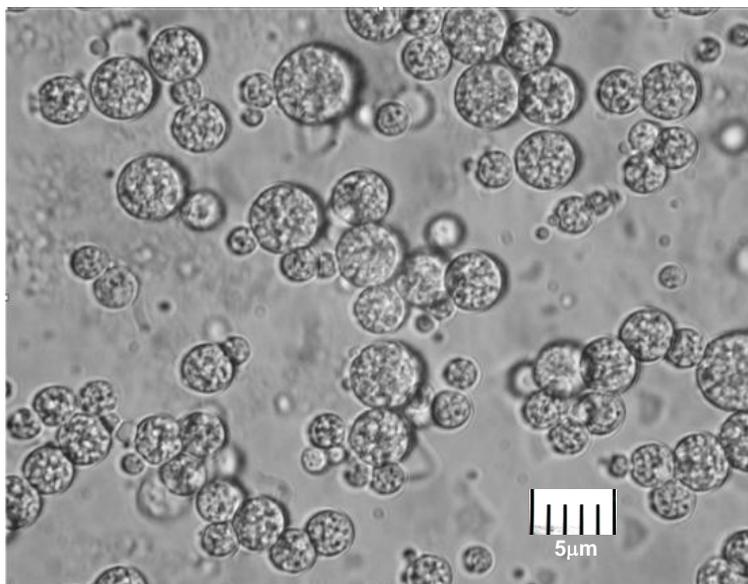


Figura 8. Microfotografía de las gotas de aceite de la emulsión $EM_{2:1}$, pH 4.3, SE- (Amplificación 100 x).

La fase acuosa W_2 usada para la preparación de las distintas variaciones de EM se ajustó a valores de pH de 3.7, 4.0 o 4.3; debido a que estos valores fueron previamente determinados como adecuados para la obtención de EM

estables. El uso de valores de pH más cercanos a 3, valor en el que ocurre la máxima interacción entre WPC y CMC, fueron descartados por no dar lugar a la formación de EM estables, como resultado de la insolubilidad del complejo WPC-CMC formado.

Las gotas de aceite de las EM mostraron diámetros volumétricos superficiales medios ($D_{3,2}$) iniciales en el rango de 2.6 μm (EM_{2:1}, pH 4.3, MI) a 5.5 μm (EM_{2:1}, pH 3.7, SE) (Tabla 6 , Figura 9). En la Figura 9 puede apreciarse que en general las EM exhibieron buena estabilidad durante los primeros 8 d de almacenamiento, después de lo cual se observaron variaciones en los valores $D_{3,2}$ de sus gotas de aceite más o menos pronunciados; siendo las emulsiones EM_{2:1}, pH 3.7, MI, EM_{2:1}, pH 4.0, MI y EM_{2:1}, pH 3.7, SE, las que mostraron variaciones importantes en el tamaño de gota después de 13 d de almacenamiento.

Tabla 6. Valores del diámetro volumétrico-superficial ($D_{3,2}$) y tasa de coalescencia (C) ($\pm\text{DE}$) de las emulsiones múltiples.

Variación de Emulsion	$D_{3,2}$ (μm)	$D_{3,2}$ (μm)	C (s^{-1})
	1h	28 d	
EM 1:2, PH 3.7, MI	3.5 \pm 0.0 ^{cd A}	28.1 \pm 2.1 ^{a B}	3.1 E ⁻⁰⁶ \pm 2.8 E ^{-07a}
EM 1:2, PH 4.0, MI	2.7 \pm 0.1 ^{g A}	13.7 \pm 1.6 ^{b B}	2.1 E ⁻⁰⁶ \pm 1.7 E ^{-07 b}
EM 1:2, PH 4.3, MI	2.6 \pm 0.0 ^{g A}	3.6 \pm 1.1 ^{d B}	1.7 E ⁻⁰⁷ \pm 7.0 E ^{-09cde}
EM 1:3, PH 3.7, MI	3.2 \pm 0.1 ^{cde A}	2.4 \pm 0.0 ^{d B}	2.8 E ⁻⁰⁷ \pm 1.4 E ^{-08cde}
EM 1:3, PH 4.0, MI	2.6 \pm 0.1 ^{g A}	3.8 \pm 1.6 ^{d B}	3.3 E ⁻⁰⁷ \pm 1.7 E ^{-08cd}
EM 1:3, PH 4.3, MI	2.7 \pm 0.1 ^{g A}	2.2 \pm 0.0 ^{d A}	1.6 E ⁻⁰⁷ \pm 4.7 E ^{-09de}
EM 1:2, PH 3.7, SE	5.5 \pm 0.1 ^{a A}	7.6 \pm 0.9 ^{c B}	4.5 E ⁻⁰⁷ \pm 2.7 E ^{-08c}
EM 1:2, PH 4.0, SE	4.1 \pm 0.1 ^{b A}	4.1 \pm 0.1 ^{d A}	1.1 E ⁻⁰⁷ \pm 5.7 E ^{-09de}
EM 1:2, PH 4.3, SE	3.6 \pm 0.1 ^{c A}	3.9 \pm 0.4 ^{d A}	4.0 E ⁻⁰⁸ \pm 8.1 E ^{-10e}

EM 1:3, PH 3.7, SE	$2.9 \pm 0.0^{efg A}$	$3.8 \pm 0.7^{d A}$	$1.1 E^{-07} \pm 5.7 E^{-09de}$
EM 1:3, PH 4.0, SE	$2.8 \pm 0.4^{fg A}$	$3.4 \pm 0.5^{d A}$	$1.2 E^{-07} \pm 5.8 E^{-09 de}$
EM 1:3, PH 4.3, SE	$3.2 \pm 0.3^{def A}$	$4.1 \pm 0.5^{d B}$	$2.3 E^{-07} \pm 1.4 E^{-08 cde}$

a, b, c, d, e, f, g Superíndices distintos en la misma columna indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$).

A, B Superíndices distintos en la misma fila indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$).

EM: emulsión múltiple; 2:1 y 3:1: relación $P_{CMC}:P_{WPC}$; MI: incorporación mixta de WPC y CMC; SE: incorporación secuencial de WPC y CMC.

Las EM presentaron valores de tasa de coalescencia (C) en el rango de $4.0 E^{-08}$ a $3.1 E^{-06} (s^{-1})$ (Tabla 6) por lo que pueden ser clasificadas como “emulsiones estables” ($10^{-6} - 10^{-11}$) (Sherman, 1968).

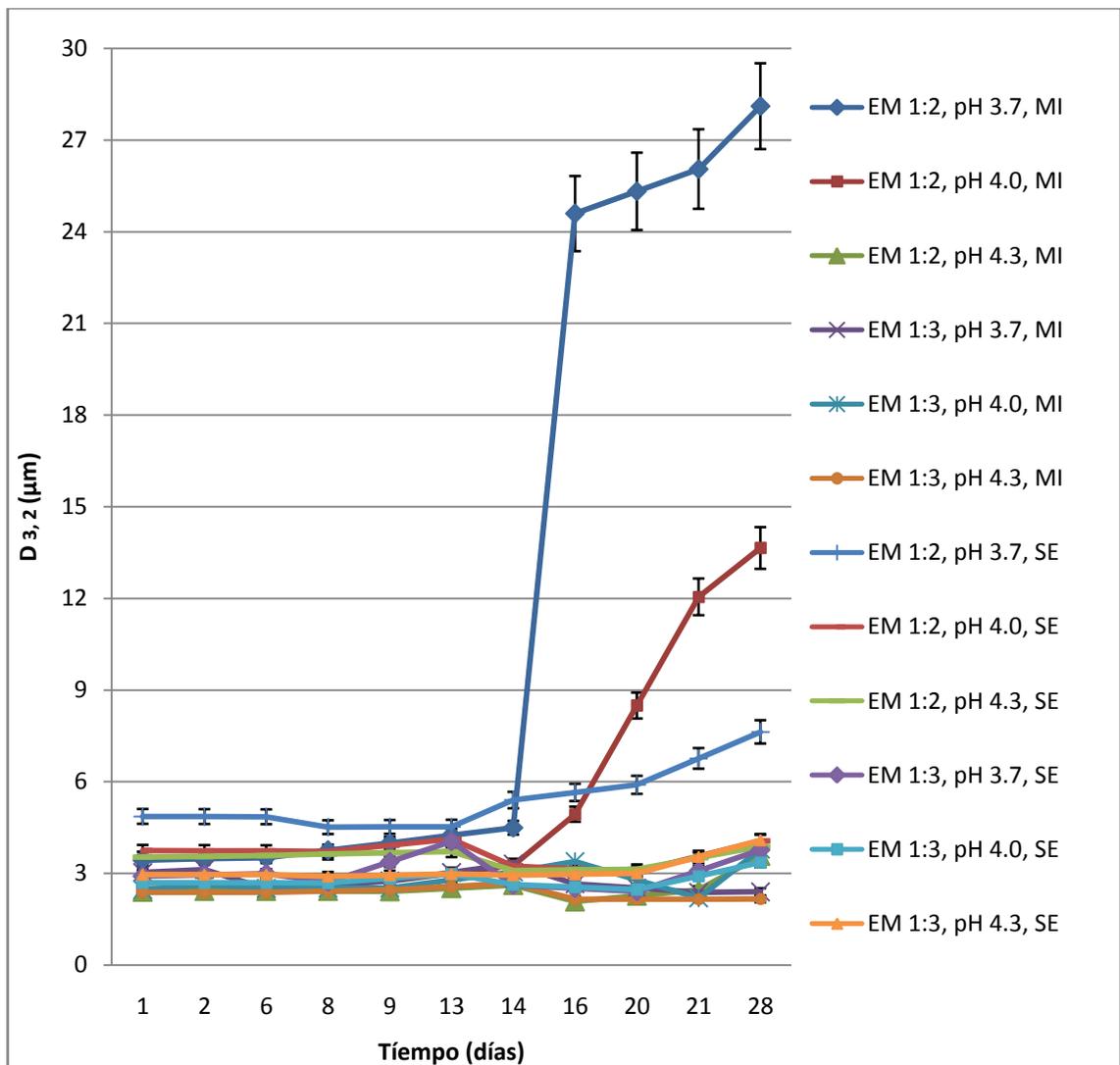


Figura 9. Variación de los valores de diámetro volumétrico-superficial medio ($D_{3,2}$) de las gotas W_1/O de las emulsiones múltiples con el tiempo.

El Análisis de Varianza Multifactorial (ANDEVAMF) reveló que los valores $D_{3,2}$ iniciales de las gotas de las EM fueron afectados significativamente por todos los factores de formación de los complejos WPC-CMC estudiados: pH_i , relación $P_{WPC}:P_{CMC}$ y procedimiento de incorporación de los biopolímeros (MI y SE) (Tabla 7). A valores de pH_i de 4.0 y 4.3 se formaron gotas de aceite de menor ($p \leq 0.05$) tamaño que a pH_i de 3.7, relacionado ello con la formación de complejos WPC-CMC con mayor solubilidad a valores de pH_i de 4.0 y 4.3 que a

pH_i de 3.7. La mayor solubilidad de los complejos WPC-CMC mejoró su actividad emulsificante/estabilizante.

Una relación P_{WPC}:P_{CMC} de 3:1 rindió gotas de aceite de menor tamaño ($p \leq 0.05$) que aquellas obtenidas al utilizar una relación 2:1 (Tabla 7); pudiendo atribuir este fenómeno a la mayor presencia de proteínas de lactosuero durante la formación de las EM_{3:1} que en las EM_{2:1}. Las proteínas son conocidas por sus propiedades emulsificantes y espumantes; mientras que los polisacáridos lo son por sus propiedades espesantes y de retención de agua (Singh *et al.*, 2003). Las propiedades emulsificantes de las proteínas permiten la obtención de gotas pequeñas de fase dispersa a través de su habilidad para adsorberse y desdoblarse rápidamente en la interfase aceite-en-agua naciente (Euston y Hirst, 2000).

La incorporación SE de WPC y CMC rindió gotas de aceite de mayor tamaño ($p \leq 0.05$) que aquellas obtenidas por la incorporación MI de los biopolímeros (Tabla 7); resultados que parecen indicar la formación de una película interfacial de mayor grosor en las EM_{SE} que en las EM_{MI}. La película interfacial de las EM_{SE} probablemente se estructuró mediante la interacción y el depósito de moléculas de CMC sobre moléculas de proteínas de lactosuero inicialmente adsorbidas a la superficie de las gotas de aceite, formando una doble película interfacial. Investigaciones en emulsiones sencillas O/W han mostrado que es posible cubrir las superficies de las gotas de aceite con membranas interfaciales consistentes de multicapas de diferentes materiales. Esta técnica está basada en el depósito capa por capa de polielectrolitos sobre superficies cargadas opuestamente a través de atracciones electrostáticas. Osawa *et al.* (2004) produjeron emulsiones O/W estables conteniendo gotas de aceite rodeadas por películas interfaciales múltiples constituidas por lecitina-quitosano-pectina, usando un proceso de preparación en tres etapas.

Los valores $D_{3,2}$ de las gotas de las EM después de 28 d de almacenamiento fueron afectados significativamente por todos los factores de formación de los complejos WPC-CMC estudiados, al igual que los valores $D_{3,2}$ iniciales. (Tabla 6 y 7). La incorporación SE de WPC-CMC rindió EM_{SE} con tamaño de gota más estable que el observado en las EM_{MI} . Lo anterior resultó en valores de tasa de coalescencia (C) menores en las EM_{SE} que en las EM_{MI} (Tabla 6). Al final del periodo de almacenamiento las gotas de las EM_{SE} exhibieron valores $D_{3,2}$ menores en comparación con aquellos determinados en las gotas de las EM_{MI} , a pesar de que las gotas de estas últimas inicialmente tuvieron un diámetro menor (Tablas 6 y Figura 9). Estos datos refuerzan la idea de la formación de películas interfaciales distintas en las EM_{SE} y EM_{MI} , lo cual en turno causó diferencias en la estabilidad de estos sistemas dispersos. Puede inferirse que la incorporación SE de WPC y CMC permitió la formación de una película interfacial doble, constituida por una película interna formada por proteínas de lactosuero adsorbidas directamente a la superficie de las gotas de aceite y una película externa conformada por moléculas de CMC interactuando con las proteínas de lactosuero. En contraste, la incorporación MI de estos biopolímeros generó la formación de complejos WPC-CMC en la fase acuosa externa W_2 , los cuales migraron y se adsorbieron en la interfase aceite-en-agua. La película interfacial doble al parecer tuvo un efecto estabilizante mayor que aquella conformada por complejos WPC-CMC sobre las gotas de aceite de las EM.

Valores de pH_i de 4.0 y 4.3 resultaron en EM con tamaño de gota más estable ($p \leq 0.05$) que aquellas en las que se ajustó el pH_i en 3.7 (Tablas 6, Figura 9). A este último valor de pH_i , la interacción entre las moléculas de WPC y CMC fue más fuerte que a valores de pH de 4.0 y 4.3 (Figura 6), causando una disminución más acentuada en la densidad eléctrica de los biopolímeros involucrados y en consecuencia también en su dispersabilidad en agua y

capacidad estabilizante de las EM. Mayor solubilidad de los complejos WPC-CMC favoreció la dispersión y estabilización de las gotas de aceite en la W_2 .

La presencia de los biopolímeros en una relación $P_{WPC}:P_{CMC}$ de 3:1, confirió mayor estabilidad a las EM con el tiempo de almacenamiento, que aquella de 2:1 (Tabla 7); por lo que puede deducirse que la habilidad emulsificante de WPC predominó sobre la actividad estabilizante de CMC para la obtención de EM con mayor estabilidad con el tiempo.

Tabla 7. Análisis de Varianza Multifactorial del diámetro volumétrico-superficial y parámetros reológicos de las emulsiones múltiples

Factor	pH _i			P _{WPC} :P _{CMC}		Incorporación biopolímeros	
	3.7	4.0	4.3	2:1	3:1	Mixta (MI)	Secuencial (SE)
D_{3,2} inicial (μm)*	3.8 ± 1.1 ^b	3.1 ± 0.7 ^a	3.0 ± 0.4 ^a	3.7 ± 1.0 ^b	2.9 ± 0.3 ^a	2.9 ± 0.4 ^a	3.7 ± 1.0 ^b
D_{3,2} final (μm)**	10.5 ± 11.1 ^b	6.2 ± 4.7 ^a	3.4 ± 0.9 ^a	8.9 ± 9.9 ^b	4.5 ± 1.6 ^a	10.1 ± 9.2 ^b	4.1 ± 0.9 ^a
G' (Pa)	0.6 ± 0.4 ^a	1.0 ± 0.4 ^b	3.0 ± 0.8 ^c	1.9 ± 1.2 ^b	1.2 ± 1.1 ^a	1.3 ± 1.0 ^a	1.8 ± 1.4 ^b
G'' (Pa)	1.2 ± 0.7 ^a	1.7 ± 0.6 ^b	3.8 ± 1.1 ^c	2.8 ± 1.4 ^b	1.7 ± 1.3 ^a	1.8 ± 1.1 ^a	2.7 ± 1.6 ^b
K (Pasⁿ)	0.5 ± 0.4 ^a	0.7 ± 0.3 ^a	2.1 ± 0.5 ^b	1.3 ± 0.8 ^b	0.9 ± 0.8 ^a	0.8 ± 0.7 ^a	1.3 ± 0.9 ^b
n (adimensional)	0.8 ± 0.1 ^c	0.7 ± 0.0 ^b	0.6 ± 0.0 ^a	0.6 ± 0.1 ^a	0.7 ± 0.1 ^b	0.7 ± 0.1 ^a	0.7 ± 0.1 ^a

^{a,b,c}: superíndices distintos en una columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre las medias.

pH_i: pH de interacción de los biopolímeros; P_{WPC}:P_{CMC}: relación en peso entre concentrado de proteína de lactosuero (WPC) y carboximetilcelulosa (CMC); MI y SE: incorporación mixta y secuencial de los biopolímeros, respectivamente; D_{3,2}: diámetro volumétrico-superficial de las gotas de aceite de las emulsiones, determinado antes de 1 h* y a los 28 días** de elaboradas; G': módulo de almacenamiento; G'': módulo de pérdida. las emulsiones; K: índice de consistencia y n: índice de comportamiento de flujo.

5.4. Propiedades reológicas de las emulsiones múltiples

Las EM son materiales viscoelásticos y sus propiedades reológicas pueden ser descritas por 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 (Murillo-Martínez *et al.*, 2011).

Las curvas de G' y G'' versus % de deformación de todas las EM (Figura 10 y 11) mostraron tendencias similares, exhibiendo una región viscoelástica lineal a bajos valores de deformación, en la que los valores de G' permanecieron prácticamente constantes, seguida de una región viscoelástica no lineal en la que los valores de G' disminuyeron pronunciadamente. Los datos de G' indicaron que la región viscoelástica lineal de las EM ocurrió en términos generales hasta una deformación máxima de 1 % a una frecuencia de 1 Hz (Figura 10). A partir de la región viscoelástica lineal una deformación de 0.5 % fue elegida para efectuar los barridos de frecuencia.

La región viscoelástica lineal está relacionada con la cantidad de esfuerzo o deformación que el material bajo estudio puede soportar antes de la ruptura de su estructura y en ella las propiedades reológicas no son dependientes de la deformación o el esfuerzo aplicados (Murillo-Martínez *et al.*, 2011). En contraste, la región de comportamiento viscoelástico no lineal se ha relacionado con la ruptura y reforma de enlaces a diferentes velocidades dependiendo de la estructura del material (Lobato-Calleros *et al.*, 2006). Los distintos valores de G' y G'' mostrados por las EM indican diferencias en su comportamiento reológico y en consecuencia diferencias en su arreglo estructural. Los valores de G' y G'' en la región viscoelástica lineal de las EM variaron dependiendo de las condiciones aplicadas para su formación y estabilización (Tabla 8), pudiendo observarse que los valores de G' variaron desde 0.3 Pa (EM_{3:1}, pH 3.7, SE) hasta 4.0 Pa (EM_{2:1}, pH 4.3, SE); mientras que aquellos de G'' variaron de 0.6 Pa (EM_{3:1}, pH 3.7, MI; EM_{3:1}, pH 3.7, SE) a 5.2 Pa (EM_{2:1}, pH 4.3, SE). Los valores de G'' de todas las EM fueron más elevados que aquellos de G' bajo cualquier % de deformación,

por lo que las EM exhibieron un comportamiento reológico predominantemente viscoso, caracterizado por la disipación de la energía usada para deformar el material a través del flujo de estos sistemas dispersos (Tabino-Munizaga *et al.*, 2005; Rao, 1999; Steffe, 1996).

Tabla 8. Valores medios de los módulo de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') (\pm DE) de las emulsiones múltiples en la región viscoelástica lineal.

Codigo de emulsión	G' (Pa)	G'' (Pa)
EM 1:2, PH 3.7, MI	0.7 \pm 0.0 ^e	1.2 \pm 0.0 ^e
EM 1:2, PH 4.0, MI	1.4 \pm 0.1 ^d	2.1 \pm 0.1 ^{cd}
EM 1:2, PH 4.3, MI	3.0 \pm 0.1 ^b	3.7 \pm 0.1 ^b
EM 1:3, PH 3.7, MI	0.5 \pm 0.0 ^{ef}	0.6 \pm 0.0 ^f
EM 1:3, PH 4.0, MI	0.4 \pm 0.0 ^{ef}	0.8 \pm 0.0 ^f
EM 1:3, PH 4.3, MI	2.1 \pm 0.0 ^c	2.4 \pm 0.1 ^c
EM 1:2, PH 3.7, SE	1.1 \pm 0.0 ^d	2.3 \pm 0.1 ^c
EM 1:2, PH 4.0, SE	1.3 \pm 0.0 ^d	2.3 \pm 0.0 ^c
EM 1:2, PH 4.3, SE	4.0 \pm 0.1 ^a	5.2 \pm 0.1 ^a
EM 1:3, PH 3.7, SE	0.3 \pm 0.0 ^f	0.6 \pm 0.0 ^f
EM 1:3, PH 4.0, SE	1.2 \pm 0.1 ^d	1.9 \pm 0.2 ^d
EM 1:3, PH 4.3, SE	3.2 \pm 0.1 ^b	4.0 \pm 0.2 ^b

a, b, c, d, e, f Superíndices distintos en la misma columna indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$).

Emulsión múltiple (EM), 1:2 y 1:3 Proporción de biopolímeros CMC:WPC respectivamente, Mezcla (ME) y secuencial (SE).

El ANOVAMF (Tabla 7) indicó que los valores de G' y G'' de las EM fueron significativamente influenciados por el pH_i , la relación $P_{WPC}:P_{CMC}$ y el método de incorporación SE o MI de los biopolímeros. El carácter viscoelástico de las EM

varió de acuerdo al valor de pH_i en el orden: $EM_{pH\ 4.3} > EM_{pH\ 4.0} > EM_{pH\ 3.7}$. Estos datos indican una mayor estructuración de las películas interfaciales alrededor de las gotas de aceite de las EM al aumentar el pH_i de 3.7 a 4.3; pudiendo ello ser explicado a través de incrementos en la habilidad emulsificante/estabilizante de los complejos WPC-CMC como resultado de su mayor solubilidad. Aún cuando en este trabajo se encontró que la máxima interacción entre WPC y CMC ocurre a un pH de 3 (Figura6), valor en el que estos biopolímeros presentaron la mayor magnitud de cargas eléctricas de signo opuesto, también se detectó la formación de complejos WPC-CMC a valores de pH mayores a 3.0 y hasta alrededor de pH de 5, los cuales fueron más solubles al aumentar el pH_i . Resulta interesante la formación de complejos WPC-CMC a valores de pH de 4.0 y 4.3 muy cercanos al punto isoeléctrico de las proteínas de lactosuero contenidas en WPC (4.2) (Figura4), ya que a esos valores de pH la carga eléctrica neta de las proteínas de lactosuero fue muy cercana a 0. Estos hallazgos son acordes a lo informado por Vinayahan *et al.* (2010) acerca de la formación de complejos solubles entre proteínas de lactosuero y polisacáridos a valores de pH cercanos o por arriba del punto isoeléctrico de las primeras. Estos autores señalaron que las interacciones en estos casos ocurren entre algunas partes de las cadenas proteínicas cargadas positivamente y los grupos carboxilato del polisacárido cargados negativamente, dando origen a la formación de complejos solubles.

La relación $P_{WPC}:P_{CMC}$ también influyó en los valores de los módulos G' y G'' de las EM (Tabla 7); el uso de una relación 2:1 de WPC:CMC resultó en $EM_{2:1}$ con valores de G' y G'' , después de 24 h de preparadas, mayores significativamente a los observados en las $EM_{3:1}$ en las que hubo una mayor proporción de WPC respecto a CMC (Tablas 7 y 8). Al parecer una relación $P_{WPC}:P_{CMC}$ de 2:1 tuvo un efecto más favorable sobre la formación y adsorción en turno de complejos WPC-CMC sobre la superficie de las gotas de aceite de las $EM_{2:1}$, en comparación con el ejercido por una relación $P_{WPC}:P_{CMC}$ de 3:1. Lo anterior es

confirmado al observar que la mezcla de WPC-CMC en una relación 2:1 produjo valores relativos de turbidez mayores que los observados cuando estos biopolímeros se mezclaron en una relación de 3:1 (Figura 6). Una mayor concentración de complejos WPC-CMC pudo ser responsable del incremento en las propiedades viscoelásticas de las EM_{2:1}, respecto a aquellas determinadas en las EM_{3:1}. Se ha informado que la relación en peso proteína-polisacárido es un factor reconocido como determinante para la estabilidad a la coalescencia y el estado de agregación de las gotas de una emulsión, y en consecuencia en la determinación de las propiedades reológicas que surgen a partir de los arreglos estructurales de sus películas interfaciales (Leal-Calderón *et al.*, 2007).

El método de incorporación de los biopolímeros durante la formación de las películas interfaciales de las EM también influyó significativamente sobre el comportamiento reológico de estos sistemas dispersos (Tabla 7). La formación de una doble capa de biopolímeros mediante la incorporación secuencial de WPC y CMC rindió emulsiones EM_{SE} con mayor carácter viscoelástico que aquellas en las que los biopolímeros se incorporaron de manera mixta EM_{Mi}. Muy probablemente en las EM_{SE} se formó una película interfacial gruesa conteniendo moléculas de proteínas de lactosuero adsorbidas a la superficie de las gotas de aceite, sobre las cuales se depositaron moléculas de CMC a través de interacciones electrostáticas; en contraste en las EM_{Mi} las gotas de aceite se encontraron rodeadas por películas relativamente delgadas conformadas por complejos WPC-CMC; las primeras películas confirieron mejores propiedades viscoelásticas a estos sistemas dispersos respecto a las segundas.

En términos generales se puede ver que si $G'' > G'$, por lo que las emulsiones exhiben un comportamiento viscoso (Figura 10 y 11) (la energía usada para deformar el material es disipada por el flujo) (Tabino-Munizaga *et al.*, 2005; Rao, 1999; Steffe, 1996).

El rango viscoelástico lineal, es el rango de amplitud en el cual G' es constante en todas las emulsiones se encontró al 0.5% de deformación según la Figura 10.

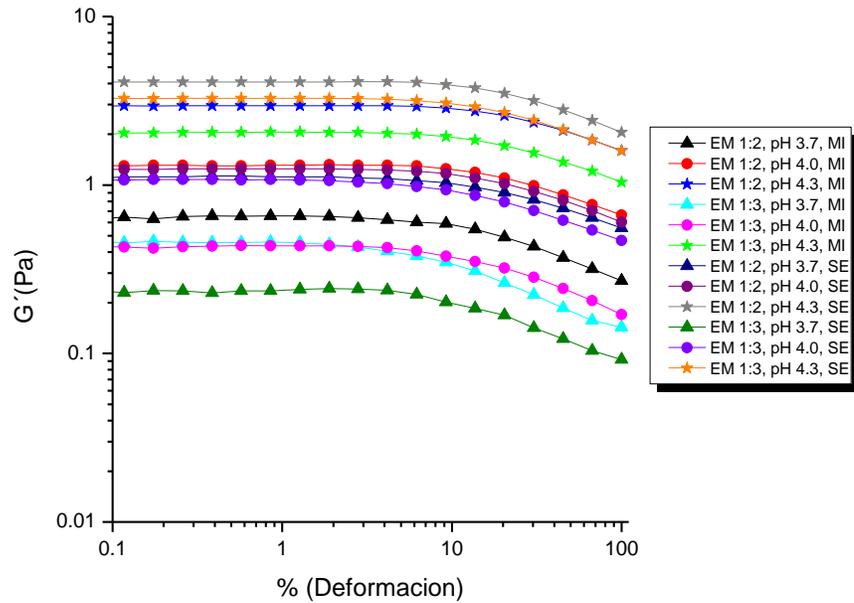


Figura 10. Variación del módulo de almacenamiento (G') de las diferentes emulsiones, en función de la deformación.

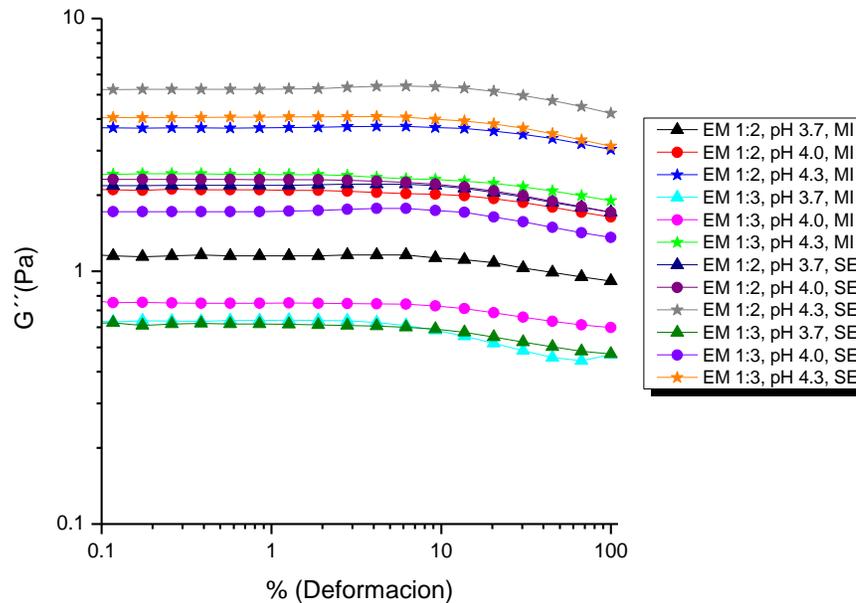


Figura 11. Variación del módulo de pérdida (G'') de las diferentes emulsiones, en función de la deformación.

Las emulsiones sometidas a barridos de frecuencia aplicando una deformación constante de 0.5 %, valor determinado mediante los barridos de amplitud efectuados previamente, como correspondiente al rango de deformación en el que la emulsión demostró comportamiento viscoelástico lineal. En la Figuras 12 y 13 se muestra la variación de los módulos G' y G'' de las emulsiones, en función de la frecuencia. Los valores de G' , incrementaron conforme se aumentó la frecuencia.

La variación de los valores de G'' siguió la misma tendencia que aquella mostrada por los valores de G' , siendo además los valores de G'' mayores a los de G' en todo el rango de frecuencia estudiado. Estos resultados señalan que la emulsión mostró el comportamiento mecánico de un material viscoelástico predominantemente líquido (Rao, 1999).

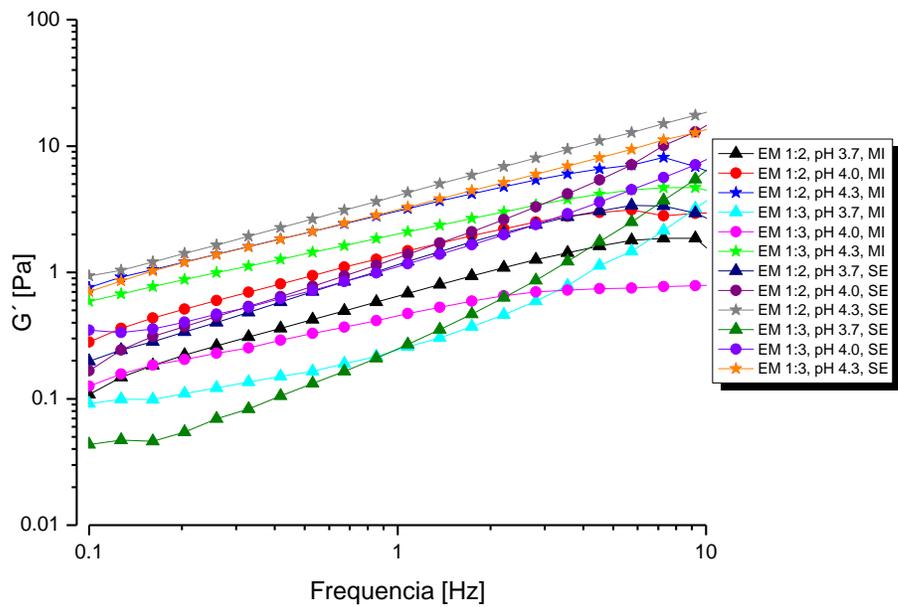


Figura 12. Variación del módulo de almacenamiento (G') de las diferentes emulsiones, en función de la frecuencia.

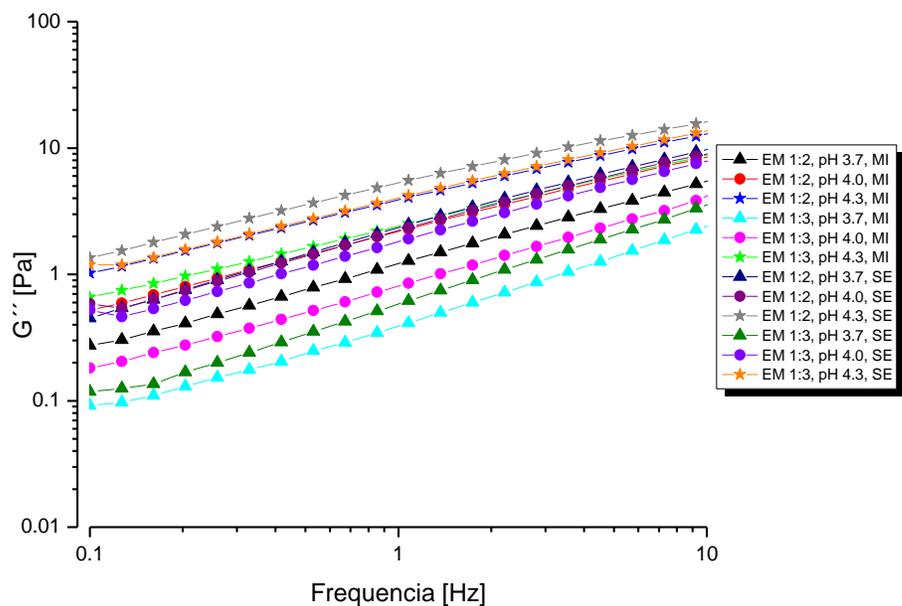


Figura 13. Variación del módulo de pérdida (G'') de las diferentes emulsiones, en función de la frecuencia.

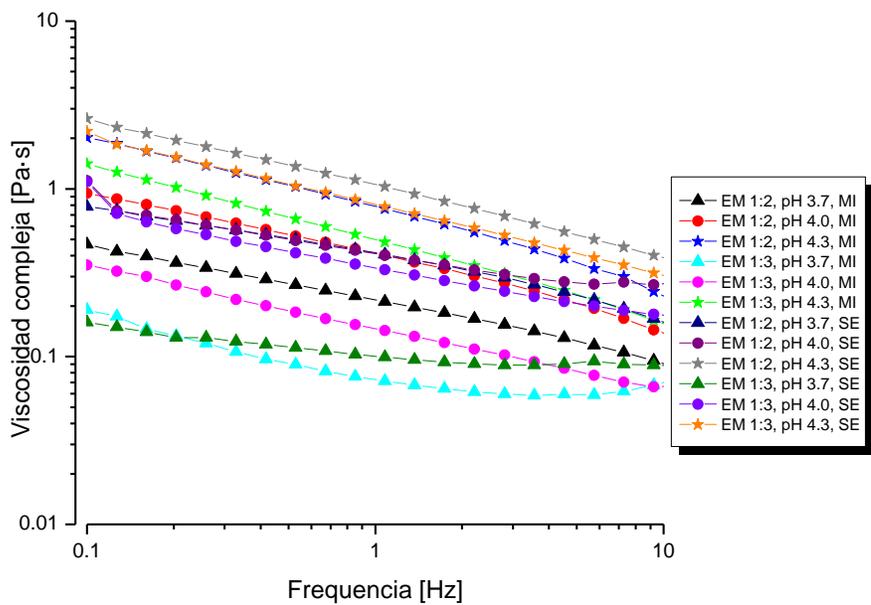


Figura 14. Variación de la viscosidad compleja de las diferentes emulsiones como función de la frecuencia.

La viscosidad compleja (η^*) de la emulsión fue relativamente alta a frecuencias bajas (~ 0.1 Hz), cuando su estructura aún mantenía su integridad; sin embargo, conforme aumentó la frecuencia, la viscosidad compleja de la emulsión disminuyó progresivamente, como consecuencia de destrucción y desorientación de su estructura.

Las curvas de viscosidad (Figura 15) mostraron que conforme aumentó la tasa de corte, la viscosidad aparente de todas las EM disminuyó, lo que representa un comportamiento no newtoniano de carácter pseudoplástico. Los fluidos pseudoplásticos presentan aumentos en el esfuerzo cortante y disminución en la viscosidad aparente con incrementos en la tasa de corte (Steffe, 1996).

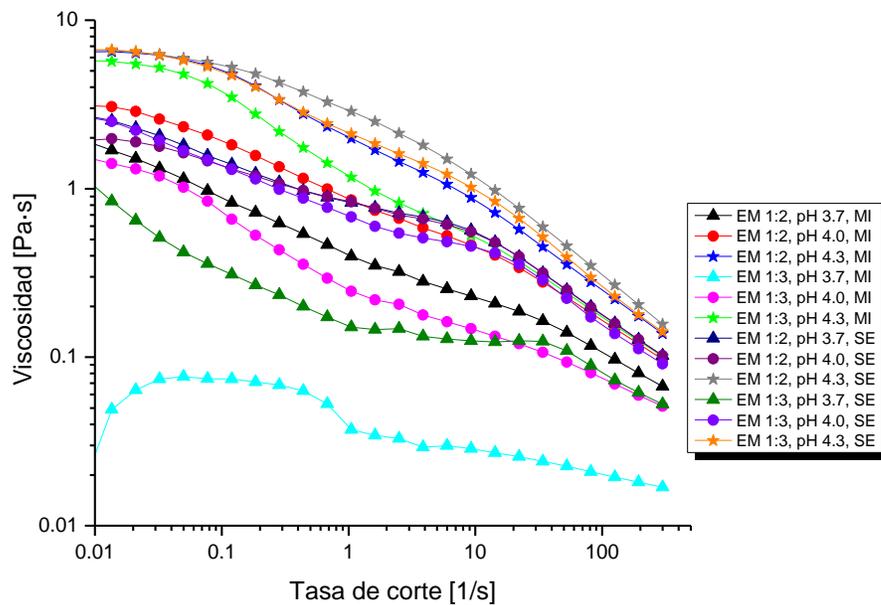


Figura 15. Variación de los valores de viscosidad aparente de las emulsiones múltiples, como función de la tasa de corte.

Las curvas de viscosidad de las EM fueron ajustadas a diversos modelos matemáticos, siendo el modelo de Ley de la Potencia el que mostró el mejor

ajuste ($R^2 = 0.98$) a los valores experimentales de viscosidad aparente (Steffe, 1996):

Modelo de Ley de la Potencia:

$$\sigma = K(\dot{\gamma})^n$$
$$\eta = K(\dot{\gamma})^{n-1}$$

Donde:

σ : *esfuerzo cortante (Pa)*

$\dot{\gamma}$: *velocidad de cizalla (s^{-1})*

K : *índice de consistencia ($Pa s^n$)*

n : *índice de comportamiento de flujo*

η : *viscosidad aparente (Pa).*

Los valores de los parámetros del modelo de Ley de la Potencia de las variaciones de EM se encuentran en la Tabla 9, pudiendo observar que todas ellas tuvieron valores de índice de flujo (n) menores a la unidad, confirmando su carácter pseudoplástico. A pesar de que todas las EM mostraron disminución en su viscosidad aparente al aumentar la tasa de corte, exhibieron diferencias en los parámetros del modelo reológico que definió su comportamiento de flujo (Tabla 9). Las condiciones de formación que afectaron significativamente los parámetros reológicos de índice de consistencia (K) e índice de flujo(n) de las EM fueron el valor de pH_i y la relación $P_{WPC:CMC}$; el método de incorporación de los biopolímeros sólo afectó significativamente el valor de K , pero no así el de n (Tabla 6). El índice de consistencia relacionado con la viscosidad de las EM aumentó ($p \leq 0.05$) con incrementos de pH_i de 3.7 a 4.3, a una relación $P_{WPC:CMC}$ de 2:1 y al aplicar el método SE de incorporación de los biopolímeros. Estos resultados son acordes a lo encontrado respecto a los módulos G' y G'' de las EM, confirmando la teoría acerca de que complejos solubles de WPC-CMC formados de manera secuencial en la interfase aceite-en-agua, utilizando una relación $P_{WPC:CMC}$ de 2:1, formaron películas interfaciales que

proporcionaron mayor resistencia a las EM, en comparación con aquellas constituidas bajo las otras condiciones estudiadas.

Tabla 9. Valores medios (\pm DE) de los parámetros ajustados al modelo de la Ley de la Potencia de las emulsiones.

Tratamiento	K	n
	(Pa s)	(adim)
EM 1:2, PH 3.7, MI	0.4 \pm 0.0 ^f	0.7 \pm 0.0 ^{bc}
EM 1:2, PH 4.0, MI	0.9 \pm 0.0 ^e	0.6 \pm 0.0 ^d
EM 1:2, PH 4.3, MI	1.9 \pm 0.0 ^c	0.6 \pm 0.0 ^e
EM 1:3, PH 3.7, MI	0.04 \pm 0.0 ^g	0.8 \pm 0.0 ^a
EM 1:3, PH 4, MI	0.3 \pm 0.0 ^{fg}	0.7 \pm 0.0 ^b
EM 1:3, PH 4.3, MI	1.4 \pm 0.1 ^d	0.5 \pm 0.0 ^f
EM 1:2, PH 3.7, SE	0.8 \pm 0.0 ^e	0.7 \pm 0.0 ^c
EM 1:2, PH 4, SE	0.8 \pm 0.0 ^e	0.7 \pm 0.0 ^c
EM 1:2, PH 4.3, SE	2.7 \pm 0.1 ^a	0.5 \pm 0.0 ^f
EM 1:3, PH 3.7, SE	0.2 \pm 0.0 ^g	0.8 \pm 0.0 ^a
EM 1:3, PH 4, SE	0.7 \pm 0.0 ^e	0.7 \pm 0.0 ^c
EM 1:3, PH 4.3, SE	2.2 \pm 0.2 ^b	0.6 \pm 0.0 ^f

a, b, c, d, e, f Superíndices distintos en la misma columna indican que las medias difieren significativamente ($p \leq 0.05$).

Emulsión múltiple (EM), 1:2 y 1:3 Proporción de biopolímeros CMC:WPC respectivamente, Mezcla (ME) y secuencial (SE).

K, índice de consistencia; n, índice de comportamiento de flujo; σ_0 , esfuerzo de fluencia.

6. CONCLUSIONES

La formación de complejos solubles e insolubles de proteína de lactosuero (WPC)-carboximetilcelulosa (CMC) ocurrió bajo valores de pH de interacción (pH_i) en el rango de 2.5 a 4.5 y relaciones en peso WPC:CMC ($P_{WPC}:P_{CMC}$) de 1:1 a 4:1, respectivamente.

El uso de complejos solubles WPC-CMC como agentes emulsificantes/estabilizantes de la interfase aceite-agua ($O-W_2$) resultó en la formación de emulsiones múltiples agua-en-aceite-en-agua (EM) estables, formadas por gotas de aceite teniendo de 2.6 a 5.5 μm de diámetro volumétrico-superficial ($D_{3,2}$), en cuyo interior se encontraron numerosas gotas de agua con un diámetro lineal ($D_{1,0}$) de 0.2 μm .

Variaciones en el pH_i , relación $P_{WPC}:P_{CMC}$ y método de incorporación de los biopolímeros, secuencial (SE) o mixto (MI), resultaron en EM con distintas características de tamaño de gota, estabilidad y propiedades reológicas; representando esto la posibilidad de modular las características de EM mediante variaciones de los factores que influyen en la formación y propiedades de los complejos biopoliméricos usados como agentes emulsificantes/estabilizantes.

7. LITERATURA CITADA

- Akalin, A. S., S. Gö nç ., G. Ünal Y S. Fenderya. (2007). Effects of fructoolisaccharide and whey protein concentrate on the viability of starter culture in reduced-fat probiotic yogurt during storage. *Journal of Food Science*. 72: 222-227.
- Allouche, J., Tyrode, E., Sadtler, V., Choplin, L., Salager, J. L. (2003). Single- and two-step emulsification to prepare a persistent multiple emulsion with a surfactant-polymer mixture. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 42: 3982-3988.
- 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.
- Benichou, A., Aserin, A., Garti, N. (2002). Double emulsions stabilized by new molecular recognition hybrids of natural polymers. *Polymers for Advances Technologies*, 13: 1019-1031.
- Dalgleish, D. G. (2006). Food emulsions-their structures and structure-forming properties. *Food Hydrocolloids*, 20: 415-422.
- Delie, F., Blanco-Príeto, M. J. (2005). Polymeric particulates to improve oral bioavailability of peptide drugs. *Molecules*, 10: 65-80.

- Dickinson, E. y Stainsby, G. (1982). *Colloids in Foods*. Applied Science Publishers, Londres, Reino Unido. Dickinson, E. (1992). Interfacial interactions and the stability of oil-in-water emulsions. *Pure and Application Chemistry*, 64(11): 1721-1724.
- Dickinson, E., (2001). Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology *Colloids and surfaces B*, 20: 197-210.
- Dickinson, E., Hong, S.T. (1996). Influence of water-soluble nonionic emulsifier on the rheology of heat-set protein-stabilized emulsion gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 2560-2566.
- Donnelly, W. J., M. A. Fenelon., L. Giblin., Y C. Stanton. (2008). Obesity. The food research agenda. *International Journal of Dairy Technology*. 61: 11-15.
- 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.
- Euston, S. R., Hirst, R. L. (2000). The emulsifying properties of commercial milk protein products in simple oil-in-water emulsions and in a model food system. *Journal of Food Science*, 65(6), 934-940.
- Fausto-Guerra, J., R.M. Valdez-López., M.G. Aldrete-Rodríguez., M.C. López-Zermeño. (2006). Antecedentes históricos sociales de la obesidad en México. *Investigación en Salud*. 8: 91-94.
- Fennema (2000). *Química de alimentos*, 2ª Ed. Acribia. Zaragoza, España.

- Florence, A.T., Whitehill, D.(1981). Some Features of Breakdown in Water-in-Oil-in- Water Multiple Emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 79, 243-256.
- Fredheim, G. E. y Christensen, B. E. (2003). Polyelectrolyte Complexes: Interactions Between Lignosulfonate and Chitosan. *Biomacromolecules*, 4: 232-239.
- Garti, N. (1997). Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food applications. *LebensmittelWissenschaft und-Technologie*, 30: 222-235. Giese, 2003
- Girard, M., Turgeon, S. L., Paquin, P. (2002). Emulsifying properties of whey protein-carboxymethylcellulose complexes. *Journal of Food Science* 67(1): 13-119.
- Gunasekaran, S., y Mehmet, M., 2000 Dynamic oscillatory shear testing of foods –Selected applications. *Food science and technology*, 11:115-127
- Hegedusic, V., Herceg, Z., Rimac, S. 2000. Rheological properties of carboxymethylcellulose and whey model solutions before and after freezing. *Food Technology and Biotechnology*, 38 (1), 19-26.
- Ibarz, A. Y Barbosa-Cánovas, G. V. (2005). Operaciones unitarias en la ingeniería de alimentos. Mundi-Prensa. España. pp: 129-180.
- Jafari S, Assadpoor E, Yinghe H. (2008). Encapsulation efficiency of food flavours and oil during spray drying. *Dry Technol*; 26: 816-835.
- Jager-Lezer, N.; Terisse, I.; Bruneau, F.; Tokgoz, S.; Ferreira, L.; Clause, D.; Seiller, M. y Grossiord, J.L. (1997). Influence of Lipophilic Surfactant on

the Release Kinetics of Water-Soluble Molecules Entrapped in a W/O/W Multiple Emulsion. *Journal of Controlled Release*, 45: 1–13.

Jimenez-Alvarado R., Beristain C.I., Medina-Torres L. Román-Guerrero A. Vernon-Carter E.J. (2009). Ferrous bisglycinate and release in W1/O/W2 multiple emulsions stabilized by protein-polisaccharide complexes. *Food hydrocolloids* 23. 2425-2433.

Kabalnov, A. S. (1998). Coalescence in emulsions. En: B. P. Binks(Ed.), *Modern aspects of emulsion science*. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, Reino Unido, pp: 205–227.

Koupantsis T., Kiosseoglou V. (2009). Whey protein–carboxy methylcellulose interaction in solution and in oil-in -water emulsion systems. Effect on emulsion stability. *Food Hydrocolloids* 23 (20 09) 1156–1163.

Krog N.J. (1997). Food emulsifiers and their chemical and physical properties en Friberg. SE y Larsson K, N.Y.. *Food emulsions* 3, 57-84.

Leal-Calderón, F., Thivilliers, F., Schmitt, V. (2007). Structured emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interfase Science*, 12, 206-212.

Lim, H.J., Ghim, H. D., Choi, J. H., Chung, H. Y., Lim, J. O. (2010). Controlled release of bmp-2 from alginate nanohydrogels enhanced osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Macromolecular Research*, 18 (8): 787-792.

Lobato-Calleros C., Rodriguez, E., Sandoval-Castilla, O., Vernon-Carter, E. J., Alvarez-Ramirez, J. (2006). Reduced-fat white fresh cheese-like products obtained from W1/O/W2 multiple emulsions: Viscoelastic and high-resolution image analyses. *FoodResearch International*, 39:678-685.

- Lobato-Calleros, C. (1987). Efecto de la adición de caseinato de sodio en el rendimiento y las propiedades reológicas de queso fresco tipo panela modificado. Tesis de Maestría. Universidad Iberoamericana, México.
- Lobato-Calleros, C. Recillas-Mota, M. T. Espinosa-Solares, T., Alvarez-Ramirez, 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. Sosa.Pérez, A., Rodríguez-Tafoya, J., Sandoval-Castilla, O., Pérez-Alonso, C., Vernon-Carter, E. J. (2008). Structural and textural characteristics of reduced-fat cheese-like products made from $W_1/O/W_2$ emulsions and skim milk. *LebensmittelWissenschaft and Technologie* 41:1847-1856.
- Lobato-Calleros, C., Martínez-Torrijos, O., Sandoval-Castilla, O., Pérez-Orozco, J.P., Vernon-Carter, E.J. (2004). Flow and creep compliance properties of reduced-fat yoghurts containing protein-based fat replacers. *International Dairy Journal*, 14: 777-782.
- Lobato-Calleros, C., Ramírez-Santiago, C., Osorio-Santiago, V.J., Vernon-Carter, E.J., Hornelas-Uribe, Y. (2002). Microstructure and texture of Manchego cheese-like products made with canola oil, lipophilic and hydrophilic emulsifiers. *Journal of Texture Studies*, 33: 165-182.
- Lopretti M., Barreiro F., Fernandes I., Damboriarena A., Ottati C., Olivera A. (2007). Microencapsulación de compuestos de actividad biológica. *Publicación Anual del Laboratorio Tecnológico del Uruguay* (2):19, 19-23.
- Malone, M., Appelqvist, I. Y Norton I. (2003). Oral behavior of food hydrocolloids and emulsions. Part 2. Taste and aroma release *Food hydrocolloids* 17:775-784.

- Martínez-Torrijos, O. (2003). Características reológicas y sensoriales de yogur bajo en grasa utilizando algunos sustitutos comerciales de grasa. Tesis profesional. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Chapingo, Estado de México.
- McClements D.J. (2007). Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Journal of Food Science*, 72.
- McClements D.J. and Guzey.(2006). Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. *Advances in colloid and interface science* 128: 227-248
- McClements, D. J. (1999). *Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques*. CRC Press, Boca Raton, Florida, EUA.
- McClements, D. J. (2005). *Food emulsions: principles, practice and techniques*. Boca Raton (FL): 89: 123.187..
- McClements, D.J. 2000. Comments on viscosity enhancement and depletion flocculation by polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 14:173-177.
- Muñoz J., Alfaro M.C., Zapata I. (2007). Avances en la formulación de emulsiones. *Grasas y Aceites*. 58 (1).
- 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*, 25: 577-585.

- Musachino (2001). Preparation of W/O/W Multiple Emulsions with Polymers in the Outer Aqueous Phase. *Food Science and Technology Research*, 7(1): 78-81.
- Osawa, S., Decker, E. A., McClements, D. J. (2004). Production and characterization of O/W emulsions containing droplets stabilized by lecithin-chitosan-pectin multilayered membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3595-3600.
- Owusu A. R. K., Zhu Q. H. (1996). Interfacial parameters for spans and tweens in relation to water-in-oil-in-water multiple emulsion stability. *Food Hydrocolloids*, 10: 245-250.
- Ozer, O.; Muguet, V.; Roy, E.; Grossiord, J.L. y Seiller; M. (2000). Stability Study of W/O/W Viscosified Multiple Emulsions. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 26: 1185-1189.
- Pomeranz Y. (1991). *Functional Properties of Food Components*. 2a ed. Academic Press, Inc. San Diego, CA.
- Pszczola, D. E. (2008). Fiber's new visibility. *Food Technology* 62 (12): 61–71.
- Rao, M. (1999). Introduction. En *Rheology of fluid and semisolid foods. Principles and applications*. Rao (Ed.). Aspen Publishers, Inc. Ma.EUA. 1-21.
- Roudot, A. C. (2004). *Reología y análisis de la textura de los alimentos*. Acribia. Zaragoza, España. 210 p.
- Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., Aguirre-Mandujano, E., Vernon-Carter, E. J. (2004). Microestructure and texture of yogurt as influenced by fat replacer. *International Dairy Journal* 14:151-159.

- Savant, V. D., Torres, J. A. (2000). Chitosan-based coagulating agents for treatment of Cheddar cheese whey. *Biotechnology Progress*, 16, 1091-1097.
- Sela, Y.; Magdassi, S. y Garti, N. (1995). Release of Markers from the Inner Water Phase of W/O/W Emulsions Stabilized by Silicone Based Polymeric Surfactants, *Journal of Controlled Release*, 33: 1–12.
- Sherman, P. (1968). General Properties of emulsions and their constituents. En: *Emulsion Science*. Sherman, P. (Ed)..Londres, Inglaterra. Academic Press.332-333.
- Skoog, Douglas A., West, Donald M., Holler, F. James. (1995). *Química analítica*. McGraw Hill. México. 257-281.
- Steffe, J. F. (1996). *Rheological methods in food process engineering* (2nd ed.). East Lansing, MI: Freeman Press.
- Steventon, A.J., Parkinson, C.J., Fryer, P.J., Bottomley, R.C. (1990). The rheology of yogurt. En *Rheology of Food, Pharmaceutical and Biological Materials with general Rheology*. R.E. Carter Ed. Elsevier Applied Science. pp: 197-210.
- Tabilo-Munizaga, G. Y Barbosa-Cánovas, V. (2005). Rheology for the food industry. *Journal of Food Engineering*. 67: 147-156.
- Tesch, S. y Schubert, H. (2002). Influence of Increasing Viscosity of the Aqueous Phase on the Short-term Stability of Protein Stabilized Emulsions. *Journal of Food Engineering*, 52: 305-312.
- Turgeon, S. L., Beaulieu, M., Schmitt, C., Sánchez, C. (2003). Protein – polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and

structural aspects. *Current Opinion in Colloid Interface Science*. 4-5: 401-414.

Van de Velde, K., Kiekens, P. (2002). Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications. *Polymer Testing*, 21: 433-442.

Vinayahan, T., Williams, P. A., Phillips, G. O. (2010). Electrostatic interaction and complex formation between gum arabic and bovine serum albumin. *Biomacromolecules*, 11, 3367–3374.

Weinbreck F., Tromp R.H., and de Kruif C.G.(2004). Composition and structure of whey protein/gum Arabic coacervates. *Biomacromolecules*. 5. 1437-1445.

Weiss, J., Takhistov, P., McClements, D. J. (2006). Functional materials in food nanotechnology. *Journal of Food Science*, 71, R107-R116.

Ye, A. (2008). Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 43: 406–415.