



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
AGROALIMENTARIA**

DEPARTAMENTO DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

**ENCAPSULAMIENTO DE β -CAROTENO EN NANOEMULSIONES
ESTABILIZADAS CON COMPLEJOS SOLUBLES DE
HIDROLIZADO DE PROTEÍNA-POLISACÁRIDO**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

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

Presenta:

Diana Itzel López Monterrubio

Bajo la supervisión de: Consuelo Silvia Olivia Lobato Calleros, Dra.

César Ramírez Santiago, Dr.



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



Chapingo, Estado de México, noviembre de 2016.

**ENCAPSULAMIENTO DE β -CAROTENO EN NANOEMULSIONES
ESTABILIZADAS CON COMPLEJOS SOLUBLES DE
HIDROLIZADO DE PROTEÍNA-POLISACÁRICO**

Tesis realizada por **Diana Itzel López Monterrubio** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
AGROALIMENTARIA**

DIRECTOR:

Consuelo Lobato Calleros

Dra. Consuelo Silvia Olivia Lobato Calleros

CODIRECTOR:

Dr. César Ramírez Santiago

ASESOR:

Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN GENERAL	ix
ENCAPSULAMIENTO DE β -CAROTENO EN NANOEMULSIONES ESTABILIZADAS CON COMPLEJOS SOLUBLES DE HIDROLIZADO DE PROTEÍNA-POLISACÁRIDO	ix
I INTRODUCCIÓN	1
II MARCO TEÓRICO	4
2.1 β -Caroteno	4
2.3 Emulsionantes	5
2.3.1 Proteínas	7
2.3.2 Polisacáridos	8
2.4 Tamaño de gota	9
2.5 Propiedades de superficie de las gotas de las emulsiones	10
2.6 Complejos biopoliméricos	11
2.7 Tipos de Inestabilidad de las emulsiones	12
2.7.1 Maduración de Ostwald	13
2.7.2 Floculación	13
2.7.3 Coalescencia	14
2.7.4 Separación gravitacional	14
2.8 Reología	14
III Literatura citada	16
IV ENCAPSULAMIENTO DE β -CAROTENO EN NANOEMULSIONES ESTABILIZADAS CON COMPLEJOS SOLUBLES DE HIDROLIZADO DE PROTEÍNA DE LACTOSUERO-PECTINA CÍTRICA	24
VI INTRODUCCIÓN	26
VII MATERIALES Y MÉTODOS	28

7.1 Materiales	28
7.2 Métodos	28
7.2.1 Formación del complejo soluble	28
7.2.2 Formulación y preparación de emulsiones simples (O/W)	28
7.2.3 Determinación del tamaño de gota y la estabilidad de las nanoemulsiones.....	29
7.2.4 Determinación de variaciones en color de las nanoemulsiones	30
7.2.5 Eficiencia de encapsulamiento	30
7.2.5 Actividad antioxidante de β -caroteno encapsulado	31
7.2.6 Estabilidad de las nanoemulsiones al cremado.....	32
7.2.7 Estabilidad de las nanoemulsiones ante variaciones de pH.....	32
7.2.8 Propiedades reológicas de las nanoemulsiones	32
7.3 Análisis de datos.....	33
VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
8.1 Tamaño de gota y estabilidad de las nanoemulsiones	34
8.2 Determinación de variaciones en color de las nanoemulsiones	37
8.3 Eficiencia de encapsulamiento	39
8.4 Actividad antioxidante	41
8.5 Estabilidad de las nanoemulsiones al cremado.....	43
8.6 Estabilidad de las nanoemulsiones ante variaciones de pH.....	45
8.7 Propiedades reológicas de las nanoemulsiones.....	46
CONCLUSIONES	51
LITERATURA CITADA.....	52

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de los tipos de emulsiones y algunas de sus propiedades	9
Cuadro 2. Valores de diámetro volumétrico superficial medio ($d_{3,2}$) de las gotas de aceite de las nanoemulsiones.....	35
Cuadro 3. Concentraciones de β -caroteno($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ de emulsión) iniciales y después del almacenamiento.	41
Cuadro 4. Velocidad de cremado de las nanoemulsiones.....	44
Cuadro 5. Variación del diámetro hidrodinámico ($d_{3,2}$) de las nanoemulsiones con el pH.....	46
Cuadro 6. Parámetros reológicos del modelo Carreau-Yasuda para las nanoemulsiones.....	49
Cuadro 7. Valores de los módulos viscoelásticos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') de las nanoemulsiones en la región viscoelástica lineal.	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de β –caroteno.	4
Figura 2. Estabilización de emulsiones por emulsionantes naturales.	6
Figura 3. Representación esquemática de los tipos de interacciones entre proteínas y polisacáridos.	11
Figura 4. Mecanismos de desestabilización de emulsiones aceite en agua.	13
Figura 5. Variaciones en los parámetros de color de las nanoemulsiones durante el tiempo de almacenamiento. E: nanoemulsiones; subíndices B, M y A: concentraciones de β -caroteno baja, media y alta, respectivamente.	38
Figura 6. Eficiencia de encapsulamiento (■) y estabilidad (■) de β -caroteno despues de 30 días de almacenamiento. E: nanoemulsiones; subíndices B, M y A: concentraciones de β -caroteno baja, media y alta, respectivamente.	40
Figura 7. Procentaje de inhibición (% I) del radical DPPH de las nanoemulsiones, despues de 1 (■) y 30 (■) días de almacenamiento a 5° C. E: nanoemulsiones; subíndices B, M y A: concentraciones de β -caroteno baja, media y alta, respectivamente.	43
Figura 8. Cambios en la viscosidad aparente de las naoemulsiones como función de la tasa de corte. (■) E _B ; (■) E _M ; (■) E _A . E: nanoemulsiones; subíndices B, M y A: concentraciones de β -caroteno baja, media y alta, respectivamente.	48
Figura 9. Cambios en los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') de las nanoemulsiones como funcion de la deformación. G' para (■) E _B , (■) E _M , y (■) E _A . G'' para (□) E _B , (□) E _M y (□) E _A . E: nanoemulsiones; subíndices B, M y A: concentraciones de β -caroteno baja, media y alta, respectivamente.	50

Dedicatorias

A mi madre que es mi mayor motivación para alcanzar mis metas, gracias por el infinito apoyo, cariño y comprensión incondicional, por siempre confiar en mí y por demostrarme lo importante que es luchar por conseguir lo que se quiere.

A mis hermanos Manolo y Carlos por su apoyo y cariño. Los quiero.

A Ricardo Emmanuel Martínez Rocha por el amor y el gran apoyo que me has dado a lo largo de estos años. Te quiero.

A mi gran amigo Asaf por escuchar y entender mis problemas.

A todos aquellos que han sido parte de mi historia y han dejado un recuerdo inolvidable en mi ser.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT) por brindarme el apoyo económico para la realización de mis estudios de maestría.

A la Universidad Autónoma Chapingo, al Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria y al Departamento de Ingeniería Agroindustrial por darme la oportunidad de continuar mi formación profesional.

A la Universidad Autónoma Metropolitana por el apoyo en la realización de este trabajo de investigación.

Un agradecimiento muy especial a la Dra. Consuelo S. O. Lobato Calleros por su apoyo, aportaciones y consejos en la dirección y revisión de este proyecto y sobre todo por la confianza.

Al Dr. César Ramírez Santiago por la dirección, apoyo y respaldo para el desarrollo de este trabajo de tesis.

Al Dr. E. Jaime Vernon Carter por la revisión y consecuente culminación de este trabajo.

A la Dra. Landy Hernández Rodríguez por su gran apoyo para el desarrollo de este trabajo de tesis.

Al Dr. José por su apoyo en la realización de esta tesis y por su amistad.

A todos mis compañeros de la 13ª generación 2014-2016.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre: Diana Itzel López Monterrubio

Fecha de nacimiento: 22 de marzo de 1991

Lugar de nacimiento: Distrito Federal

CURP: LOMD910322MDFPNN02

Profesión: Ingeniera Agroindustrial

Cédula profesional: 09085548

Desarrollo académico

Preparatoria: Preparatoria Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. 2006-2009.

Licenciatura: Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo. 2009-2013.

Maestría: Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria. Universidad Autónoma Chapingo. 2014-2016.

RESUMEN GENERAL

ENCAPSULAMIENTO DE β -CAROTENO EN NANOEMULSIONES ESTABILIZADAS CON COMPLEJOS SOLUBLES DE HIDROLIZADO DE PROTEÍNA-POLISACÁRIDO¹

El desarrollo de sistemas de portadores de antioxidantes que pueden ayudar a protegerlos contra factores ambientales nocivos e incorporarlos a sistemas de alimentos más complejos de manera eficiente es un tema de estudio actual. Las nanoemulsiones compuestas con ingredientes naturales pueden considerarse como sistemas potenciales en los que se pueden encapsular compuestos bioactivos. Complejos solubles de hidrolizado de proteína de lactosuero y pectina cítrica (WPH-Pc) fueron obtenidos y usados para estabilizar nanoemulsiones aceite-en-agua (NE's) adicionadas con diferentes concentraciones de β -caroteno (25, 50 y 75 mg 100 g⁻¹ de emulsión). La concentración de β -caroteno afectó el tamaño de las gotas, la estabilidad, la eficiencia de encapsulación, las propiedades reológicas y la capacidad protectora de las NE's. Las concentraciones más bajas de β -caroteno tienden a producir NE's con gotas de aceite más pequeñas, que son más estables y presentan mayor eficiencia de encapsulación. La viscosidad aparente más alta y los valores de los módulos de almacenamiento y pérdida de los NE se relacionaron con velocidades de cremado más bajas y un mayor efecto protector sobre la actividad antioxidante del β -caroteno encapsulado.

Palabras clave: Nanoemulsiones, complejos solubles biopoliméricos, comportamiento reológico, compuestos bioactivos, alimentos funcionales.

¹ Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Diana I. López Monterrubio.

Director de tesis: Consuelo S.O. Lobato Calleros.

CoDirector de tesis: César Ramírez Santiago.

GENERAL ABSTRACT

ENCAPSULATION OF β -CAROTENE IN NANOEMULSIONS STABILIZED BY WHEY PROTEIN HYDROLYSATE-POLYSACCHARIDE SOLUBLE COMPLEXES²

The development of carriers systems for antioxidants that may help to protect them against deleterious environmental factors and to incorporate them into more complex food systems in an efficient manner is a current topic of study. Nanoemulsions made up with natural ingredients may be considered as potential systems where bioactive compounds could be encapsulated. Whey protein hydrolysis and citrus pectin soluble complex (WPH-Pc) was obtained and used for stabilising oil-in-water nanoemulsions (NE's) loaded with different β -carotene concentrations (25, 50 and 75 mg 100 g⁻¹ emulsion). β -carotene concentration affected the droplet size, stability, encapsulation efficiency, rheological properties, and protective capacity of the NE's. Lower β -carotene concentrations tended to yield NE's with smaller oil droplets, which were more stable and presented higher encapsulation efficiency. Higher apparent viscosity and storage and loss moduli values of the NE's were related with lower creaming velocities and higher protective effect on the antioxidant activity of the encapsulated β -carotene.

Key words: Nanoemulsions, biopolymer soluble complexes, rheological behavior, bioactive compounds, functional foods.

² Master of Thesis, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Diana I. López Monterrubio.

Advisor: Consuelo S.O. Lobato Calleros.

CoAdvisor: César Ramírez Santiago.

I INTRODUCCIÓN

El consumo de alimentos funcionales ha aumentado en los últimos años debido a que los consumidores buscan asegurar una buena salud y no únicamente satisfacer el hambre (Lobato-Calleros *et al.*, 2003). Mantener una buena salud depende, en gran medida, de una alimentación adecuada a lo largo de la vida, que contribuya a la prevención de enfermedades (Sandoval-Castilla *et al.*, 2010). Diversas frutas y verduras son ricas en pigmentos naturales como los carotenoides, estos compuestos bioactivos, pueden incorporarse a los alimentos ya que ostentan importantes propiedades biológicas debido a su capacidad antioxidante (De Paz *et al.*, 2013).

El β -caroteno es considerado un antioxidante natural, perteneciente a la familia de los carotenoides, aporta una parte importante de la vitamina A en la dieta humana, debido a su alta tasa de conversión como precursor de retinol (Yuan *et al.*, 2008b). Haftel, Berkovich y Reifen (2015), mencionan que la vitamina A ayuda en el proceso visual, en el funcionamiento del sistema inmune y previene enfermedades gastrointestinales y respiratorias.

La deficiencia en vitamina A (DVA) es un problema grave en países en desarrollo, ya que está asociada con la susceptibilidad a contraer enfermedades infecciosas; así como a problemas durante el embarazo. Se ha estimado que casi 20 millones de mujeres embarazadas y 190 millones de niños en el mundo se encuentran afectados por DVA (Chien *et al.*, 2016; Strunz *et al.*, 2016).

Diversas investigaciones han demostrado que el β -caroteno proporciona beneficios importantes a la salud humana, cuando se satisface el consumo diario recomendado; por ejemplo, en la prevención de: diversos tipos de cáncer (Qian *et al.*, 2012; Tanaka *et al.*, 2012), diabetes tipo 2 (Hofe *et al.*, 2014) y

enfermedades cardiovasculares (Karppi *et al.*, 2012). Con base en los anterior, y al interés que han mostrado los consumidores por el cuidado de su salud, se ha buscado la incorporación de β -caroteno a los alimentos (Bortnowska *et al.*, 2014; Salvia-Trujillo *et al.*, 2013b). Sin embargo, la incorporación de β -caroteno en los alimentos es fuertemente limitada debido a su baja solubilidad en agua, alto punto de fusión e inestabilidad química, así como su baja biodisponibilidad (Qian *et al.*, 2012; Salvia-Trujillo *et al.*, 2013a). Adicionalmente, el β -caroteno es sensible al oxígeno, calor y luz (Lozano-Vazquez *et al.*, 2015; Rodríguez-Huezo *et al.*, 2004). Su susceptibilidad a la degradación está dada por su estructura poli-isoprenoide, la cual consiste en una larga cadena conjugada de dobles enlaces carbono-carbono (Sun *et al.*, 2010).

Se ha encontrado que la biodisponibilidad de compuestos lipofílicos es incrementada cuando se suministran en sistemas basados en emulsiones; además de mejorar su estabilidad química en productos alimenticios finales (McClements & Li, 2010; Neves *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015). Compuestos como el β -caroteno, son incorporados en la fase oleosa de las emulsiones y posteriormente emulsionados (Salvia-Trujillo *et al.*, 2013a). La ventaja de estos sistemas no sólo radica en que permiten la incorporación de compuestos lipofílicos a sistemas alimenticios ricos en agua, sino que también ayudan a prevenir su deterioro oxidativo (Trentin *et al.*, 2011).

Las nanoemulsiones aceite-en-agua (O/W) con diámetros de gota < 200 nm, son sistemas potencialmente eficientes como medio de suministro de compuestos bioactivos lipofílicos (McClements & Rao, 2011). Las nanoemulsiones presentan diversas ventajas sobre las emulsiones convencionales debido a su tamaño de gota, tales como: mayor claridad óptica; alta estabilidad a la agregación de gotas y separación gravitacional; aumento de la biodisponibilidad de compuestos lipofílicos, y propiedades reológicas únicas (McClements, 2011; Salvia-Trujillo *et al.*, 2013b).

El presente documento contiene dos partes principales para abordar el tema; en la primera se presenta una revisión de literatura que apoya el entendimiento de

los principales factores utilizados para evaluar las características físicoquímicas de emulsiones estabilizadas mediante complejos solubles proteína-polisacárido como medio de encapsulamiento de β -caroteno; en la segunda parte se presenta un estudio que tuvo como objetivos: encapsular β -caroteno en nanoemulsiones (NE's) estabilizadas mediante complejos solubles (CS) de hidrolizado de proteína de lactosuero-pectina cítrica y evaluar las propiedades físicas (tamaño de gota, estabilidad al cremado, eficiencia de encapsulamiento, color y comportamiento reológico) de las NE's y la actividad antioxidante del β -caroteno encapsulado durante treinta días de almacenamiento bajo refrigeración.

II MARCO TEÓRICO

2.1 β -Caroteno

Los carotenoides destacan entre los pigmentos naturales debido a su diversidad estructural y numerosas funciones (Tan & Nakajima, 2005). Estudios han demostrado que una dieta rica en carotenoides, como el β -caroteno (Figura 1), está relacionada con efectos positivos a la salud del ser humano, ya que ayuda a prevenir enfermedades, gracias a su efecto antioxidante (Li *et al.*, 2015; Thaipong *et al.*, 2006). Debido a lo anterior, existe un creciente interés en el desarrollo de alimentos y bebidas fortificados con este compuesto bioactivo (Zhang *et al.*, 2016).

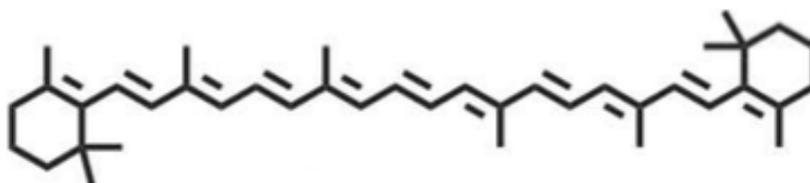


Figura 1. Estructura química de β -caroteno.
Fuente: Boon *et al.*, 2010

El β -caroteno está compuesto por un sistema de polieno con 11 enlaces dobles conjugados y un anillo β en cada extremo de su cadena; debido a esta estructura se le atribuyen potenciales beneficios a la salud humana, (Li *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015), así como susceptibilidad a diferentes factores químicos y ambientales (Xu *et al.*, 2013). La incorporación de este bioactivo a productos alimenticios es limitada por su baja solubilidad en agua (Wang *et al.*, 2015); además de que a temperatura ambiente se encuentra en forma cristalina de baja absorción (Liang *et al.*, 2013).

El β -caroteno es fácilmente oxidado por oxígeno activo, como lo es el oxígeno en forma de singlete, los superóxidos, los radicales hidroxilo y los metales de transición (Cornacchia y Roos, 2011). Factores ambientales como el calor y la luz causan su deterioro, produciendo la pérdida de su color y propiedades nutraceuticas (Xu *et al.*, 2013).

En los últimos años, el interés de proteger el β -caroteno de factores ambientales por medio de su encapsulamiento ha ido en aumento, puesto que esta técnica permite aumentar la biodisponibilidad del compuesto (Guan *et al.*, 2016; Yi *et al.*, 2016; Wei & Gao, 2016). El uso de biopolímeros naturales son un medio viable para la protección de compuestos bioactivos, debido a sus potenciales ventajas como biodegradabilidad y biocompatibilidad (Wang *et al.*, 2015).

2.2 Emulsiones

Las emulsiones son sistemas heterogéneos formados por la dispersión de dos líquidos inmiscibles entre sí, donde una fase es dispersada en otra en forma de pequeñas gotas. Estos sistemas pueden ser aceite-en-agua (O/W) o agua-en-aceite (W/O). Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables, por lo que se requiere la incorporación de agentes emulsionantes para lograr una metaestabilidad (Bortnowska *et al.*, 2014; Chung *et al.*, 2014; Jiang & Xiong, 2015; Muñoz *et al.*, 2007).

Las emulsiones tienen una gran variedad de aplicaciones en la industria alimentaria, como la incorporación de compuestos altamente lipofílicos a medios acuosos; la entrega eficiente de compuestos bioactivos; la modificación de sus propiedades reológicas, y la alteración de atributos sensoriales (Adjonu *et al.*, 2014a; McClements, 2012a; Wang *et al.*, 2015).

2.3 Emulsionantes

Los emulsionantes pueden ser considerados como sustancias naturales o sintéticas tensoactivas, que promueven la formación de las emulsiones y

contribuyen a su estabilidad a lo largo del tiempo. En las últimas décadas se ha buscado la incorporación de productos principalmente naturales por lo cual se han realizado diversos estudios utilizando proteínas, polisacáridos y fosfolípidos como emulsionantes en la formulación de emulsiones (Ozturk & McClements, 2016); lo anterior, debido a las excelentes características de biodegradabilidad y biocompatibilidad de estos compuestos naturales (Burgos-Díaz *et al.*, 2016).

Las sustancias biopoliméricas con capacidad emulsionante/estabilizante se adsorben en la interfase aceite-agua de una emulsión disminuyendo la tensión interfacial, promoviendo la formación de pequeñas gotas (Silva *et al.*, 2011; Verrijssen *et al.*, 2015), mientras que otras establecen una capa protectora que rodea las gotas retardando así los efectos de desestabilización (coalescencia, floculación y cremado) por medio de efecto estérico y/o repulsión electrostática (Figura 2).

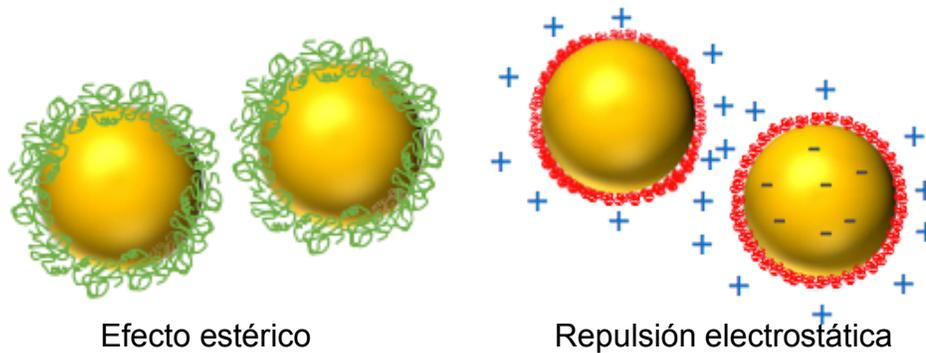


Figura 2. Estabilización de emulsiones por emulsionantes naturales.
Fuente: Silva *et al.* (2011).

Debido a las nuevas exigencias de la sociedad por alimentos con "etiquetas limpias", se ha buscado el desarrollo de sistemas de entrega de bioactivos, basados en ingredientes naturales (Ozturk *et al.*, 2015). Las proteínas y polisacáridos son biopolímeros naturales con actividad superficial y/o estabilizante, comúnmente utilizados en la industria alimentaria como emulsionantes/estabilizantes en emulsiones O/W (Benichou *et al.*, 2007; Xiang *et al.*, 2015). Cabe destacar que el tipo de emulsionante empleado tendrá un

fuerte impacto sobre la apariencia, textura y estabilidad de las emulsiones y en su caso del alimento al que se incorporen (Chung *et al.*, 2014).

2.3.1 Proteínas

Las proteínas son moléculas de carácter anfifílico, con estructura polimérica y con carga eléctrica dependiente del pH, altamente utilizadas como emulsionantes. Su carácter anfifílico les permite adsorberse sobre las superficies de las gotas de aceite durante el proceso de homogenización; mientras que su estructura polimérica y su carga eléctrica les otorga capacidad para generar un fuerte efecto estérico e interacciones repulsivas, de tipo electrostático. Lo último, debido a las cargas negativas (COO^-) o positivas (NH_3^+) de los aminoácidos (Qiu *et al.*, 2015; McClements, 2004; Ozturk & McClements 2016).

Se ha demostrado que el uso de proteínas mejora la encapsulación y liberación de compuestos bioactivos, debido a una mayor eficiencia en la cobertura interfacial durante el proceso de emulsificación (Jiang & Xiong, 2015). La estabilidad fisicoquímica de una emulsión dependerá en gran medida de la estructura de capas formadas en la interfase, y esta última a su vez dependerá de las características intrínsecas de la o las proteínas seleccionadas (Jiang & Xiong, 2015).

2.3.1.1 Proteínas de lactosuero

Las proteínas del suero de leche presentan estructura globular compacta y solubilidad en un rango amplio de pH (Fennema, 1992). La β -lactoglobulina comprende alrededor del 57 % de las proteínas presentes en el suero de la leche, se encuentra conformada por 162 aminoácidos de los cuales el ácido glutámico, la leucina y el ácido aspártico comprenden la mayor proporción, además de ser la principal fuente de grupos sulfhidrilos (-SH) de la leche (Kahwalia *et al.*, 2004; Kramm, 2003).

Actualmente el uso de proteínas hidrolizadas de lactosuero ha ido en aumento debido a la alteración de sus propiedades físicoquímicas, como solubilidad, estabilidad al calor y viscosidad (Mulcahy *et al.*, 2016).

Se ha informado que la hidrólisis potencializa la actividad superficial de las proteínas, puesto que las fracciones de hidrolizado se movilizan eficientemente hacia la interfase, lo cual da como resultado una mejora en su poder emulsionante (Drapala *et al.*, 2016). Sin embargo, las emulsiones estabilizadas por proteínas o sus hidrolizados, son altamente sensibles al pH, puesto que tienden a flocular cuando se encuentran cerca de su punto isoeléctrico, lo cual limita su aplicación. El uso conjunto de proteínas y polisacáridos forma capas gruesas de revestimiento en la interface O/W propiciando la estabilidad de las emulsiones (Burgos-Díaz *et al.*, 2016).

2.3.2 Polisacáridos

Los hidrocoloides son altamente utilizados en alimentos para el control de la vida de anaquel de las emulsiones, pero la gran mayoría sólo puede ser utilizada como estabilizante, y sólo algunos como emulsionantes (Dickinson, 2009). Algunos polisacáridos contienen grupos no polares o restos de proteínas unidos a su estructura, lo cual les confiere propiedades emulsionantes. No obstante, en general la acción de los polisacáridos para estabilizar emulsiones reside en el aumento que provocan en la viscosidad de la fase acuosa, lo cual inhibe el movimiento y colisión de las gotas de aceite.

2.3.2.1 Pectina

Las pectinas son un ejemplo común de polisacáridos usados para la estabilización de emulsiones (Akhtar *et al.*, 2002; Ozturk & McClements, 2016). Las pectinas están conformadas principalmente por monómeros de ácido galacturónico (Schmidt *et al.*, 2015), y son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria por su capacidad para estabilizar y texturizar productos (Schmidt *et al.*, 2015); sus actividades gelificante, espesante y estabilizante están determinadas por su estructura (Chen *et al.*, 2016).

El grado de esterificación metílica, determina la hidrofobicidad y densidad de carga de las pectinas, ya que estos grupos esterificados son más hidrófobos que los grupos carboxilos libres (Schmidt *et al.*, 2015; Verrijssen *et al.*, 2015). Las pectinas contienen una cierta fracción proteínica asociada, cuya proporción varía dependiendo de su origen. Esta fracción proteínica de la pectina es adsorbida en la interfase O/W, mientras que el resto de la molécula se sitúa en la fase acuosa aumentando su viscosidad, y de esta forma previene la coalescencia de las gotas de aceite (Cuevas-Bernardino *et al.*, 2016). Pectinas de bajo peso molecular ($60-70 \text{ kg mol}^{-1}$) y alto grado de metoxilación son mejores emulsionantes (Leroux *et al.*, 2003).

Estudios de digestibilidad han demostrado que la pectina es resistente a la digestión en la boca y el estómago; sin embargo, es fácilmente digerible por la microbiota del colon, lo cual la hace ideal para el encapsulamiento de compuestos bioactivos sensibles a medios ácidos (Fathi *et al.*, 2014).

2.4 Tamaño de gota

McClements (2011) clasifica las emulsiones de acuerdo a su tamaño de gota en emulsiones, nanoemulsiones y microemulsiones (Cuadro 1). Las características físicoquímicas de las emulsiones y su aplicación en alimentos, dependen de su tamaño de gota. Las emulsiones convencionales tienden a ser opacas dado que su tamaño de gota es similar a la longitud de onda de la luz.

Cuadro 1. Clasificación de los tipos de emulsiones y algunas de sus propiedades

Tipo de emulsión	Rango radial	Estabilidad	Apariencia
Emulsión	100 nm a 100 μm	Metaestable	Túrbido/opaco
Nanoemulsión	10 a 100 nm	Metaestable	Claro/Turbio
Microemulsión	2–50 nm	Estable	Claro

Fuente: McClements, 2011.

Al reducido tamaño de gota de las nanoemulsiones (radio < 100 nm) se le atribuyen diversas ventajas de estos sistemas en comparación con las emulsiones convencionales (McClements, 2012a), tales como mayores estabilidad cinética, eficiencia de entrapamiento de compuestos lipofílicos (Huang *et al.*, 2010), preservación de las propiedades funcionales y control de la liberación de los compuestos bioactivos (Bourbon *et al.*, 2016); transparencia óptica o ligera translucidez (Adjonu *et al.*, 2014a), y aumento de la biodisponibilidad de compuestos lipofílicos (Mehmood, 2015; Rao & McClements 2012).

Fenómenos de desestabilización, como floculación, coalescencia o maduración de Ostwald pueden alterar el tamaño de las gotas de las emulsiones durante su almacenamiento; por esta razón se busca la formación de gotas suficientemente pequeñas, con la finalidad de asegurar una buena estabilidad cinética a largo plazo (McClements, 2012b)

2.5 Propiedades de superficie de las gotas de las emulsiones

Las gotas de las emulsiones pueden interactuar entre sí y con otros compuestos a través de fuerzas atractivas y/o repulsivas como: van der Waals, electrostática, estérica, enlaces de hidrógeno, y/o interacciones hidrófobas, las cuales se ven fuertemente influenciadas por factores intrínsecos (tamaño de gota), propiedades interfaciales (carga) y condiciones de la fase continua (pH) (Chung *et al.*, 2014).

La carga eléctrica de las gotas en una emulsión se debe principalmente al tipo de emulsionante adsorbido en su superficie; así como a las condiciones de la fase continua, lo cual tiene una fuerte repercusión sobre su funcionalidad y estabilidad (Chung *et al.*, 2014; McClements, 2006). Las gotas de aceite estabilizadas con proteína de lactosuero, presentan una carga eléctrica dependiente del pH de la fase continua respecto al punto isoeléctrico (pI) de la proteína, a pH < pI (4.27) muestran carga eléctrica positiva, debido a que los grupos amino de la proteína se encuentran protonados (NH₃⁺); mientras que a

valores de $\text{pH} > \text{pI}$, las gotas presentan carga negativa, debido a la ionización de sus grupos carboxílicos en grupos carboxilato (COO^-) (McClements, 2011).

2.6 Complejos biopoliméricos

Bajo ciertas condiciones las proteínas y los polisacáridos son capaces de formar complejos solubles (Figura 3), cuyas propiedades funcionales son altamente eficientes si son comparadas con aquellas de las proteínas y polisacáridos individuales (Benichou *et al.*, 2007). Las proteínas y polisacáridos son utilizados como emulsionantes, debido a su actividad superficial y como estabilizantes debido a su poder espesante, respectivamente (Zinoviadou *et al.*, 2012).

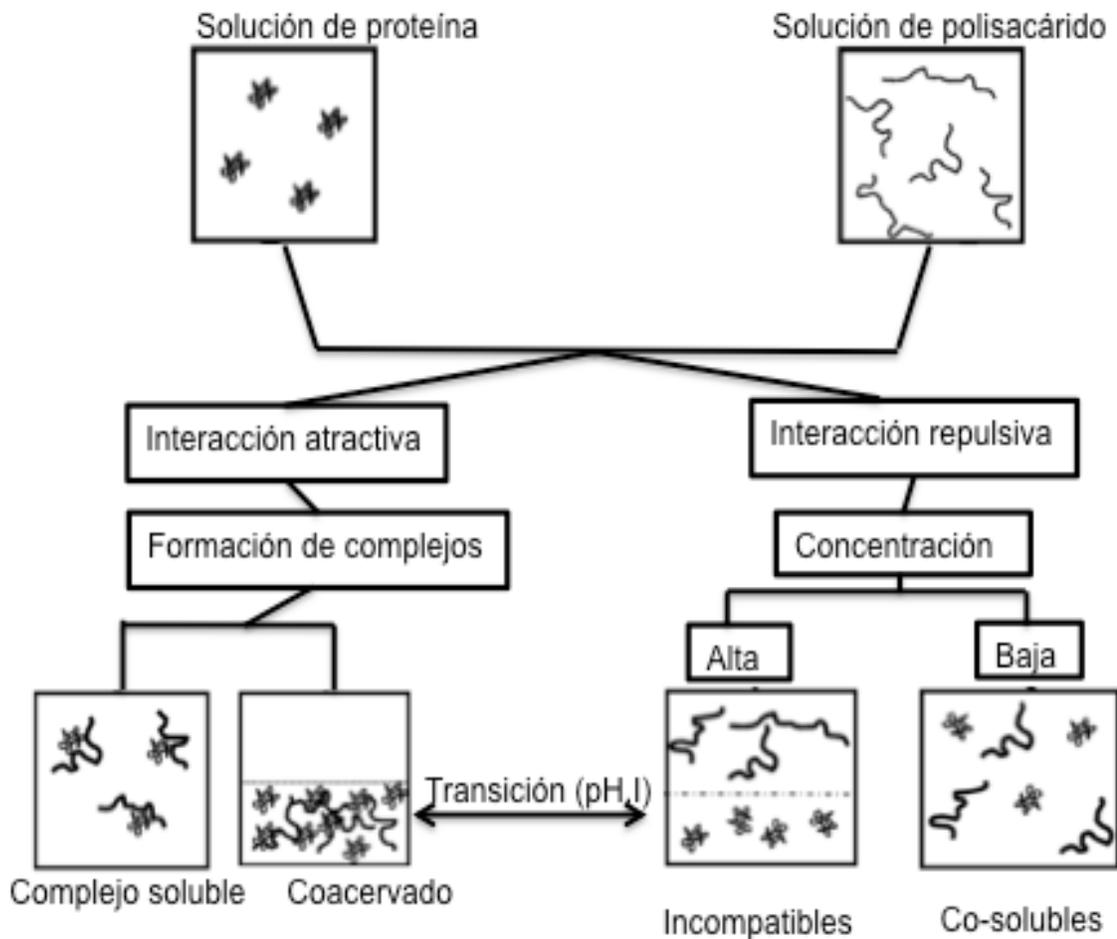


Figura 3. Representación esquemática de los tipos de interacciones entre proteínas y polisacáridos.

Fuente: McClements, 2006.

La encapsulación de compuestos bioactivos mediante complejos polisacárido-proteína es un proceso altamente reconocido en la actualidad debido a sus potenciales ventajas (Jourdain *et al.*, 2008). Las interacciones entre los biopolímeros repercuten significativamente sobre la estabilidad final de las emulsiones.

La interacción entre biopolímeros depende principalmente del pH, fuerza iónica, relación en peso y flexibilidad de cadenas de biopolímeros (Benichou *et al.*, 2007; Coelho *et al.*, 2011). La mezcla de dos biopolímeros diferentes puede llevar al desarrollo de una sola fase o dos (McClements, 2006). Factores como la relación molar proteína-polisacárido, fuerza iónica y pH pueden conducir a la formación de complejos solubles o de complejos insolubles llamados coacervados (Evans *et al.*, 2013). Cuando se obtienen cargas opuestas desiguales en número dentro del complejo, éste será soluble; en contraste, si las cargas opuestas de los biopolímeros son iguales se neutralizarán entre sí, lo cual dará como resultado complejos insolubles (Ron *et al.*, 2010).

2.7 Tipos de Inestabilidad de las emulsiones

Diversos factores como la calidad de los ingredientes, una eficiente homogenización, la exclusión de factores de contaminación y el uso de emulsionantes eficientes, propicia tamaños de gota estables durante el almacenamiento (Dickinson, 1997). Sin embargo, al ser sistemas metaestables son susceptibles a la inestabilización con el tiempo. Lo anterior, debido a diferentes factores físicoquímicos, como coalescencia, floculación, separación gravitacional y maduración de Ostwald (Figura 4) (McClements & Rao, 2011).

Factores intrínsecos del sistema (tipo de aceite y surfactantes, concentraciones y fuerza iónica) y factores ambientales (temperatura y pH) pueden propiciar o reducir la inestabilización de estos sistemas de (McClements, 2012b). Una rápida desestabilización de las emulsiones es signo de un recubrimiento de la fase dispersa ineficiente (Adjonu *et al.*, 2014b).

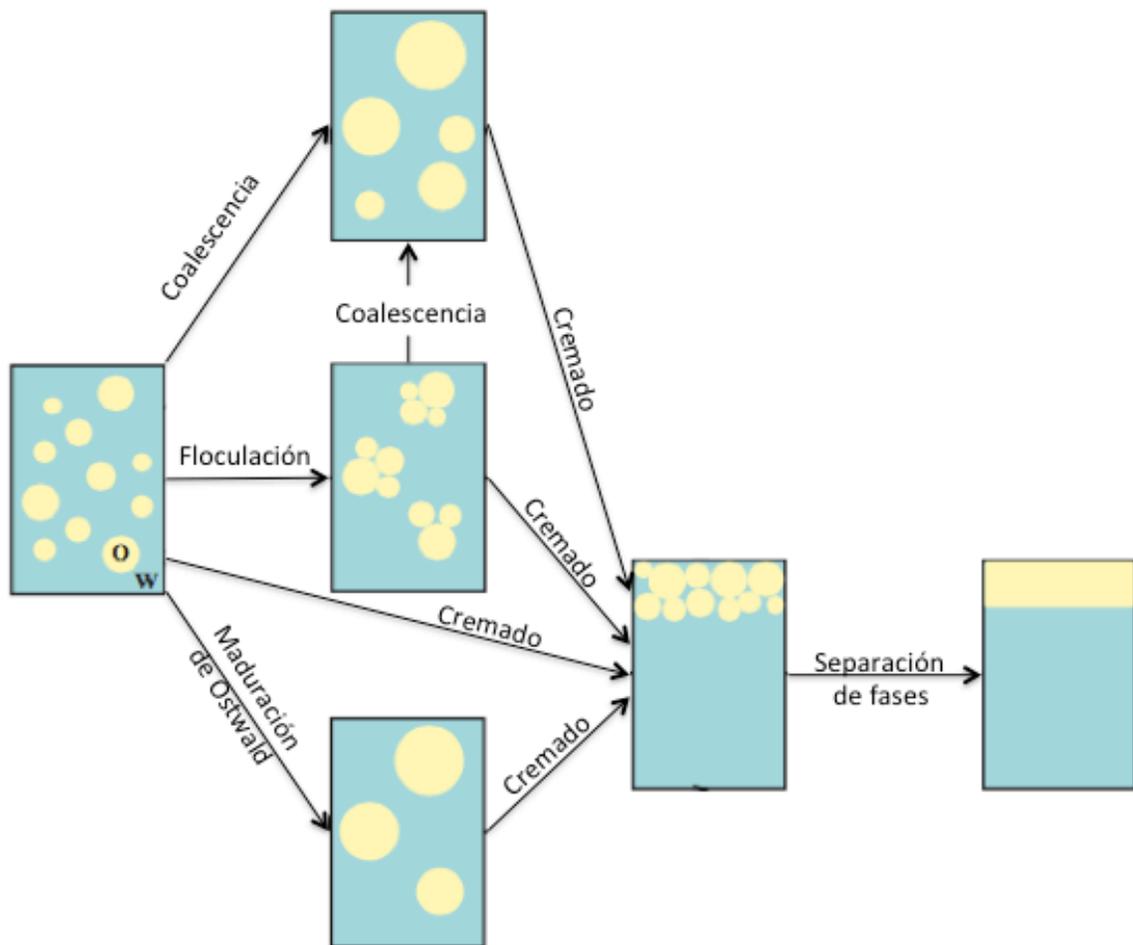


Figura 4. Mecanismos de desestabilización de emulsiones aceite en agua.
Fuente: Bouyer *et al.*, 2012.

2.7.1 Maduración de Ostwald

Este proceso se lleva a cabo mediante la difusión de pequeñas gotas de aceite hacia gotas más grandes, y se debe a que la solubilidad de la fase dispersa en la fase continua aumenta conforme el tamaño disminuye, movilizándose las partes solubles alrededor de gotas de aceite en forma de diminutas gotas lo cual conlleva a un aumento de tamaño con el tiempo. Este proceso no es significativo para emulsiones formuladas con triglicéridos insolubles en agua (Dickinson, 2009; McClements & Rao, 2011).

2.7.2 Floculación

La floculación es el mecanismo mediante el cual dos o más gotas se acercan lo suficiente como para formar un agregado, pero conservando su integridad

individual; es ocasionado cuando aumentan las fuerzas de atracción o disminuyen las fuerzas de repulsión entre las gotas (Piorkowski & McClements, 2014). Los principales mecanismos de floculación se llevan a cabo por agotamiento, formación de puentes entre los biopolímeros durante la emulsificación, puentes macromoleculares después de la emulsificación y por pérdida de la carga neta (Dickinson, 1997).

2.7.3 Coalescencia

Este fenómeno es ocasionado cuando en el sistema no hay suficiente emulsionante para cubrir todas las superficies de las gotas presentes, ocasionando la fusión de dos o más gotas en una de tamaño mayor. Este proceso es evitable al seleccionar un emulsionante que genere una fuerte repulsión entre las gotas (McClements, 2004; Mason *et al.*, 2006). La coalescencia está determinada no sólo por la resistencia de la capa de emulsionante a la ruptura, sino también por las fuerzas que actúan entre las gotas (gravitatoria, coloidal, hidrodinámicas y mecánicas) (Piorkowski & McClements, 2014).

2.7.4 Separación gravitacional

La separación gravitacional puede llevar a la formación de crema o a la sedimentación, dependiendo de las densidades relativas de la fase W y la fase O. El cremado se producirá cuando la densidad de la fase $W > O$ y la sedimentación ocurre cuando la densidad de la fase $O > W$ (Piorkowski & McClements, 2014). Cabe destacar que la separación gravitacional no afecta tamaños sumamente pequeños de gota, debido a su constante movimiento browniano (Adjonu *et al.*, 2014b).

2.8 Reología

Existe gran interés por la comprensión de las propiedades reológicas de las emulsiones como función de sus componentes (Derkach, 2009). Dependiendo de su composición las emulsiones pueden presentar comportamiento reológico predominantemente sólido o líquido (Cohen-Addad & Höhler, 2014).

Factores como la fracción volumétrica y la viscosidad de la fase dispersa, la viscosidad y composición química de la fase continua, la granulometría de las gotas y la reología interfacial determinan las propiedades reológicas de las emulsiones (Tadros, 1994). Por su parte la consistencia de las emulsiones puede ser direccionada mediante la variación del volumen de la fase dispersa, la distribución de tamaño y mediante la incorporación de agentes espesantes como los polisacáridos (Tadros, 2004).

El tipo de emulsionante, la concentración de la fase dispersa, y el tamaño de gota son factores que ejercen un gran impacto sobre las características reológicas de una emulsión (McClements & Li, 2010; McClements & Rao, 2011). La reología de una emulsión dependerá del tipo de emulsión que se tenga, desde líquidos con baja viscosidad (concentraciones de gota < 20 %), aquellas con viscosidad alta (concentraciones de gota entre 20 a 40 %) a aquellos semi-sólidos cuyas concentraciones de gota superan el 40 % (McClements & Li, 2010).

Es posible investigar las propiedades reológicas mediante experimentos de oscilación y fluencia los cuales proporcionan información sobre la estabilidad física de la emulsión (Bouyer *et al.*, 2012; Tadros, 2004). Las mediciones oscilatorias son aquellas en las que un material viscoelástico es sometido a una tensión que varía sinusoidalmente y a partir de estas mediciones son determinados los parámetros viscoelásticos, el módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdida (G''). Los valores de G' nos indican la energía elásticamente almacenada en la emulsión y los valores de G'' determinan la energía disipada en el flujo viscoso (Bouyer *et al.*, 2012; Tadros, 1994).

III Literatura citada

- Adjonu, R., Doran, G., Torley, P., & Agboola, S. (2014a). Formation of whey protein isolate hydrolysate stabilised nanoemulsion. *Food Hydrocolloids*, 41, 169-177.
- Adjonu, R., Doran, G., Torley, P., & Agboola, S. (2014b). Whey protein peptides as components of nanoemulsions: A review of emulsifying and biological functionalities. *Journal of Food Engineering*, 122, 15-27.
- Akhtar, M., Dickinson, E., Mazoyer, J., & Langendorff, V. (2002). Emulsion stabilizing properties of depolymerized pectin. *Food Hydrocolloids*, 16(3), 249-256.
- Al-Attar, A. M. (2015). Effect of grapeseed oil on diazinon-induced physiological and histopathological alterations in rats. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(3), 284-292.
- Asghari, H., Chegini, K. G., Amini, A., & Gheibi, N. (2016). Effect of poly and mono-unsaturated fatty acids on stability and structure of recombinant S100A8/A9. *International Journal of Biological Macromolecules*, 84, 35-42.
- Benichou, A., Aserin, A., Lutz, R., & Garti, N. (2007). Formation and characterization of amphiphilic conjugates of whey protein isolate (WPI)/xanthan to improve surface activity. *Food Hydrocolloids*, 21(3), 379-391.
- Bortnowska, G., Balejko, J., Tokarczyk, G., Romanowska-Osuch, A., & Krzemińska, N. (2014). Effects of pregelatinized waxy maize starch on the physicochemical properties and stability of model low-fat oil-in-water food emulsions. *Food Hydrocolloids*, 36, 229-237.
- Bourbon, A. I., Cerqueira, M. A., & Vicente, A. A. (2016). Encapsulation and controlled release of bioactive compounds in lactoferrin-glycomacropeptide nanohydrogels: Curcumin and caffeine as model compounds. *Journal of Food Engineering*, 180, 110-119.
- Boon, C. S., McClements, D. J., Weiss, J., & Decker, E. A. (2010). Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 50(6), 515-532.
- Bouyer, E., Mekhloufi, G., Rosilio, V., Grossiord, J. L., & Agnely, F. (2012). Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field?. *International Journal of Pharmaceutics*, 436(1), 359-378.

- Burgos-Díaz, C., Wandersleben, T., Marqués, A. M., & Rubilar, M. (2016). Multilayer emulsions stabilized by vegetable proteins and polysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 25, 51-57.
- Chen, H., Qiu, S., Gan, J., Liu, Y., Zhu, Q., & Yin, L. (2016). New insights into the functionality of protein to the emulsifying properties of sugar beet pectin. *Food Hydrocolloids*, 57, 262-270.
- Chien, C. Y., Lee, H. S., Cho, C. H. H., Lin, K. I., Tosh, D., Wu, R. R., & Shen, C. N. (2016). Maternal vitamin A deficiency during pregnancy affects vascularized islet development. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 36, 51-59.
- Chung, C., & McClements, D. J. (2014). Structure–function relationships in food emulsions: improving food quality and sensory perception. *Food Structure*, 1(2), 106-126.
- Coelho, S., Moreno-Flores, S., Toca-Herrera, J. L., Coelho, M. A., Pereira, M. C., & Rocha, S. (2011). Nanostructure of polysaccharide complexes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 363(2), 450-455.
- Cohen-Addad, S., & Höhler, R. (2014). Rheology of foams and highly concentrated emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 19(6), 536-548.
- Cornacchia, L., & Roos, Y. H. (2011). Stability of β -carotene in protein-stabilized oil-in-water delivery systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(13), 7013-7020.
- Cuevas-Bernardino, J. C., Lobato-Calleros, C., Román-Guerrero, A., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2016). Physicochemical characterisation of hawthorn pectins and their performing in stabilising oil-in-water emulsions. *Reactive and Functional Polymers*, 103, 63-71.
- de Paz, E., Martín, Á., Mateos, E., & Cocero, M. J. (2013). Production of water-soluble β -carotene micellar formulations by novel emulsion techniques. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 74, 90-96.
- Derkach, S. R. (2009). Rheology of emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 151(1), 1-23.
- Dickinson, E. (1997). Properties of emulsions stabilized with milk proteins: overview of some recent developments. *Journal of Dairy Science*, 80(10), 2607-2619.
- Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 23(6), 1473-1482.
- Drapala, K. P., Auty, M. A., Mulvihill, D. M., & O'Mahony, J. A. (2016). Improving thermal stability of hydrolysed whey protein-based infant formula

- emulsions by protein-carbohydrate conjugation. *Food Research International*, 88, 42-51.
- Evans, M., Ratcliffe, I., & Williams, P. A. (2013). Emulsion stabilisation using polysaccharide-protein complexes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 18(4), 272-282.
- Fathi, M., Martin, A., & McClements, D. J. (2014). Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 39(1), 18-39.
- Fennema, O. R. (1992). *Química de los alimentos* (No. 664.07 F335q). Zaragoza, ES: Acribia.
- Guan, Y., Wu, J., & Zhong, Q. (2016). Eugenol improves physical and chemical stabilities of nanoemulsions loaded with β -carotene. *Food Chemistry*, 194, 787-796.
- Haftel, L., Berkovich, Z., & Reifen, R. (2015). Elevated milk β -carotene and lycopene after carrot and tomato paste supplementation. *Nutrition*, 31(3), 443-445.
- Hofe, C. R., Feng, L., Zephyr, D., Stromberg, A. J., Hennig, B., & Gaetke, L. M. (2014). Fruit and vegetable intake, as reflected by serum carotenoid concentrations, predicts reduced probability of polychlorinated biphenyl-associated risk for type 2 diabetes: National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004. *Nutrition Research*, 34(4), 285-293.
- Huang, Q., Yu, H., & Ru, Q. (2010). Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. *Journal of Food Science*, 75(1), R50-R57.
- Jiang, J., & Xiong, Y. L. (2015). Role of interfacial protein membrane in oxidative stability of vegetable oil substitution emulsions applicable to nutritionally modified sausage. *Meat Science*, 109, 56-65.
- Jourdain, L., Leser, M. E., Schmitt, C., Michel, M., & Dickinson, E. (2008). Stability of emulsions containing sodium caseinate and dextran sulfate: relationship to complexation in solution. *Food Hydrocolloids*, 22(4), 647-659.
- Julio, L. M., Ixtaina, V. Y., Fernández, M. A., Sánchez, R. M. T., Wagner, J. R., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2015). Chia seed oil-in-water emulsions as potential delivery systems of ω -3 fatty acids. *Journal of Food Engineering*, 162, 48-55.
- Karppi, J., Laukkanen, J. A., Mäkikallio, T. H., Ronkainen, K., & Kurl, S. (2012). Low β -carotene concentrations increase the risk of cardiovascular disease mortality among Finnish men with risk factors. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 22(10), 921-928.
- Leroux, J., Langendorff, V., Schick, G., Vaishnav, V., & Mazoyer, J. (2003). Emulsion stabilizing properties of pectin. *Food Hydrocolloids*, 17(4), 455-462.

- Li, X., Wang, G., Chen, D., & Lu, Y. (2015). β -Carotene and astaxanthin with human and bovine serum albumins. *Food Chemistry*, 179, 213-221.
- Liang, R., Shoemaker, C. F., Yang, X., Zhong, F., & Huang, Q. (2013). Stability and bioaccessibility of β -carotene in nanoemulsions stabilized by modified starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(6), 1249-1257.
- Lobato-Calleros, C., Velázquez-Varela, J., Sánchez-García, J., & Vernon-Carter, E. J. (2003). Dynamic rheology of Mexican Manchego cheese-like products containing canola oil and emulsifier blends. *Food Research International*, 36(1), 81-90.
- Lozano-Vazquez, G., Lobato-Calleros, C., Escalona-Buendia, H., Chavez, G., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2015). Effect of the weight ratio of alginate-modified tapioca starch on the physicochemical properties and release kinetics of chlorogenic acid containing beads. *Food Hydrocolloids*, 48, 301-311.
- Mason, T. G., Wilking, J. N., Meleson, K., Chang, C. B., & Graves, S. M. (2006). Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18(41), R635.
- McClements, D. J. (2004). Protein-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9(5), 305-313.
- McClements, D. J. (2006). Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. *Biotechnology Advances*, 24(6), 621-625.
- McClements, D. J. (2011). Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*, 7(6), 2297-2316.
- McClements, D. J. (2012a). Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17(5), 235-245.
- McClements, D. J. (2012b). Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, 8(6), 1719-1729.
- McClements, D. J., & Li, Y. (2010). Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Advances in Colloid and Interface Science*, 159(2), 213-228.
- McClements, D. J., & Rao, J. (2011). Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(4), 285-330.
- Mehmood, T. (2015). Optimization of the canola oil based vitamin E nanoemulsions stabilized by food grade mixed surfactants using response surface methodology. *Food Chemistry*, 183, 1-7.
- Mirghafourvand, M., Charandabi, S. M. A., Hakimi, S., Khodaie, L., & Galeshi, M. (2016). Effect of orange peel essential oil on postpartum sleep quality:

- A randomized controlled clinical trial. *European Journal of Integrative Medicine*, 8(1), 62-66.
- Mulcahy, E. M., Park, C. W., Drake, M., Mulvihill, D. M., & O'Mahony, J. A. (2016). Improvement of the functional properties of whey protein hydrolysate by conjugation with maltodextrin. *International Dairy Journal*, 60, 47-54.
- Muñoz, J., Alfaro, M., & Zapata, I. (2007). Avances en la formulación de emulsiones. *Grasas Aceites*, 58(1), 64-73.
- Neves, M. A., Nakajima, M., & Kobayashi, I. (2012). Nanotechnology for bioactives delivery systems. *Journal of Food and Drug Analysis*, 20, 184-188.
- Ozturk, B., & McClements, D. J. (2016). Progress in natural emulsifiers for utilization in food emulsions. *Current Opinion in Food Science*, 7, 1-6.
- Ozturk, B., Argin, S., Ozilgen, M., & McClements, D. J. (2015). Formation and stabilization of nanoemulsion-based vitamin E delivery systems using natural biopolymers: whey protein isolate and gum arabic. *Food Chemistry*, 188, 256-263.
- Piorkowski, D. T., & McClements, D. J. (2014). Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. *Food Hydrocolloids*, 42, 5-41.
- Qian, C., Decker, E. A., Xiao, H., & McClements, D. J. (2012). Physical and chemical stability of β -carotene-enriched nanoemulsions: Influence of pH, ionic strength, temperature, and emulsifier type. *Food Chemistry*, 132(3), 1221-1229.
- Qiu, C., Zhao, M., & McClements, D. J. (2015). Improving the stability of wheat protein-stabilized emulsions: Effect of pectin and xanthan gum addition. *Food Hydrocolloids*, 43, 377-387.
- Rao, J., & McClements, D. J. (2012). Food-grade microemulsions and nanoemulsions: Role of oil phase composition on formation and stability. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 326-334.
- Rodríguez-Huezo, M. E., Pedroza-Islas, R., Prado-Barragán, L. A., Beristain, C. I., & Vernon-Carter, E. J. (2004). Microencapsulation by spray drying of multiple emulsions containing carotenoids. *Journal of Food Science*, 69(7), 351-359.
- Ron, N., Zimet, P., Bargarum, J., & Livney, Y. D. (2010). Beta-lactoglobulin-polysaccharide complexes as nanovehicles for hydrophobic nutraceuticals in non-fat foods and clear beverages. *International Dairy Journal*, 20(10), 686-693.
- Salvia-Trujillo, L., Qian, C., Martín-Belloso, O., & McClements, D. J. (2013a). Influence of particle size on lipid digestion and β -carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions. *Food Chemistry*, 141(2), 1472-1480.

- Salvia-Trujillo, L., Qian, C., Martín-Belloso, O., & McClements, D. J. (2013b). Modulating β -carotene bioaccessibility by controlling oil composition and concentration in edible nanoemulsions. *Food Chemistry*, 139(1), 878-884.
- Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., García-Galindo, H. S., Alvarez-Ramírez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2010). Textural properties of alginate–pectin beads and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Food Research International*, 43(1), 111-117.
- Schmidt, U. S., Koch, L., Rentschler, C., Kurz, T., Endreß, H. U., & Schuchmann, H. P. (2015). Effect of molecular weight reduction, acetylation and esterification on the emulsification properties of citrus pectin. *Food Biophysics*, 10(2), 217-227.
- Silva, H. D., Cerqueira, M. A., Souza, B. W., Ribeiro, C., Avides, M. C., Quintas, M. A., & Vicente, A. A. (2011). Nanoemulsions of β -carotene using a high-energy emulsification–evaporation technique. *Journal of Food Engineering*, 102(2), 130-135.
- Strunz, E. C., Suchdev, P. S., & Addiss, D. G. (2016). Soil-Transmitted Helminthiasis and Vitamin A Deficiency: Two Problems, One Policy. *Trends in Parasitology*, 32(1), 10-18.
- Sun, Y., Ma, G., Ye, X., Kakuda, Y., & Meng, R. (2010). Stability of all-trans- β -carotene under ultrasound treatment in a model system: Effects of different factors, kinetics and newly formed compounds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(4), 654-661.
- Tadros, T. F. (1994). Fundamental principles of emulsion rheology and their applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 91, 39-55.
- Tadros, T. (2004). Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108, 227-258.
- Tan, C. P., & Nakajima, M. (2005a). β -Carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. *Food Chemistry*, 92(4), 661-671.
- Tanaka, T., Shnimizu, M., & Moriwaki, H. (2012). Cancer chemoprevention by carotenoids. *Molecules*, 17(3), 3202-3242.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6), 669-675.
- Trentin, A., De Lamo, S., Güell, C., López, F., & Ferrando, M. (2011). Protein-stabilized emulsions containing beta-carotene produced by premix membrane emulsification. *Journal of Food Engineering*, 106(4), 267-274.

- Turasan, H., Sahin, S., & Sumnu, G. (2015). Encapsulation of rosemary essential oil. *LWT-Food Science and Technology*, 64(1), 112-119.
- Verrijssen, T. A., Verkempinck, S. H., Christiaens, S., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (2015). The effect of pectin on in vitro β -carotene bioaccessibility and lipid digestion in low fat emulsions. *Food Hydrocolloids*, 49, 73-81.
- Wang, S., Chen, X., Shi, M., Zhao, L., Li, W., Chen, Y., & Li, Y. (2015). Absorption of whey protein isolated (WPI)-stabilized β -Carotene emulsions by oppositely charged oxidized starch microgels. *Food Research International*, 67, 315-322.
- Wei, Z., & Gao, Y. (2016). Physicochemical properties of β -carotene emulsions stabilized by chitosan–chlorogenic acid complexes. *LWT-Food Science and Technology*, 71, 295-301.
- Xiang, J., Liu, F., Fan, R., & Gao, Y. (2015). Physicochemical stability of citral emulsions stabilized by milk proteins (lactoferrin, α -lactalbumin, β -lactoglobulin) and beet pectin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 487, 104-112.
- Xu, D., Wang, X., Jiang, J., Yuan, F., Decker, E. A., & Gao, Y. (2013). Influence of pH, EDTA, α -tocopherol, and WPI oxidation on the degradation of β -carotene in WPI-stabilized oil-in-water emulsions. *LWT-Food Science and Technology*, 54(1), 236-241.
- Yi, J., Fan, Y., Yokoyama, W., Zhang, Y., & Zhao, L. (2016). Thermal Degradation and Isomerization of β -Carotene in Oil-in-Water Nanoemulsions Supplemented with Natural Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(9), 1970-1976.
- Yuan, Y., Gao, Y., Zhao, J., & Mao, L. (2008a). Characterization and stability evaluation of β -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. *Food Research International*, 41(1), 61-68.
- Yuan, Y., Gao, Y., Mao, L., & Zhao, J. (2008b). Optimisation of conditions for the preparation of β -carotene nanoemulsions using response surface methodology. *Food Chemistry*, 107(3), 1300-1306.
- Zhang, R., Zhang, Z., Zhang, H., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2015). Influence of lipid type on gastrointestinal fate of oil-in-water emulsions: In vitro digestion study. *Food Research International*, 75, 71-78.
- Zhang, Z., Zhang, R., & McClements, D. J. (2016). Encapsulation of β -carotene in alginate-based hydrogel beads: Impact on physicochemical stability and bioaccessibility. *Food Hydrocolloids*, 61, 1-10.
- Zhao, X., Liu, F., Ma, C., Yuan, F., & Gao, Y. (2015). Effect of carrier oils on the physicochemical properties of orange oil beverage emulsions. *Food Research International*, 74, 260-268.

Zinoviadou, K. G., Scholten, E., Moschakis, T., & Biliaderis, C. G. (2012). Properties of emulsions stabilised by sodium caseinate–chitosan complexes. *International Dairy Journal*, 26(1), 94-101.

IV ENCAPSULAMIENTO DE β -CAROTENO EN NANOEMULSIONES ESTABILIZADAS CON COMPLEJOS SOLUBLES DE HIDROLIZADO DE PROTEÍNA DE LACTOSUERO-PECTINA CÍTRICA

Resumen

El desarrollo de sistemas de portadores de antioxidantes que pueden ayudar a protegerlos contra factores ambientales nocivos e incorporarlos a sistemas de alimentos más complejos de manera eficiente es un tema de estudio actual. Las nanoemulsiones compuestas con ingredientes naturales pueden considerarse como sistemas potenciales en los que se pueden encapsular compuestos bioactivos. Complejos solubles de hidrolizado de proteína de lactosuero y pectina cítrica (WPH-Pc) fueron obtenidos y usados para estabilizar nanoemulsiones aceite-en-agua (NE's) adicionadas con diferentes concentraciones de β -caroteno (25, 50 y 75 mg 100 g⁻¹ de emulsión). La concentración de β -caroteno afectó el tamaño de las gotas, la estabilidad, la eficiencia de encapsulación, las propiedades reológicas y la capacidad protectora de las NE's. Las concentraciones más bajas de β -caroteno tienden a producir NE's con gotas de aceite más pequeñas, que son más estables y presentan mayor eficiencia de encapsulación. La viscosidad aparente más alta y los valores de los módulos de almacenamiento y pérdida de los NE se relacionaron con velocidades de cremado más bajas y un mayor efecto protector sobre la actividad antioxidante del β -caroteno encapsulado.

Palabras clave: Nanoemulsiones, complejos solubles biopoliméricos, comportamiento reológico, compuestos bioactivos, alimentos funcionales.

V ENCAPSULATION OF β -CAROTENE IN NANOEMULSIONS STABILIZED WITH SOLUBLE COMPLEXS MADE WHEY PROTEIN HYDROLYSATE-CITRUS PECTIN

Abstract

The development of carriers systems for antioxidants that may help to protect them against deleterious environmental factors and to incorporate them into more complex food systems in an efficient manner is a current topic of study. Nanoemulsions made up with natural ingredients may be considered as potential systems where bioactive compounds could be encapsulated. Whey protein hydrolysate and citrus pectin soluble complex (WPH-Pc) was obtained and used for stabilising oil-in-water nanoemulsions (NE's) loaded with different β -carotene concentrations (25, 50 and 75 mg 100 g⁻¹ emulsion). β -carotene concentration affected the droplet size, stability, encapsulation efficiency, rheological properties, and protective capacity of the NE's. Lower β -carotene concentrations tended to yield NE's with smaller oil droplets, which were more stable and presented higher encapsulation efficiency. Higher apparent viscosity and storage and loss moduli values of the NE's were related with lower creaming velocities and higher protective effect on the antioxidant activity of the encapsulated β -carotene.

Key words: Nanoemulsions, biopolymer soluble complexes, rheological behavior, bioactive compounds, functional foods.

VI INTRODUCCIÓN

Dietas ricas en carotenoides se han asociado con la reducción de riesgo de contraer diversas enfermedades como cataratas, cáncer y cardiovasculares (da Silva *et al.* 2014); esto debido a su actividad antioxidante (Li *et al.*, 2015). Sin embargo, los antioxidantes naturales son sensibles a factores ambientales como luz, temperatura y oxígeno (Lozano-Vazquez *et al.*, 2015). Diversos estudios han demostrado que la integridad, la funcionalidad y la biodisponibilidad de compuestos lipofílicos bioactivos es incrementada cuando se suministran en sistemas basados en emulsiones; además de mejorar su estabilidad química en productos alimenticios finales (Wang *et al.*, 2015). En este sentido, las nanoemulsiones (NE's) se han propuesto como un método eficiente para proteger y aumentar la biodisponibilidad de compuestos lipofílicos gracias a su reducido tamaño de gota (McClements & Rao, 2011).

En

la actualidad se busca el desarrollo de tecnologías que permitan la estabilización de emulsiones mediante ingredientes naturales como los biopolímeros (Carrillo-Navas *et al.*, 2014). De acuerdo con Hernández-Marín *et al.* (2016), el uso de complejos solubles proteína-polisacárido en la interfase aceite-agua (O/W) de emulsiones, mejora su estabilidad y homogeneidad en la distribución del tamaño de gota.

Los objetivos de este trabajo fueron encapsular β -caroteno en nanoemulsiones estabilizadas mediante complejos solubles (CS) de hidrolizado de proteína de lactosuero-pectina cítrica (PC) y evaluar las propiedades físicas (tamaño de gota, estabilidad al cremado, eficiencia de encapsulamiento, color y comportamiento reológico) de las NE's y la actividad antioxidante del β -

caroteno encapsulado durante treinta días de almacenamiento bajo refrigeración.

VII MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Materiales

Hidrolizado de proteína de lactosuero (WPH; HilmarTM 8390, 80% p/p proteína en base seca, Hilmer Cheese Company, Hilmar, CA, EUA). β -Caroteno ($\geq 97.0\%$, UV, 22040, Sigma Aldrich, Toluca, Edo. de México, México). Aceite de canola (AC; Aceite Capullo[®], ACH Foods México S. de R.L. de C.V., Ciudad de México, México). Pectina cítrica (Pc; de rápida gelación, CEDROSA[®], grado de esterificación 74.2%, Central de Drogas S.A. de C.V., Naucalpan, Edo. de México, México). Ácido clorhídrico e hidróxido de sodio grado analítico (J.T. Baker, Xalostoc, Edo. de México, México).

7.2 Métodos

7.2.1 Formación del complejo soluble

La preparación del complejo soluble WPH/Pc se llevó a cabo de acuerdo a lo propuesto por Trujillo-Ramírez (2013) con ligeras modificaciones. Brevemente, se prepararon dispersiones acuosas de WPH (6% p/v) y Pc (1% p/v) a temperatura ambiente (20 ± 2 °C), aplicando agitación continua durante 6 h y se refrigeraron (5 ± 1 °C) durante 12 h para asegurar la completa hidratación de los biopolímeros. Posteriormente, las dispersiones de los biopolímeros se mezclaron para obtener una relación en peso WPH:Pc de 6:1, y el valor del pH se ajustó a 4.25 mediante la adición de soluciones de HCl (0.1 N) y/o NaOH (0.1 N). Las mezclas se dejaron reposar durante 24 h a temperatura de refrigeración para que la formación de CS alcanzara el equilibrio.

7.2.2 Formulación y preparación de emulsiones simples (O/W)

Se prepararon tres variaciones de NE's, que variaron en su contenido de β -caroteno (25, 50 y 75 mg 100 g^{-1} NE), que se codificaron como: E_B, E_M y E_A. La

fase oleosa (O) de las NE's estuvo constituida por AC incorporado con las distintas concentraciones de β -caroteno y representó una fracción gravimétrica (Φ) de 0.1. Las diferentes concentraciones de β -caroteno fueron disueltas en el aceite mediante la aplicación de un ciclo de sonicación (Ultrasonic processor, Model VCX 130PB 500 y 750 W, 20 kHz. Newtown, CT, EUA) utilizando una punta de 8 mm de diámetro (amplitud 60 %, frecuencia 20 kHz, tiempo 2 min). Posteriormente se aplicó agitación mecánica durante una hora para asegurar la completa disolución del β -caroteno. Como fase acuosa (W) de las NE's se utilizó la dispersión del CS formado previamente.

Todas las NE's se prepararon a partir de emulsiones gruesas con tamaño de gota micrométrico. Las emulsiones gruesas se obtuvieron mediante la incorporación de O gota a gota a W, usando un homogenizador (Ultra-Turrax® T50 basic IKA Works, Inc. Wilmington, EUA) operado a 6 000 rpm durante 1 min. Posteriormente, se aplicó homogenización adicional con este equipo a 8 000 rpm por 3 min y a 10 000 rpm durante 1 min, para la formación de gotas de aceite con un diámetro volumétrico superficial medio ($d_{3,2}$) de 3.5-4.0 μm . El $d_{3,2}$ de las gotas de las emulsiones gruesas se determinó con un equipo Malvern Mastersizer 3000 (Malvern Instruments, Ltd., Worcestershire, RU), estableciendo un índice de refracción de 1.473 para O (determinado previamente).

Para la obtención de las NE's, las emulsiones crudas se sometieron a 3 ciclos de microfluidización a 20 000 psi, en un Microfluidizador (Microfluidics, modelo M-110P, Newton, Massachusetts, EUA). Se utilizó un baño de hielo para evitar el calentamiento de las emulsiones.

7.2.3 Determinación del tamaño de gota y la estabilidad de las nanoemulsiones

El diámetro hidrodinámico (d_h) de gota de las NE's recién preparadas ($t < 1$ h) fue determinado con un equipo Zetasizer (Modelo Nano-ZS2000 Malvern Instruments Ltd. Malvern, Worcestershire, RU). Las NE's se diluyeron en agua

(1:10) para evitar múltiples efectos de dispersión. Después de colocar la muestra en el equipo, se dio un tiempo de reposo de 120 s antes de la medición de su tamaño de gota. El cálculo de los valores de $d_{3,2}$ de las gotas de aceite de las NE's se realizó utilizando la ecuación propuesta por Thomas (1987).

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

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

Para la determinación de la estabilidad de las NE's se evaluaron las variaciones en su tamaño de gota, durante su almacenamiento por 30 d a 5 ± 1 °C.

7.2.4 Determinación de variaciones en color de las nanoemulsiones

Las mediciones de color en las NE's se realizaron los días cero, uno, tres, siete, quince, veintiuno y treinta de almacenamiento de acuerdo a lo propuesto por Qian *et al.* (2012). Las coordenadas de color triestímulo (L^* , a^* y b^*) de las NE's fueron medidas utilizando un colorímetro manual Chroma Meter (Konica Minolta, Cabezal CR-400, New Jersey, USA). El equipo se calibró usando un estándar con azulejo de referencia blanco. Muestras de las NE's (10 mL) se colocaron en cajas Petri de cara plana transparente para realizar la medición. Los parámetros obtenidos fueron: L^* o luminosidad (valores altos muestran un color más claro); y los parámetros croma que nos indican el matiz de la emulsión, a^* (valores positivos revelan colores más rojos, mientras que valores negativos indican colores más verdes) y b^* (valores positivos indican colores más amarillos, mientras que valores negativos indican colores más azules). Todas las mediciones se realizaron por quintuplicado.

7.2.5 Eficiencia de encapsulamiento

La concentración de β -caroteno en las NE's se cuantificó después de 1 d de preparadas y a los 30 d de almacenamiento, para determinar la eficiencia de

encapsulamiento y la estabilidad del β -caroteno encapsulado durante el almacenamiento, respectivamente. La cuantificación de β -caroteno se realizó de acuerdo a lo propuesto por Britton (1996): 20 μg de NE fueron dispersadas en 2 mL de una mezcla de una solución de NaCl al 10%:metanol en una relación 1:1 (v/v); la mezcla se homogenizó con un agitador tipo vortex durante 5 min; posteriormente se agregaron 10 mL de hexano y se centrifugó a 3 000 g (Eppendorf centrifuge 5810 R 15 amp version, Eppendorf AG, Hamburgo) a 5 °C durante 10 min. La densidad óptica de la fracción orgánica del sobrenadante se midió a 450 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific™ GENESYS 10S UV-Vis, Waltham, Massachusetts, USA). Una curva estándar de β -caroteno-hexano fue realizada a concentraciones de 2×10^{-3} a 2.5×10^{-2} mg mL⁻¹. Los porcentajes de β -caroteno encapsulado y aquel presente en las NE's después del almacenamiento, se calcularon mediante la Ecuación (2).

$$C = (C_0 / C_T) * 100 \quad (2)$$

Donde C_0 es la concentración de β -caroteno al día 1 ó 30, y C_T es la concentración de β -caroteno adicionado a las nanoemulsiones para el caso del cálculo de la eficiencia de encapsulamiento o la concentración presente en las nanoemulsiones después de 1 d de elaboradas para el cálculo de su estabilidad durante el almacenamiento.

7.2.5 Actividad antioxidante de β -caroteno encapsulado

La actividad antioxidante del β -caroteno encapsulado fue determinada al día uno y treinta de almacenamiento, utilizando 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) como un radical libre, de acuerdo con el método propuesto por Lozano-Vazquez *et al.* (2015) con ligeras modificaciones. 200 μL de cada NE fueron diluidos en 15 mL de etanol al 96% (v/v) con agitación en vortex durante 1 min; posteriormente se filtró usando papel whatman No. 1. 3 mL de la mezcla anterior se mezclaron con 1 mL de solución DPPH e incubó a temperatura ambiente (21 °C) en la oscuridad durante 30 min. Soluciones de radicales DPPH presentan máxima absorción a aproximadamente 517 nm, por lo que a

esta longitud de onda se midió la absorbancia con un espectrofotómetro (Thermo Scientific™ GENESYS 10S UV-Vis Waltham, Massachusetts, USA). Etanol absoluto fue utilizado como blanco. La actividad antioxidante se expresó como el porcentaje de inhibición (% I) de los radicales libres DPPH, y se calculó usando la Ecuación (3):

$$\% I = [(A_0 - A_S) / A_0] \times 100 \quad (3)$$

Donde A_0 y A_S son los valores de absorbancia de DPPH sin muestra y la absorbancia de DPPH con muestra con, respectivamente.

7.2.6 Estabilidad de las nanoemulsiones al cremado

La estabilidad al cremado de las NE's se determinó en un equipo LUMiSizer (LUM GmbH, Berlín, Alemania), de acuerdo con el método descrito por Cuevas-Bernardino *et al.* (2016). Los parámetros utilizados para la medición se establecieron de la siguiente manera: Temperatura, 25 °C; intervalo de tiempo, 30 s; Tiempo experimental, 7650 s; velocidad de rotación, 2000 rpm.

7.2.7 Estabilidad de las nanoemulsiones ante variaciones de pH

A muestras de 20 mL de cada NE se les ajustó su valor de pH en un rango de 5.5 a 8.5, utilizando NaOH o HCL 0.1 N, se transfirieron a tubos color ámbar y se almacenaron a 5 ± 1 °C por 5 d (Hategekimana *et al.*, 2015). Transcurrido este tiempo se determinó el d_h de las gotas de aceite.

7.2.8 Propiedades reológicas de las nanoemulsiones

El comportamiento reológico de las NE's se determinó a las 24 h de su preparación, mediante pruebas oscilatorias (barridos de amplitud) y dinámicas (curvas de flujo) en un reómetro Physica MCR 301 (Anton Paar, Messtechnik, Stuttgart, Alemania), usando una geometría de cilindros concéntricos (diámetro interno = 14 mm y diámetro externo = 15 mm). Muestras de 3.7 mL de cada NE se colocaron en el equipo y se les dio un tiempo de reposo de 5 min para la recuperación de su estructura y el equilibrio de su temperatura a 25 °C (Physica

TEK 150P). Las muestras fueron sometidas a barridos de amplitud aplicando un rango de deformación de 0.01 a 100 % a una frecuencia de 1 Hz. Los valores de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') se obtuvieron mediante el software del equipo (Rheoplus/32 V2.62).

Curvas de flujo de las NE's fueron obtenidas mediante la aplicación de tasas de corte de 10^{-3} a 10^3 s^{-1} (Lobato-Calleros *et al.*, 2015). Los datos de viscosidad aparente-tasa de corte resultantes se fijaron a distintos modelos reológicos utilizando el software del reómetro.

7.3 Análisis de datos

Todos los experimentos se realizaron de manera independiente por triplicado, usando un diseño completamente al azar. Las determinaciones de los diferentes parámetros se efectuaron por triplicado, a excepción de la evaluación del color y tamaño de gota de las NE's que se llevó a cabo por quintuplicado. Los datos fueron sometidos a análisis de varianza y cuando fue adecuado se sometieron a un análisis de comparación de medias de Tukey. El análisis de datos se realizó por medio del paquete estadístico SAS versión 9.4 (SAS Institute Inc., NC, EUA).

VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Tamaño de gota y estabilidad de las nanoemulsiones

El tamaño de gota de una emulsión determina su estabilidad, apariencia, textura, y biodisponibilidad del producto encapsulado (Qian & McClements, 2011). El $d_{3,2}$ de las gotas de aceite de las NE's recién preparadas fue de 99.99 ± 7.05 nm para $E_B = 104.79 \pm 3.43$ nm para $E_M < 129.31 \pm 2.77$ nm para E_A (Cuadro 2). A partir de los valores de d_h (71.80 ± 11.47 nm para E_B ; 82.16 ± 7.34 nm para E_M y 87.71 ± 4.82 nm para E_A), puede inferirse que todas las NE's formadas presentaron $r < 100$ nm, pudiendo clasificarse como nanoemulsiones (McClements, 2011). En adición, la distribución de tamaño de gota fue mono modal (datos no mostrados), indicando que la formulación y el proceso de homogenización de las NE's fue muy eficiente para la obtención de gotas con tamaños muy similares, con $r < 100$ nm.

La presión de homogenización es un factor determinante en el tamaño y la distribución de gota de las emulsiones. Presiones altas de homogenización (> 100 MPa) producen emulsiones estables. (Yuan *et al.*, 2008). Típicamente, el diámetro medio de las gotas tiende a disminuir con el aumento de presión de homogenización y el número de pasadas, pero para ciertos emulsionantes (por lo general biopolímeros) presiones más altas y tiempos más largos de emulsificación pueden conducir a "sobre-procesamiento", lo que resulta en un aumento de tamaño de gota (Qian & McClements, 2011). El tamaño de gota y su distribución en emulsiones preparadas mediante el uso de microfluidizadores tienden a ser más pequeños y estrechos, respectivamente, en comparación con los obtenidos con otros dispositivos de homogenización (Qian & McClements, 2011).

Incrementos en la concentración de β -caroteno tendieron a incrementar el tamaño de gota de las NE's (cuadro 2). Los valores $d_{3,2}$ de las gotas de aceite de E_B y E_M recién preparadas no variaron ($p > 0.05$) con el tiempo de almacenamiento; en contraste aquellos de E_A aumentaron significativamente después de 21 d de almacenamiento (Cuadro 2). De acuerdo con McClements (2011) y Qian y McClements (2011) menores tamaños de gota muestran una mayor estabilidad frente a la floculación y coalescencia, dado que las fuerzas de atracción que actúan sobre las gotas disminuyen al disminuir su tamaño. Yi *et al.* (2014) obtuvieron nanoemulsiones utilizando caseinato de sodio como estabilizante y una concentración de 0.1 (p/p) de β -caroteno disperso en aceite de maíz ($\phi = 0.1$), las cuales fueron estables (diámetro medio de gota de 175 nm) después de un mes de almacenamiento a temperatura ambiente. Estos autores partieron de una emulsión gruesa que sometieron siete veces a una presión de 103 MPa en un microfluidizador y atribuyeron la estabilidad de las nanoemulsiones a una eficiente reducción de tamaño de gota.

Cuadro 2. Valores de diámetro volumétrico superficial medio ($d_{3,2}$) de las gotas de aceite de las nanoemulsiones.

Día	$d_{3,2}$ (nm)		
	E_B	E_M	E_A
0	99.99 \pm 7.05 ^a	104.79 \pm 3.43 ^a	129.31 \pm 2.77 ^a
1	101.05 \pm 6.00 ^a	107.09 \pm 4.39 ^a	130.59 \pm 5.79 ^a
3	102.19 \pm 6.49 ^a	108.36 \pm 5.77 ^a	134.02 \pm 1.94 ^a
7	103.07 \pm 6.67 ^a	109.95 \pm 4.62 ^a	133.31 \pm 5.78 ^a
15	105.28 \pm 5.91 ^a	111.66 \pm 5.53 ^a	136.96 \pm 8.88 ^a
21	107.47 \pm 6.01 ^a	112.90 \pm 6.18 ^a	141.88 \pm 3.40 ^b
30	107.87 \pm 6.39 ^a	114.47 \pm 6.37 ^a	160.53 \pm 8.93 ^c

Los datos son medias \pm desviaciones estándar. E: nanoemulsiones; subíndices B, M y A: concentraciones de β -caroteno baja, media y alta, respectivamente. ^{a,b,c}Diferentes superíndices en la misma columna indican que las medias difirieron significativamente ($p < 0.05$).

Yuan *et al.* (2008) observaron que el tamaño de gota de nanoemulsiones se incrementó conforme se aumentó la concentración de β -caroteno, mostrando también mayor estabilidad. Las diferencias encontradas en estabilidad respecto

a las NE's obtenidas en este trabajo, pueden deberse al tipo de emulsionante usado. Los autores mencionados utilizaron un emulsionante de bajo peso molecular (Tween 20). Es conocido que los surfactantes de bajo peso molecular son más eficientes en la estabilización de emulsiones que los biopolímeros, debido a que migran con mayor rapidez a la interface O/W, disminuyendo así la tensión interfacial (McClements & Rao, 2011).

La composición del aceite portador es otro de los parámetros clave en el control de las propiedades de las NE's. Los lípidos cuentan con una capacidad de carga limitada; el exceso de compuesto bioactivo puede ser expulsado generando la destrucción física y/o química del sistema (Gutiérrez *et al.*, 2013). La inestabilidad mostrada por las E_A pudo ser ocasionada por la baja eficiencia de entrampamiento que exhibieron, puesto que tuvieron una tasa de retención del 27.5 %, siendo una gran parte del compuesto bioactivo expulsado fuera de la fase lipídica ocasionando una desestabilización de la emulsión y un incremento significativo ($p > 0.05$) en el tamaño de gota.

Se ha demostrado que el emulsionante utilizado en emulsiones O/W afecta significativamente las características físicas y químicas de una emulsión (Verrijssen *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015b). Estudios previos han demostrado que la pectina cítrica de alto metoxilo es un emulsionante eficiente para obtener bajos tamaños de gota. Verrijssen *et al.* (2014) corroboraron que las pectinas de alto metoxilo son más eficientes en la reducción de tamaño de las gotas de aceite que las pectinas de bajo y medio grado de metoxilación, debido a su alto potencial como reductores de la tensión interfacial entre el agua y el aceite, debido a las propiedades emulsionantes de sus grupos $-\text{COOCH}_3$.

Mediante interacciones electrostáticas entre proteínas con actividad superficial y polisacáridos de carga opuesta en la interfase O/W, la estabilidad de las emulsiones puede incrementarse en gran medida durante un almacenamiento prolongado (Zinoviadou *et al.*, 2012), así como sus propiedades funcionales (Benichou *et al.*, 2007). Lo anterior, debido a la densa capa de complejo proteína-polisacárido que rodea a las gotas de aceite; la cual crea un aumento

en el efecto estérico, así como una disminución en las fuerzas de atracción van-der-Waals entre gotas, siendo así más resistentes a diferentes estreses ambientales, como cambios de pH, fuerza iónica alta y temperaturas elevadas (Liu *et al.*, 2012).

Jourdain *et al.* (2008) obtuvieron emulsiones con buena estabilidad y vida útil en almacenamiento durante 3 semanas, mediante la estabilización estérica de las gotas de aceite por complejos caseinato de sodio-sulfato de dextrano formados por interacciones electrostáticas. Liu *et al.* (2016c) prepararon emulsiones incorporadas con β -caroteno usando el método de deposición electrostática capa por capa, con tamaños de gota < 650 nm a $\text{pH} < 5$; en las cuales utilizaron complejos de ácido clorogénico–lactoferrina–glucosa/polidextrosa como agentes emulsionantes/estabilizantes. Estos autores informaron que la proteína se adsorbió en la interface O/W; mientras que la cadena de polisacárido se dirigió a la fase acuosa, favoreciéndose así la estabilización estérica de las gotas de aceite.

8.2 Determinación de variaciones en color de las nanoemulsiones

Debido a su estructura química altamente insaturada el β -caroteno es sumamente propenso a la degradación durante el procesamiento y almacenamiento (Liu *et al.*, 2016a). El β -caroteno presenta un intenso color anaranjado-rojo, el cual tiende a disminuir cuando se somete a degradación química (Qian *et al.*, 2012). El color de una emulsión depende principalmente de la luz dispersada, los índices de refracción de las fases continua y dispersa, la concentración de aceite y el tamaño de gota (Guerra-Rosas *et al.*, 2016).

La inclusión de colorantes en las emulsiones disminuye su luminosidad, dado que la luz reflejada de vuelta al detector es menor; mientras que los valores de croma tienden a aumentar puesto que la luz absorbida es mayor (McClements, 2002). Este comportamiento fue observado en las NE's, en las que se observó una disminución progresiva de luminosidad (Fig. 5a) conforme la concentración

de β -caroteno fue mayor; mientras que los valores de croma tendieron a aumentar (Fig. 5b).

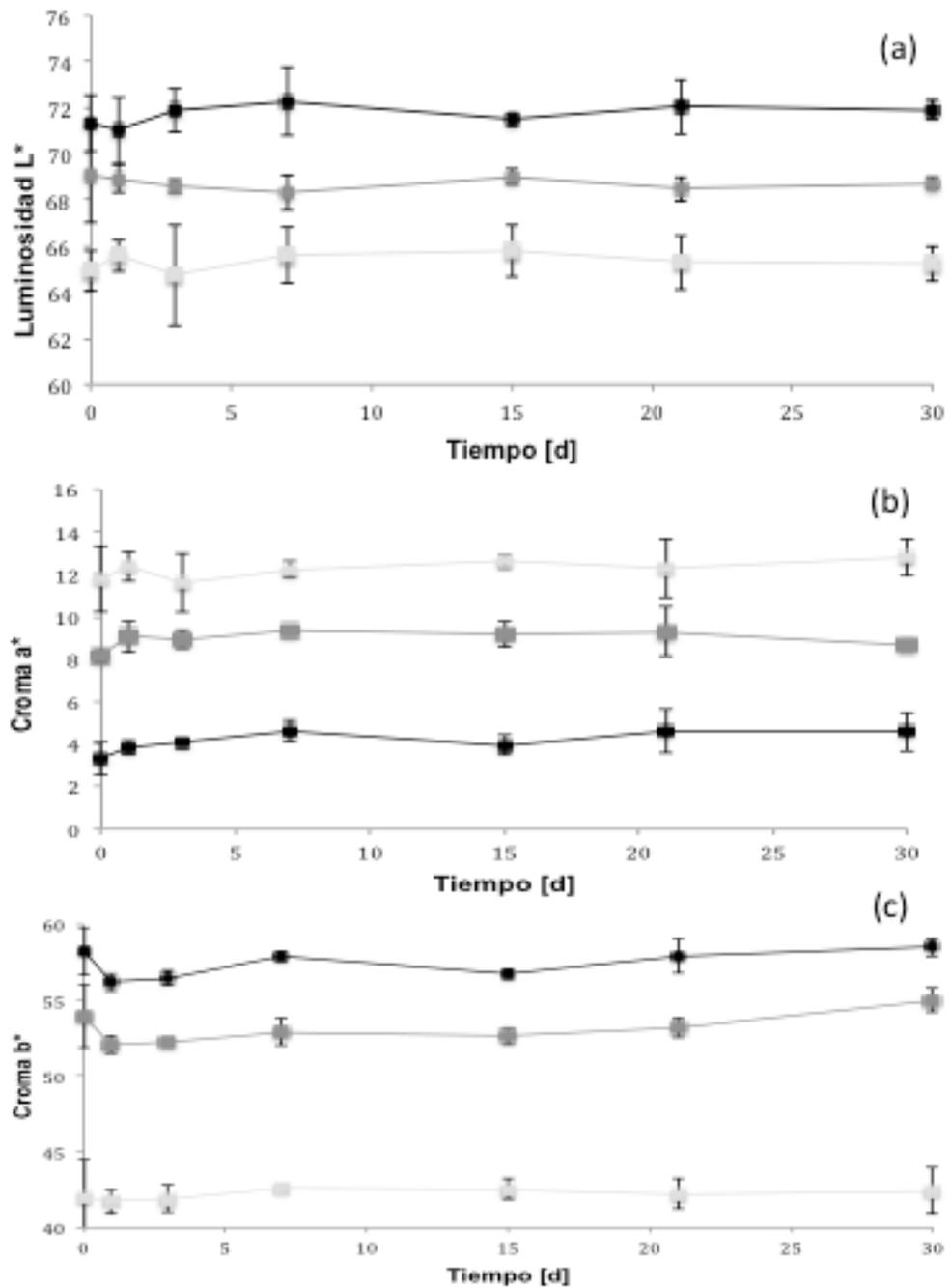


Figura 5. Variaciones en los parámetros de color de las nanoemulsiones durante el tiempo de almacenamiento. (■) E_B; (■) E_M; (□) E_A. E: nanoemulsiones; subíndices B, M y A: concentraciones de β -caroteno baja, media y alta, respectivamente.

Las emulsiones no mostraron variaciones ($p > 0.05$) en sus valores de L^* , a^* y b^* a través del tiempo de almacenamiento. A partir de estos resultados se puede inferir que el β -caroteno conservó su integridad química. Lo anterior, puede ser atribuido a un eficiente revestimiento de las gotas de aceite, impartido por el CS. La medición del color a través del almacenamiento puede constituir un método complementario para la evaluación de la estabilidad de emulsiones.

Guerra-Rosas *et al.* (2016) mencionaron que el cambio de color de emulsiones puede ser atribuido al incremento de tamaño de gota inducido por la agregación de las gotas a través del tiempo. Weiss y McClements (2001) reportaron un cambio significativo en el color de emulsiones O/W, debido al incremento de tamaño de gota mediante el fenómeno de maduración de Ostwald.

Los datos aquí mostrados concuerdan con lo informado por Silva *et al.* (2011), quienes observaron una relación entre la estabilidad física de las emulsiones y los cambios de color.

8.3 Eficiencia de encapsulamiento

La concentración de β -caroteno en las emulsiones fue medida un día después de su preparación con la finalidad de determinar la eficiencia del procesamiento de encapsulamiento, al considerar el % β -caroteno retenido en relación a la cantidad adicionada a las nanoemulsiones. Los resultados destacaron una eficiencia de encapsulamiento alta para las E_B y E_M , obteniéndose valores de $91.99 \pm 7.10\%$ y $86.80 \pm 8.02\%$, respectivamente, los cuales fueron similares entre sí ($p > 0.05$); en contraste, para el caso de E_A se obtuvo un valor de $27.02 \pm 0.86\%$ (Fig. 6). Estos resultados demuestran que el complejo soluble WPH-Pc y la técnica de microfluidización permitieron obtener nanoemulsiones con una capacidad eficiente para el encapsulamiento de β -caroteno cuando éste se incorporó en concentraciones de 25 a 50 mg 100^{-1} de emulsión.

Para analizar el impacto del CS sobre la estabilidad del β -caroteno encapsulado en las NE's, se determinó la concentración de este compuesto después de 30 d

de almacenamiento y se calculó el porcentaje de β -caroteno que permaneció íntegro en las NE's en comparación con el presente después de 1 d de almacenamiento. Los valores obtenidos fueron: 92.08 ± 4.98 % (E_B); 88.89 ± 0.99 % (E_M) y 78.26 ± 4.84 % (E_A) (Fig. 5). Al comparar las concentraciones de β -caroteno encapsulado después de 30 d de almacenamiento con la cantidad adicionada a las emulsiones, los porcentajes de este compuesto retenidos en las NE's fueron: 84.57 ± 8.90 % (E_B); 77.15 ± 7.15 % (E_M) y 21.26 ± 0.85 %.

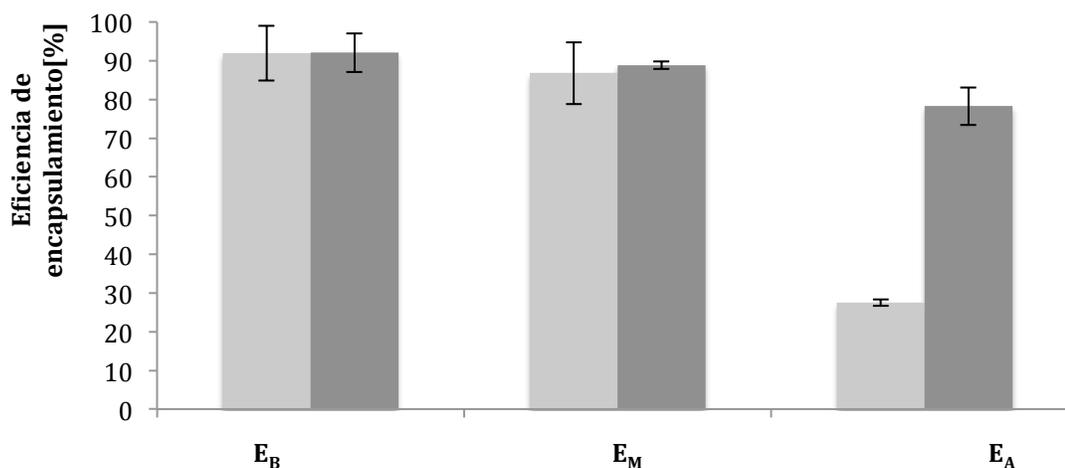


Figura 6. Eficiencia de encapsulamiento (■) y estabilidad (■) de β -caroteno después de 30 días de almacenamiento. E: nanoemulsiones; subíndices B, M y A: concentraciones de β -caroteno baja, media y alta, respectivamente.

En el cuadro 3 se presentan las concentraciones de β -caroteno encapsulado en las NE's, pudiendo observarse que no se encontraron diferencias ($p > 0.05$) entre las concentraciones de β -caroteno encapsulado después de 1 y 30 d de almacenamiento para E_B y E_M . En contraste la concentración de β -caroteno en la E_A después de 30 d de almacenamiento fue menor ($p < 0.05$) que aquella presente al día 1 de preparación (Cuadro 3). Estos resultados son acordes a los valores iniciales de $d_{3,2}$ de las NE's y su variación con el tiempo de almacenamiento; esto es, concentraciones de 25 y 50 mg de β -caroteno, rindieron E_B y E_M con tamaños de gota pequeños, estables y con elevada capacidad protectora del β -caroteno; mientras que una concentración relativamente alta de β -caroteno produjo E_A con tamaños de gota mayores, inestable y en consecuencia, con baja capacidad protectora de β -caroteno. En

adición, puede establecerse que el CS formó una película interfacial capaz de proteger la integridad de β -caroteno encapsulado en E_B y E_M , ante factores ambientales. Xu *et al.* (2012) informaron que la degradación de β -caroteno encapsulado en emulsiones fue inhibida por conjugados proteína-polisacárido (proteína de lactosuero-pectina de remolacha), debido a la formación de una gruesa capa interfacial que limitó la difusión de radicales libres.

Cuadro 3. Concentraciones de β -caroteno(mg 100 g⁻¹ de emulsión) iniciales y después del almacenamiento.

Día	E_B	E_M	E_A
1	22.99 ± 2.57 ^a	43.40 ± 5.67 ^a	20.40 ± 0.64 ^a
30	21.14 ± 2.23 ^a	38.57 ± 3.58 ^a	15.95 ± 0.64 ^b

E: nanoemulsiones; subíndices B, M y A: concentraciones de β -caroteno baja, media y alta, respectivamente. ^{a,b}Diferentes superíndices en la misma columna indican que las medias difirieron significativamente ($p < 0.05$).

Tan y Nakajima (2005) identificaron dos factores importantes que podrían ser responsables de la degradación de β -caroteno en nanodispersiones durante el almacenamiento: mayor área superficial de las gotas de la emulsión expuesta como resultado de su reducción de tamaño a escala nanométrica, y la posible formación de radicales libres durante el proceso de homogeneización a alta presión.

8.4 Actividad antioxidante

Los radicales libres son un factor fundamental que afecta la degradación de β -caroteno. Aunado a esto, el proceso de encapsulamiento de β -caroteno en nanoemulsiones conlleva diversos procesos y factores (presiones, temperaturas, proceso de mezclado, etc.) que pueden llegar a desestabilizar y/o afectar sus propiedades, por lo cual es de suma importancia realizar un análisis de la actividad antioxidante posterior a su encapsulamiento y almacenamiento, con la finalidad de corroborar que dichas propiedades siguen activas.

El método de ensayo 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) es ampliamente utilizado debido a su estabilidad y simplicidad; su sistema de reacción implica sólo la

reacción directa entre el radical y un antioxidante (Noipa *et al.*, 2011). Este método está basado en la medición espectrofotométrica de los cambios de concentración de DPPH resultantes de su reacción con un antioxidante (Dawidowicz *et al.*, 2012); el proceso se fundamenta en la reducción de una solución etanol-DPPH por medio de la donación de un hidrógeno, llevando a la formación de la estructura no radical DPPH-H. La presencia de compuestos antioxidantes repercute en la decoloración de la solución etanol-DPPH (Sen *et al.*, 2015).

Las NE's después de un día de preparadas presentaron los siguientes valores de % I (Fig. 6): 87.93 ± 7.45 (E_M) > 73.34 ± 4.47 (E_B) > 67.11 ± 6.07 (E_A). Flores-Miranda *et al.* (2015) informaron que la actividad antioxidante de nanoemulsiones está intrínsecamente relacionada con su concentración de β -caroteno. Los resultados obtenidos de % I son acordes a los valores de concentración de β -caroteno en las NE's (Cuadro 3). Los valores de % I de las NE's posteriores al almacenamiento por 30 d, fueron: 84.33 ± 10.54 (E_M), 70.39 ± 2.27 (E_B) y 58.37 ± 3.11 (E_A) (Figura 7). Los valores de % I de las E_M y E_B no presentaron decrementos significativos durante el almacenamiento; mientras que el % I de E_A disminuyó significativamente en relación al mostrado el día 1. Se ha informado que el aceite vegetal utilizado para encapsular β -caroteno puede tener efectos adversos, en sus propiedades antioxidantes, debido a su acción para evitar la oxidación de ácidos grasos (Liu *et al.*, 2016b). Tan y Nakajima (2005) identificaron que mayor área superficial de las gotas de la emulsión expuesta como resultado de su reducción de tamaño a escala nanométrica repercute sobre la oxidación de β -caroteno.

Las bajas pérdidas de actividad antioxidante de E_M y E_B pueden atribuirse a un limitado acceso de radicales libres, oxígeno y pro-oxidantes exógenos a la fase oleosa, debido al efecto protector de la gruesa capa interfacial formada por el complejo WPH-Pc.

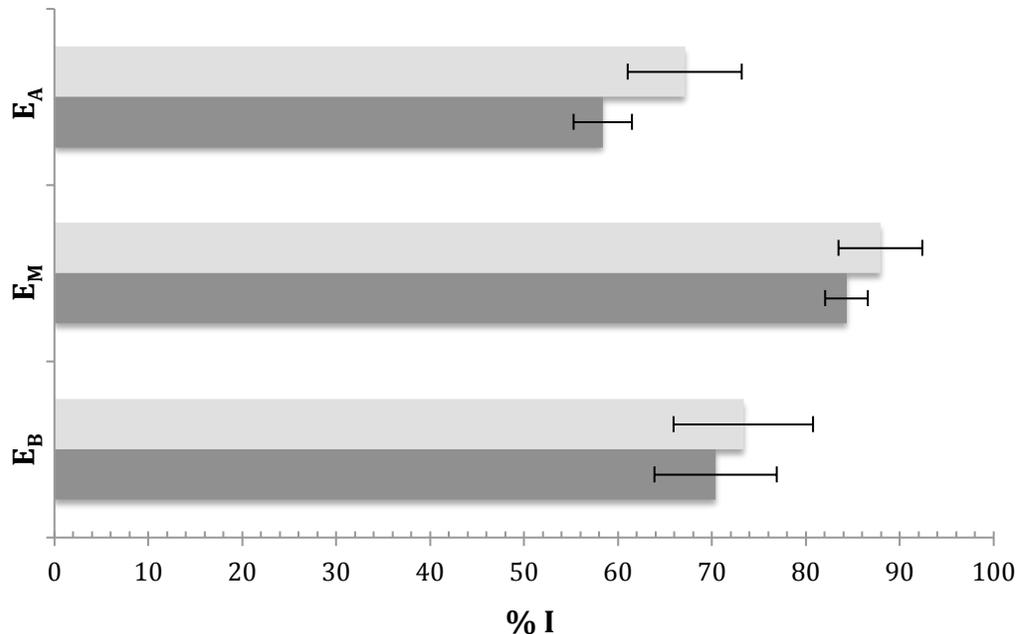


Figura 7. Procentaje de inhibición (% I) del radical DPPH de las nanoemulsiones, despues de 1 (■) y 30 (■) días de almacenamiento a 5° C. E: nanoemulsiones; subíndices B, M y A: concentraciones de β -caroteno baja, media y alta, respectivamente.

Liu *et al.* (2016a) encontraron que conjugados de fenoles-proteína-polisacárido en la interfase de emulsiones, constituyeron un medio eficiente para la prevención de la degradación de β -caroteno encapsulado, atribuyendo esto a la gruesa capa interfacial formada por el conjugado, la cual afectó la difusión de oxígeno, radicales libres y pro-oxidantes en la interfase O/W.

8.5 Estabilidad de las nanoemulsiones al cremado

La estabilidad física de las NE's se analizó también en un equipo LUMiSizer; el cual es un instrumento analítico que maneja sedimentación centrífuga con la finalidad de apresurar la aparición de los fenómenos de inestabilidad, como floculación, coalescencia y cremado. Se obtuvieron gráficas de % de transmisión normalizada (%) *versus* posición (mm) en una escala de 104 mm–130 mm (datos no mostrados), y la velocidad de cremado (% transmisión integrada/h) se obtuvo mediante el software del equipo (Cuevas-Bernardino *et al.*, 2016).

Las E_B y E_M presentaron similares velocidades de cremado, las cuales fueron menores que aquella mostrada por la E_A (Cuadro 4). Menores velocidades de cremado indican mayor estabilidad de una emulsión (Liu *et al.*, 2016c). Estos resultados concuerdan con los obtenidos para la variación de tamaño de gota de las NE's con el tiempo.

La velocidad de formación de crema se vio afectada por la concentración de β -caroteno encapsulado en las NE's y su efecto en el tamaño de gota y viscosidad (Cuadros 2, 4 y 7). La ley de Stokes establece que tamaños de gota menores y viscosidades mayores de la fase externa mejoran la estabilidad física de las emulsiones (Fennema, 1992).

Cuadro 4. Velocidad de cremado de las nanoemulsiones.

Código de la nanoemulsión	Velocidad de cremado (% transmisión integrada/h)
E _B	2.74 ± 0.41 ^a
E _M	3.03 ± 0.17 ^a
E _A	3.72 ± 0.29 ^b

Los datos son medias \pm desviaciones estándar. E: nanoemulsiones; subíndices B, M y A: concentraciones de β -caroteno baja, media y alta, respectivamente. ^{a,b}Diferentes superíndices en la misma columna indican que las medias difirieron significativamente ($p < 0.05$).

Wei y Gao (2016) y Cuevas-Bernardino *et al.* (2016) informaron que una viscosidad del medio alta y un tamaño de gota pequeño resultan en emulsiones con menores velocidades de cremado. Por su parte, Xu *et al.* (2012) demostraron que conjugados de pectina de remolacha-aislado de proteína de lactosuero actuaron eficientemente en la interfase, evitando la coalescencia y contribuyendo así a la formación de emulsiones estables al cremado. Xiang *et al.* (2015) reportaron que complejos proteína-polisacárido mejoran la estabilidad de las gotas de una emulsión contra floculación, mediante repulsión electrostática, estabilidad estérica y disminución de la atracción por fuerzas de van der Waals.

Zhao *et al.* (2014) mencionaron que los polisacáridos aniónicos pueden adsorberse sobre las superficies de las gotas revestidas por proteínas, a través de interacciones electrostáticas entre los biopolímeros. En adición, la pectina logra formar una película gruesa alrededor de las gotas estabilizando la emulsión de una manera más eficaz por medio de efecto estérico; lo anterior, debido a la estructura ramificada del polisacárido. Liu *et al.* (2016c) demostraron que emulsiones recubiertas con pectina tienen una capa interfacial más gruesa que emulsiones recubiertas por polisacáridos solubles de soya, debido a su configuración molecular más extensa.

Los resultados aquí mostrados concuerdan con las pruebas anteriormente mencionadas (tamaño de gota y colorimetría), donde se observó que la mejor estabilidad fue mostrada por las E_B y E_M , debido a los factores antes discutidos.

8.6 Estabilidad de las nanoemulsiones ante variaciones de pH

La estabilidad de las emulsiones a factores ambientales como el pH es determinada principalmente por el tipo de emulsionante utilizado (McClements & Rao, 2011). La influencia del pH sobre la estabilidad física de las emulsiones fue examinada, puesto que tiene importantes repercusiones en su aplicación en alimentos y bebidas.

El tamaño de gota de las NE's, expresado como d_h , aumentó progresivamente conforme se incrementó el valor de pH (Cuadro 5). Las interacciones electrostáticas juegan un papel muy importante durante la formación y permanencia de complejos solubles proteína-polisacárido, debido a que son controladas fundamentalmente por el signo y la densidad de carga de sus moléculas; y estas últimas dependen directamente del pH de la dispersión (Turgeon *et al.*, 2007).

Cuadro 5. Variación del diámetro hidrodinámico ($d_{3,2}$) de las nanoemulsiones con el pH.

pH	$D_{3,2}$ (nm)		
	E_B	E_M	E_A
4.25	97.82 ± 0.97^a	102.58 ± 0.79^a	127.43 ± 1.19^a
5.5	110.37 ± 1.16^b	115.75 ± 0.77^b	131.27 ± 1.75^b
6.5	121.21 ± 3.15^c	126.74 ± 2.57^c	135.51 ± 1.77^c
7.4	125.52 ± 3.07^d	137.95 ± 2.00^d	141.59 ± 2.21^d
8.5	140.25 ± 1.95^e	146.35 ± 2.18^e	155.61 ± 5.95^e

Los datos son medias \pm desviaciones estándar. E: nanoemulsiones; subíndices B, M y A: concentraciones de β -caroteno baja, media y alta, respectivamente. ^{a,b,c,d,e}Diferentes superíndices en la misma columna indican que las medias difirieron significativamente ($p < 0.05$).

La complejación entre polielectrolitos proteína-polisacárido es generalmente un proceso reversible; esto es, el complejo se disociará a valores de pH mayores al punto isoeléctrico (pI) de la proteína (Benichou *et al.*, 2007).

Para el caso de esta investigación, a pH 4.25 WPH y Pc son capaces de formar complejos solubles, debido a la diferencia en el signo de sus cargas, encontrándose la proteína cargada positivamente (NH_3^+) y la pectina negativamente (COO^-); sin embargo, elevaciones del valor de pH superiores al pI de WPH (~ 4.3), éste se encontrará cargado negativamente por la presencia predominante de grupos carboxilato (COO^-), acompañada por la transformación de grupos amonio (NH_3^+) a grupos amino (NH_2), al perder un protón. Lo anterior, posiblemente ocasiono la disociación de los biopolímeros y pérdida del CS.

Liu *et al.* (2016c) informaron incrementos elevados en el tamaño de gota de emulsiones con incrementos del pH de la dispersión, debido a la pérdida de la carga positiva de conjugados y reducción de la atracción electrostática entre la pectina y la superficie de la gota, lo cual condujo a la agregación de las gotas.

8.7 Propiedades reológicas de las nanoemulsiones

La velocidad de formación de crema y el tiempo de conservación de un producto están directamente relacionados con la viscosidad (η) de la emulsión

(Xu *et al.*, 2012). A concentraciones relativamente altas de biopolímeros, generalmente las emulsiones muestran una respuesta viscosa en tres etapas; la primera se caracteriza por un comportamiento Newtoniano a bajas deformaciones con una viscosidad limitante constante a baja tasa de corte, la segunda consta de una etapa de adelgazamiento al corte y por último la muestra alcanza una viscosidad aparente de corte infinita constante (η_{∞}) (Rao, 2010).

Los datos de viscosidad aparente (η) *versus* tasa de corte se muestran en la Figura 8. Todas las NE's mostraron una región newtoniana a tasas de corte bajas, con un valor de viscosidad aparente relativamente constante; a tasas de corte mayores exhibieron disminución pronunciada en sus valores de viscosidad aparente; i.e. comportamiento adelgazante al corte. Este tipo de comportamiento "adelgazante al corte" es característico de muchos fluidos no newtonianos (ej: fluidos poliméricos, dispersiones floculadas, coloides, etc.) y se debe probablemente a una estructura reversible o red que se forma en el estado de reposo. El corte del material causa rompimiento de la estructura, resultando en un comportamiento dependiente de la tasa de corte (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2014; Lobato-Calleros *et al.*, 2014). Los datos de la Figura 8, se ajustaron adecuadamente ($R^2 = 0.89-0.94$) al modelo reológico generalizado de Carreau-Yasuda (Ec. 4), el cual involucra comportamientos Newtonianos y no Newtonianos (Pérez-Trejo *et al.*, 2010).

$$\eta = \eta_0 [1 + (\lambda \dot{\gamma})^2]^{(n-1)/2} \quad (4)$$

Donde η es la viscosidad aparente (Pa s); λ es tiempo constante relacionado con el tiempo de relajación de las emulsiones floculadas; η_0 es la viscosidad limitante constante a baja tasa de corte (Pa s); n es el índice de comportamiento de la ley de potencia (adimensional) y $\dot{\gamma}$ es la tasa de corte (s^{-1}).

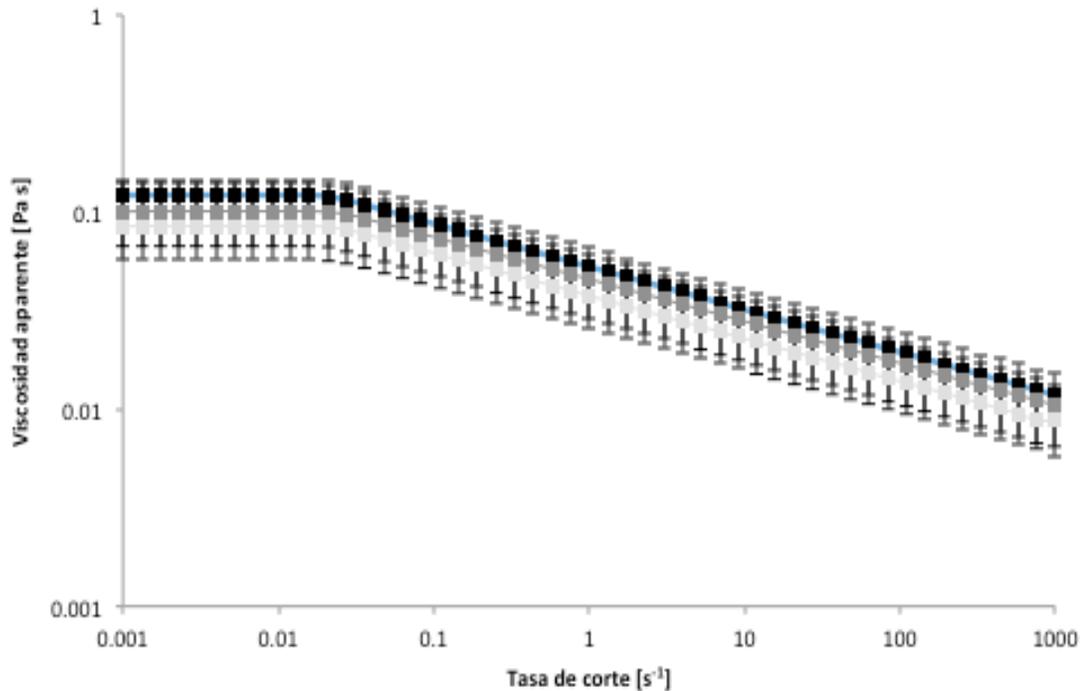


Figura 8. Cambios en la viscosidad aparente de las nanoemulsiones como función de la tasa de corte. (■) E_B; (▣) E_M; (◐) E_A. E: nanoemulsiones; subíndices B, M y A: concentraciones de β-caroteno baja, media y alta, respectivamente.

Los valores de los parámetros reológicos λ , η_0 y n de las NE's se presentan en el Cuadro 6. E_B y E_M mostraron valores de η_0 similares ($p > 0.05$) y significativamente más elevados que el mostrado por E_A. Valores más altos de η_0 sugieren la existencia de interacciones más fuertes entre los complejos biopoliméricos adsorbidos entre gotas de aceite cercanas (Murillo-Martínez *et al.*, 2011). Lo anterior, debido probablemente al menor tamaño de gota de las E_B y E_M, y en consecuencia, mayor área superficial de contacto entre gotas de aceite. Los valores más altos ($p < 0.05$) de λ para E_B y E_M, respecto al correspondiente a E_A indican un mayor tiempo de recuperación de la estructura, posiblemente debido a una mayor complejidad del sistema, asociada a un aumento en el número de gotas de aceite. Todas las NE's presentaron valores de n similares ($p > 0.05$), los cuales fueron menores a la unidad, característicos de fluidos adelgazantes al corte o pseudoplásticos (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2014).

Cuadro 6. Parámetros reológicos del modelo Carreau-Yasuda para las nanoemulsiones.

Código de la nanoemulsión	n [Adimensional]	λ [s]	η_0 [Pa s]
E _B	0.79 ± 0.00 ^a	47.45 ± 0.00 ^a	0.11 ± 0.00 ^a
E _M	0.80 ± 0.01 ^a	40.91 ± 0.06 ^a	0.10 ± 0.01 ^a
E _A	0.77 ± 0.01 ^a	24.47 ± 0.01 ^b	0.08 ± 0.01 ^b

Los datos son medias ± desviaciones estándar. E: nanoemulsiones; subíndices B, M y A: concentraciones de β-caroteno baja, media y alta, respectivamente. ^{a,b}Diferentes superíndices en la misma columna indican que las medias difirieron significativamente ($p < 0.05$).

El comportamiento viscoelástico de una emulsión puede ser caracterizado mediante los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G''), los cuales son medidas de su naturaleza elástica y viscosa, respectivamente (Lobato-Calleros *et al.*, 2006). Todas las NE's mostraron perfiles similares de G' y G'' como función del % deformación (Fig. 8), caracterizados por una región lineal a bajos valores de % deformación (Cuadro 9), en la que G' y G'' presentaron valores constantes, seguida por una región viscoelástica no lineal a deformaciones mayores, en la que se observó una inflexión pronunciada en los valores de estos módulos, como resultado del rompimiento de la estructura de las NE's.

Cuadro 7. Valores de los módulos viscoelásticos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') de las nanoemulsiones en la región viscoelástica lineal.

Código de la nanoemulsión	G' [Pa]	G'' [Pa]
E _B	23.54 ± 1.89 ^a	3.78 ± 0.15 ^a
E _M	19.87 ± 0.04 ^b	3.15 ± 0.00 ^b
E _A	7.65 ± 0.10 ^c	1.74 ± 0.01 ^c

Los datos son medias ± desviaciones estándar. E: nanoemulsiones; subíndices B, M y A: concentraciones de β-caroteno baja, media y alta, respectivamente. ^{a,b}Diferentes superíndices en la misma columna indican que las medias difirieron significativamente ($p < 0.05$).

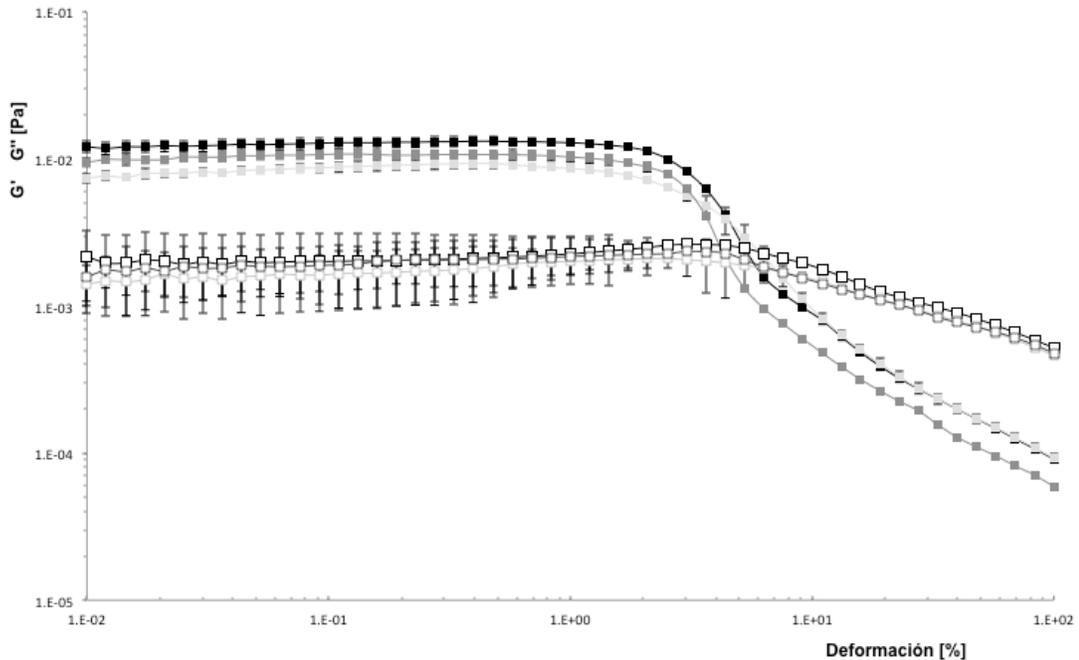


Figura 9. Cambios en los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') de las nanoemulsiones como función de la deformación. G' para (■) E_B , (▣) E_M , y (▢) E_A . G'' para (□) E_B , (□) E_M y (□) E_A . E: nanoemulsiones; subíndices B, M y A: concentraciones de β -caroteno baja, media y alta, respectivamente.

Para todas las NE's, los valores de G' fueron mayores que los valores de G'' a deformaciones relativamente bajas (<10%), indicando un comportamiento viscoelástico predominante sólido o elástico. A deformaciones mayores puede observarse el cruce de las curvas de G' y G'' como resultado de la ruptura de la estructura de las NE's, presentando entonces un comportamiento viscoelástico predominantemente líquido o viscoso (Fig. 7). Fenómenos similares han sido atribuidos a la agregación de gotas de aceite, como respuesta a la aplicación de grandes deformaciones más allá de una deformación crítica (Lobato-Calleros *et al.*, 2015).

Los valores de G' y G'' de las NE's disminuyeron progresivamente conforme la concentración de β -caroteno aumentó (Cuadro 7), variando como sigue: $E_B > E_M > E_A$, probablemente debido al aumento de gotas de aceite por unidad de volumen, lo cual favoreció las interacciones proteína-polisacárido adsorbidos en la interfase de gotas vecinas dando como resultado emulsiones más viscoelásticas (Hernández-Marín *et al.*, 2016).

CONCLUSIONES

Se obtuvieron emulsiones incorporadas con 25 y 50 mg de β -caroteno 100 g^{-1} (E_B y E_M , respectivamente), estables durante treinta días de almacenamiento bajo refrigeración, utilizando un complejo soluble de hidrolizado de proteína de lactosuero (WPH)-pectina cítrica (Pc) como agente emulsionante/estabilizante y la técnica de microfluidización para disminuir el tamaño de gota.

Una concentración de β -caroteno de $75 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ de emulsión, resultó en la formación de un sistema disperso estable sólo durante 15 d de almacenamiento.

Los valores de diámetro volumétrico superficial medio de gota de E_B y E_M fueron 100.0 ± 7.1 y 104.8 ± 3.4 nm, respectivamente, por lo que pueden ser clasificadas como nanoemulsiones.

Las eficiencias de encapsulamiento de β -caroteno fueron elevadas: $92.1 \pm 5.0\%$ para E_B y $88.9 \pm 1.0\%$ para E_M . En adición, la película interfacial formada por el complejo WPH-Pc preservó la actividad antioxidante del β -caroteno encapsulado durante el periodo de almacenamiento.

La estabilidad al cremado de las nanoemulsiones y capacidad de protección del β -caroteno encapsulado ante factores ambientales, estuvieron relacionadas con su comportamiento reológico. A mayores valores de viscosidad aparente y de módulos viscoelásticos, las nanoemulsiones fueron más estables y protegieron más eficientemente al β -caroteno.

Complejos solubles WPH-Pc pueden ser usados como películas interfaciales de nanoemulsiones para la protección de bioactivos encapsulados en estos sistemas.

LITERATURA CITADA

- Benichou, A., Aserin, A., Lutz, R., & Garti, N. (2007). Formation and characterization of amphiphilic conjugates of whey protein isolate (WPI)/xanthan to improve surface activity. *Food Hydrocolloids*, 21(3), 379-391.
- Britton G. 1996. Carotenoids. En: Hendry GAF, Houghton JD, editors. *Natural food colorants*. Londres: Blackie Academic & Professional. Pp. 109-243.
- Carrillo-Navas, H., Vernon-Carter, E. J., & Álvarez-Ramírez, J. (2014). Viscoelastic retardation spectra of interfaces formed by water/glycerol monostearate crystals in canola oil dispersions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 441, 1-7.
- Cuevas-Bernardino, J. C., Lobato-Calleros, C., Román-Guerrero, A., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2016). Physicochemical characterisation of hawthorn pectins and their performing in stabilising oil-in-water emulsions. *Reactive and Functional Polymers*, 103, 63-71.
- da Silva, L. M. R., de Figueiredo, E. A. T., Ricardo, N. M. P. S., Vieira, I. G. P., de Figueiredo, R. W., Brasil, I. M., & Gomes, C. L. (2014). Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 143, 398-404.
- Dawidowicz, A. L., Wianowska, D., & Olszowy, M. (2012). On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). *Food Chemistry*, 131(3), 1037-1043.
- Fennema, O. R. (1992). *Química de los alimentos* (No. 664.07 F335q). Zaragoza, ES: Acribia.
- Flores-Miranda, G.A., Valencia del Toro G., & Yáñez-Fernández. (2015). Stability evaluation of β -carotene nanoemulsions prepared by homogenization-emulsification process using stearic acid as oil phase. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 14(3), 667-680.
- Francis, F. 1980. Color quality evaluation of horticultural crops. *HortScience* 15(1):14-16.
- Guerra-Rosas, M. I., Morales-Castro, J., Ochoa-Martínez, L. A., Salvia-Trujillo, L., & Martín-Belloso, O. (2016). Long-term stability of food-grade nanoemulsions from high methoxyl pectin containing essential oils. *Food Hydrocolloids*, 52, 438-446.

- Gutiérrez, F. J., Albillos, S. M., Casas-Sanz, E., Cruz, Z., García-Estrada, C., García-Guerra, A., ... & Olabarrieta, I. (2013). Methods for the nanoencapsulation of β -carotene in the food sector. *Trends in Food Science & Technology*, 32(2), 73-83.
- Hategekimana, J., Chamba, M. V., Shoemaker, C. F., Majeed, H., & Zhong, F. (2015). Vitamin E nanoemulsions by emulsion phase inversion: effect of environmental stress and long-term storage on stability and degradation in different carrier oil types. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 483, 70-80.
- Hernández-Marín, N. Y., Lobato-Calleros, C., Román-Guerrero, A., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2016). Physical properties and release behaviour of caffeine multiple emulsions stabilised by binary or ternary biopolymer soluble complexes under acid, bile and yogurt storage conditions. *Food Hydrocolloids*, 58, 42-48.
- Hernández-Rodríguez, L., Lobato-Calleros, C., Pimentel-González, D. J., & Vernon-Carter, E. J. (2014). *Lactobacillus plantarum* protection by entrapment in whey protein isolate: κ -carrageenan complex coacervates. *Food Hydrocolloids*, 36, 181-188.
- Jourdain, L., Leser, M. E., Schmitt, C., Michel, M., & Dickinson, E. (2008). Stability of emulsions containing sodium caseinate and dextran sulfate: relationship to complexation in solution. *Food Hydrocolloids*, 22(4), 647-659.
- Li, X., Wang, G., Chen, D., & Lu, Y. (2015). β -Carotene and astaxanthin with human and bovine serum albumins. *Food Chemistry*, 179, 213-221.
- Liu, Y., Hou, Z., Lei, F., Chang, Y., & Gao, Y. (2012). Investigation into the bioaccessibility and microstructure changes of β -carotene emulsions during in vitro digestion. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 15, 86-95.
- Liu, F., Wang, D., Xu, H., Sun, C., & Gao, Y. (2016a). Physicochemical properties of β -carotene emulsions stabilized by chlorogenic acid–lactoferrin–glucose/polydextrose conjugates. *Food Chemistry*, 196, 338-346.
- Liu, L., Gao, Y., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2016b). Role of continuous phase protein, (-)-epigallocatechin-3-gallate and carrier oil on β -carotene degradation in oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 210, 242-248.
- Liu, F., Wang, D., Sun, C., & Gao, Y. (2016c). Influence of polysaccharides on the physicochemical properties of lactoferrin–polyphenol conjugates coated β -carotene emulsions. *Food Hydrocolloids*, 52, 661-669.
- 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 W 1/O/W 2 multiple emulsions: Viscoelastic and

- high-resolution image analyses. *Food Research International*, 39(6), 678-685.
- Lobato-Calleros, C., Ramírez-Santiago, C., Vernon-Carter, E. J., & Álvarez-Ramírez, J. (2014). Impact of native and chemically modified starches addition as fat replacers in the viscoelasticity of reduced-fat stirred yogurt. *Journal of Food Engineering*, 131, 110-115.
- Lobato-Calleros, C., Hernandez-Jaimes, C., Chavez-Esquivel, G., Meraz, M., Sosa, E., Lara, V. H., ... & Vernon-Carter, E. J. (2015). Effect of lime concentration on gelatinized maize starch dispersions properties. *Food Chemistry*, 172, 353-360.
- Lozano-Vazquez, G., Lobato-Calleros, C., Escalona-Buendia, H., Chavez, G., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2015). Effect of the weight ratio of alginate-modified tapioca starch on the physicochemical properties and release kinetics of chlorogenic acid containing beads. *Food Hydrocolloids*, 48, 301-311.
- McClements, D. J. (2002). Colloidal basis of emulsion color. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7(5), 451-455.
- McClements, D. J. (2011). Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*, 7(6), 2297-2316.
- McClements, D. J., & Rao, J. (2011). Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(4), 285-330.
- 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(4), 577-585.
- Noipa, T., Srijaranai, S., Tuntulani, T., & Ngeontae, W. (2011). New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems. *Food Research International*, 44(3), 798-806.
- Pérez-Trejo, L., Sánchez, A. F. M., & Mercado, A. P. (2010). Determinación de la viscosidad de fluidos newtonianos y no newtonianos (una revisión del viscosímetro de Couette). *Latin-American Journal of Physics Education*, 4(1), 36.
- Qian, C., Decker, E. A., Xiao, H., & McClements, D. J. (2012). Physical and chemical stability of β -carotene-enriched nanoemulsions: Influence of pH, ionic strength, temperature, and emulsifier type. *Food Chemistry*, 132(3), 1221-1229.
- Qian, C., & McClements, D. J. (2011). Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: factors affecting particle size. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1000-1008.

- Qiu, D. A. N., Shao, S. X., Zhao, B., Wu, Y. C., Shi, L. F., Zhou, J. C., & Chen, Z. R. (2012). Stability of β - carotene in thermal oils. *Journal of Food Biochemistry*, 36(2), 198-206.
- Rao, M. A. (2010). *Rheology of Fluid and Semisolid Foods*. Nueva York: Springer Science & Business Media.
- Sen Gupta, S., & Ghosh, M. (2015). Synthesis, characterization, stability evaluation and release kinetics of fiber-encapsulated carotene nano-capsules. *Grasas y Aceites*, 66(4), 104.
- Silva, H. D., Cerqueira, M. A., Souza, B. W., Ribeiro, C., Avides, M. C., Quintas, M. A., & Vicente, A. A. (2011). Nanoemulsions of β -carotene using a high-energy emulsification–evaporation technique. *Journal of Food Engineering*, 102(2), 130-135.
- Tan, C. P., & Nakajima, M. (2005). Effect of polyglycerol esters of fatty acids on physicochemical properties and stability of β - carotene nanodispersions prepared by emulsification/evaporation method. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(1), 121-126.
- Thomas, J. C. (1987). The determination of log normal particle size distributions by dynamic light scattering. *Journal of Colloid and Interface Science*, 117(1), 187-192.
- Trujillo, D. (2013). Estabilidad y propiedades reológicas de micro y nano-emulsiones aceite-en-agua preparadas con complejos solubles hidrolizado de proteína de lactosuero-pectina de tejocote (Tesis maestría). Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México.
- Turgeon, S. L., Schmitt, C., & Sanchez, C. (2007). Protein–polysaccharide complexes and coacervates. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 12(4), 166-178.
- Verrijssen, T. A., Balduyck, L. G., Christiaens, S., Van Loey, A. M., Van Buggenhout, S., & Hendrickx, M. E. (2014). The effect of pectin concentration and degree of methyl-esterification on the in vitro bioaccessibility of β -carotene-enriched emulsions. *Food Research International*, 57, 71-78.
- Wang, S., Chen, X., Shi, M., Zhao, L., Li, W., Chen, Y., ... & Li, Y. (2015). Absorption of whey protein isolated (WPI)-stabilized β -Carotene emulsions by oppositely charged oxidized starch microgels. *Food Research International*, 67, 315-322.
- Wei, Z., & Gao, Y. (2016). Physicochemical properties of β -carotene emulsions stabilized by chitosan–chlorogenic acid complexes. *LWT-Food Science and Technology*, 71, 295-301.
- Weiss, J., & McClements, D. J. (2001). Color changes in hydrocarbon oil-in-water emulsions caused by Ostwald ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4372-4377.

- Xiang, J., Liu, F., Fan, R., & Gao, Y. (2015). Physicochemical stability of citral emulsions stabilized by milk proteins (lactoferrin, α -lactalbumin, β -lactoglobulin) and beet pectin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 487, 104-112.
- Xu, D., Wang, X., Jiang, J., Yuan, F., & Gao, Y. (2012). Impact of whey protein–Beet pectin conjugation on the physicochemical stability of β -carotene emulsions. *Food Hydrocolloids*, 28(2), 258-266.
- Yi, J., Li, Y., Zhong, F., & Yokoyama, W. (2014). The physicochemical stability and in vitro bioaccessibility of beta-carotene in oil-in-water sodium caseinate emulsions. *Food Hydrocolloids*, 35, 19-27.
- Yuan, Y., Gao, Y., Mao, L., & Zhao, J. (2008). Optimisation of conditions for the preparation of β -carotene nanoemulsions using response surface methodology. *Food Chemistry*, 107(3), 1300-1306.
- Zhang, R., Zhang, Z., Zhang, H., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2015a). Influence of lipid type on gastrointestinal fate of oil-in-water emulsions: In vitro digestion study. *Food Research International*, 75, 71-78.
- Zhang, R., Zhang, Z., Zhang, H., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2015b). Influence of emulsifier type on gastrointestinal fate of oil-in-water emulsions containing anionic dietary fiber (pectin). *Food Hydrocolloids*, 45, 175-185.
- Zhao, J., Xiang, J., Wei, T., Yuan, F., & Gao, Y. (2014). Influence of environmental stresses on the physicochemical stability of orange oil bilayer emulsions coated by lactoferrin–soybean soluble polysaccharides and lactoferrin–beet pectin. *Food Research International*, 66, 216-227.
- Zinoviadou, K. G., Scholten, E., Moschakis, T., & Biliaderis, C. G. (2012). Properties of emulsions stabilised by sodium caseinate–chitosan complexes. *International Dairy Journal*, 26(1), 94-101.