



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

POSGRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

**PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y VISCOELÁSTICAS DE
EMULSIONES DE DISTINTAS FRACCIONES DE GRASA
LÁCTEA ESTABILIZADAS CON COMPLEJOS BIOPOLIMÉRICOS
SOLUBLES**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

Presenta:

DULCE MARIA PEDROZA PEDROZA

Bajo la supervisión de:

Dra. Consuelo Silvia Olivia Lobato Calleros



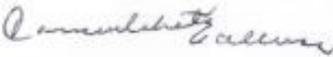
DIRECCION GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

Chapingo, Estado de México, enero de 2018

PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y VISCOELÁSTICAS DE EMULSIONES DE
DISTINTAS FRACCIONES DE GRASA LÁCTEA ESTABILIZADAS CON
COMPLEJOS BIOPOLIMÉRICOS SOLUBLES

Tesis realizada por DULCE MARIA PEDROZA PEDROZA bajo la supervisión del
comité asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial
para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

DIRECTOR:  _____

DRA. CONSUELO SILVIA OLIVIA LOBATO CALLEROS

ASESORA:  _____

DRA. OFELIA SANDOVAL CASTILLA

ASESORA:  _____

DRA. LANDY HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

CONTENIDO

| | |
|---|------|
| CONTENIDO..... | III |
| LISTA DE CUADROS..... | VI |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | VIII |
| AGRADECIMIENTOS..... | IX |
| DATOS BIBLIOGRÁFICOS..... | X |
| RESUMEN GENERAL..... | XI |
| 1. INTRODUCCIÓN GENERAL..... | 1 |
| 2. REVISIÓN DE LITERATURA..... | 3 |
| 2.1 Emulsiones..... | 3 |
| 2.2 Región interfacial..... | 4 |
| 2.2.1 Biopolímeros..... | 5 |
| 2.2.3 Mecanismos de desestabilización | 10 |
| 2.3 Fase oleosa..... | 11 |
| 2.3.1 Características de los lípidos..... | 11 |
| 2.3.3 Modificación fisicoquímica de las grasas..... | 12 |
| 2.3.4 Fase oleosa de las emulsiones | 13 |
| 2.4 Propiedades viscoelásticas de las emulsiones | 13 |
| 2.5 Referencias | 14 |
| 3. OBTENCIÓN, COMPOSICIÓN QUÍMICA Y COMPORTAMIENTO TÉRMICO DE FRACCIONES DE GRASA LÁCTEA..... | 17 |
| 3.1. Introducción..... | 19 |
| 3.2. Materiales y métodos | 22 |
| 3.2.1 Fraccionamiento de la grasa láctea anhidra | 23 |
| 3.2.2 Composición química de las fracciones de GL..... | 25 |
| 3.2.3 Análisis calorimétrico para las fracciones de GL | 26 |
| 3.2.4 Propiedades viscoelásticas de las fracciones de GL..... | 27 |
| 3.2.5 Análisis estadístico de datos | 27 |
| 3.3. Resultados y discusión..... | 28 |
| 3.3.1 Composición química de la AMF y sus fracciones | 28 |
| 3.3.2 Comportamiento térmico | 32 |
| 3.3.3 Propiedades viscoelásticas en función de la temperatura | 36 |
| 3.4. Conclusiones..... | 39 |
| 3.5. Agradecimientos..... | 40 |

| | |
|---|----|
| 3.6 Referencias | 40 |
| 4. CARACTERIZACIÓN DEL ACOMPLEJAMIENTO DE HIDROLIZADO DE PROTEÍNA DE SUERO Y GOMA DE MEZQUITE..... | 43 |
| 4.1 Introducción..... | 45 |
| 4.2 Materiales y métodos | 47 |
| 4.2.1 Materiales..... | 47 |
| 4.2.2 Determinación del potencial zeta de los biopolímeros..... | 48 |
| 4.2.3 Determinación del efecto de la relación en peso entre WPH y GM biopolímeros sobre la formación de complejos solubles | 48 |
| 4.2.4 Rendimiento de coacervación | 49 |
| 4.2.5 Diámetro volumétrico medio de los complejos solubles | 50 |
| 4.2.6 Medición de potencial zeta en los complejos solubles | 50 |
| 4.2.7 Análisis de datos | 51 |
| 4.3. Resultados y discusión..... | 51 |
| 4.3.1 Potencial zeta de los biopolímeros | 51 |
| 4.3.2 Determinación del punto de máxima interacción electrostática | 52 |
| 4.3.3 formación de complejos solubles entre WPH y GM..... | 53 |
| 4.3.4 Diámetro promedio volumétrico de complejos solubles..... | 55 |
| 4.4 Conclusiones..... | 57 |
| 4.5 Referencias | 57 |
| 5. ESTABILIZACIÓN DE EMULSIONES O/W CON COMPLEJOS BIOPOLIMERICOS UTILIZANDO DIFERENTES FRACCIONES DE GRASA LÁCTEA..... | 60 |
| 5.1. Introducción..... | 62 |
| 5.2. Materiales y métodos | 64 |
| 5.2.1 Materiales..... | 64 |
| 5.2.2 Formación de emulsiones O/W | 65 |
| 5.2.3 Estabilización de emulsiones O/W | 66 |
| 5.2.4 Propiedades reológicas | 67 |
| 5.2.5 Análisis estadístico de datos | 68 |
| 5.3. Resultados y discusión..... | 68 |
| 5.3.1 Estabilización de emulsiones O/W | 68 |
| 5.3.2 Cambios en el Diámetro volumétrico superficial D(3,2)..... | 71 |

| | |
|---|----|
| 5.3.3 Potencial zeta de emulsiones | 72 |
| 5.3.4 Micrografías | 73 |
| 5.3.5 Curvas de flujo de las emulsiones O/W | 75 |
| 5.3.6 Propiedades mecánicas de las emulsiones O/W | 78 |
| 5.4 Conclusiones | 81 |
| 5.5 Referencias | 82 |

LISTA DE CUADROS

| | |
|---|----|
| Cuadro 1. Perfil de ácidos grasos. Composición porcentual de ácidos grasos constituyentes de la grasa láctea anhidra y de sus fracciones..... | 29 |
| Cuadro 2. Contenido de colesterol (mg/100g) de la grasa láctea anhidra y de sus fracciones..... | 30 |
| Cuadro 3. Temperaturas de transición y entalpías de cristalización y fusión de las fracciones grasas y grasa láctea..... | 35 |
| Cuadro 4. Parámetros reológicos en la regiones viscoelástica lineal y no lineal, y temperatura de cambio de comportamiento reológico ($\tan \delta = 1$)..... | 37 |
| Cuadro 5. Determinación de tratamientos para la formación de complejos biopoliméricos al 1% p/p..... | 49 |
| Cuadro 6. Fuerza de interacción electrostática (SEI) calculada con el potencial zeta (ζ) de las dispersiones, acorde (Espinosa-Andrews <i>et al.</i> , 2013)..... | 53 |
| Cuadro 7. Variación de potencial zeta y diámetro promedio volumétrico D (3,0), determinado para los complejos insolubles y complejos solubles..... | 56 |
| Cuadro 8. Tasa de coalescencia obtenida en las primeras 24 h de almacenamiento de los tratamientos..... | 69 |
| Cuadro 9. Seguimiento del diámetro promedio volumétrico D(3,0) de cada tratamiento en función del tiempo..... | 70 |
| Cuadro 10. Variaciones del diámetro volumétrico-superficial D(3,2) en función del tiempo..... | 71 |
| Cuadro 11. Potencial zeta de las emulsiones registrado a las 24 horas de almacenamiento..... | 73 |
| Cuadro 12. Parámetros reológicos del modelo Carreau-Yasuda para las emulsiones simples y complejo biopolimérico utilizado | 76 |
| Cuadro 13. Parámetros reológicos en la región viscoelástica lineal y no lineal y deformación de cambio de comportamiento reológico..... | 79 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Esquema de estabilización de sistemas coloidales O/W a partir de tres mecanismos diferentes. Tomado de Araiza-Calahorra <i>et al.</i> , (2018)..... | 4 |
| Figura 2. Estructuras químicas de los carbohidratos que componen a la GM..... | 6 |
| Figura 3. Representación esquemática de la formación de complejos biopoliméricos en función del pH..... | 9 |
| Figura 4. Esquema de doble fraccionamiento..... | 24 |
| Figura 5. Termogramas de la grasa láctea anhidra y sus fracciones..... | 33 |
| Figura 6. Variaciones en los módulos viscoelásticos de las fracciones grasas y la grasa láctea anhidra como función de la temperatura: | 39 |
| Figura 7. Purificación de goma de mezquite (GM). Apariencia del material en las diferentes etapas de purificación. a) selección, b) maceración c) dispersión d y e) secado f) almacenamiento. | 47 |
| Figura 8. Potencial zeta y punto isoeléctrico (pI) en función del pH de las diluciones de GM y WPH al 0.05% (p/p) analizadas de manera individual..... | 51 |
| Figura 9. Rendimiento de coacervación y absorbancia registrada por triplicado para las relaciones probadas. | 54 |
| Figura 10. Micrografías (100x) de las emulsiones O / W a las 24 h y 6 días de almacenamiento..... | 74 |
| Figura 11. Curva de flujo adecuada al modelo Carreau-Yasuda..... | 75 |
| Figura 12. Variación de los módulos G' (a), G'' (b) y (c) G''/G' de las emulsiones O/W con diferentes fracciones de grasa láctea y AMF con complejos solubles WPH:GM (1:1, al 10% ST) durante el barrido de deformación | 80 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----|---------------------------------------|
| GL | Grasa Láctea |
| AMF | Grasa láctea anhidra |
| HMF | Fracción de alto punto de fusión |
| MMF | Fracción de medio punto de fusión |
| LMF | Fracción de bajo punto de fusión |
| WPH | Hidrolizado de proteína de lactosuero |
| GM | Goma de Mezquite |
| O/W | Emulsión aceite-agua |
| PPI | Aislado de proteína de chícharo |
| CI | Complejo Insoluble |
| CS | Complejo Soluble |
| CB | Complejo Biopolimérico |
| pl | Punto Isoeléctrico |
| FS | Fase Sólida |
| G´ | Módulo de almacenamiento |
| G´´ | Módulo de pérdida |
| SEI | Máxima interacción electrostática |
| DSC | Calorimetría Diferencial de Barrido |

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el financiamiento otorgado para continuar con mi formación académica.

A la Universidad Autónoma Chapingo, al Departamento de Ingeniería Agroindustrial y al Departamento de Preparatoria Agrícola por las facilidades brindadas para la realización de esta investigación.

A mi familia, por ser mi apoyo incondicional.

A la Dra. Consuelo Lobato Calleros, por su apoyo en la dirección de este proyecto de investigación y ser ejemplo de dedicación.

A la Dra. Landy Hernández por su asesoría, apoyo y confianza brindados para realizar este proyecto.

A la Dra. Ofelia Sandoval por la disposición mostrada a este trabajo. Por sus enseñanzas en el aula y consejos.

A mis compañeros de maestría, quienes con su cariño, confianza y amistad me hicieron sentir en casa.

Al grupo de trabajo de alimentos funcionales, quienes con su experiencia enriquecieron este trabajo.

A los trabajadores, profesores y alumnos de chapingo, quienes me apoyaron durante mi estancia.

A la organización estudiantil DUX, con quienes encontré el significado de fraternidad y trabajo en equipo.

DATOS BIBLIOGRÁFICOS

Dulce Maria Pedroza Pedroza, originaria de Lagos de Moreno, Jalisco, obtuvo su título en Ingeniería Bioquímica otorgado en el 2013 por Centro Universitario de los Lagos, perteneciente a la Universidad de Guadalajara. Posteriormente ejerció durante dos años en el puesto de supervisor de producción para una planta productora de derivados lácteos. En 2015 es admitida en el programa de Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria.

RESUMEN GENERAL

PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y VISCOELÁSTICAS DE EMULSIONES DE DISTINTAS FRACCIONES DE GRASA LÁCTEA ESTABILIZADAS CON COMPLEJOS BIOPOLIMÉRICOS

Como estrategia nutricional en la sustitución de grasa, se han utilizado aceites vegetales que pese a tener un perfil con menores ácidos grasos saturados, los atributos sensoriales se han demeritado. Otro inconveniente es que la reducción de lípidos, en algunos alimentos, conlleva a la utilización de polisacáridos, lo que conlleva al aumento de la respuesta glucémica. Para favorecer un perfil saludable en la grasa láctea y disminuir el uso de polisacáridos, en este trabajo se tuvo como objetivos el utilizar la técnica de fraccionamiento en grasa láctea y obtener 3 fracciones composicionalmente diferentes, las cuales estarán dispersas en una emulsión O/W. utilizando como emulsionantes/estabilizantes complejos solubles formados por la interacción proteína de lactosuero:goma de mezquite (WPH:GM; 10% p/p, pH 3.5, 1:1). Las 3 fracciones obtenidas presentaron puntos de fusión diferenciados con la grasa láctea (18.48 a 39.79 °C). Las emulsiones O/W (ϕ :0.3) no mostraron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) para la viscosidad aparente. Fueron estables hasta por 6 días a 5 ± 1 °C con diámetro promedio superficial entre 3.0 a 3.14 μm en las primeras 24 horas de almacenamiento. La viscosidad no estuvo afectada por el punto de fusión de la fase oleosa más su comportamiento elástico estuvo relacionado con el contenido de ácidos grasos insaturados. La actividad interfacial no se vio afectada por el ordenamiento de la grasa láctea a la que está sujeta a 5 ± 1 °C, incrementado la posibilidad de utilización de este tipo de emulsiones en alimentos congelados.

Palabras clave: fraccionamiento térmico, goma de mezquite, complejos solubles, Carreau-Yasuda, interacción electrostática

¹Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria
Universidad Autónoma Chapingo
Dulce María Pedroza Pedroza
Consuelo S.O. Lobato Calleros

ABSTRACT

PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND VISCOÉLASTIC OF EMULSIONS WITH DIFFERENT FRACTIONS OF MILK FAT STABILIZED WITH BIOPOLIMERIC COMPLEXES

Using like nutritional strategy for substitution of fat, has been used vegetal oil. Although contains less saturated fatty acids, the sensorial attributes decreased. Another inconvenient is that utilization of polysaccharides for the reduction of fat, implies an increase in the glycemic response. Trying to favoring a healthy profile in milk fat and diminish the use of polysaccharides, the aim in this work was to use a double dry fractionation process to obtain 3 compositionally different fractions of milk fat, each one will be dispersed in an emulsion O/W. Stability of emulsions was verify using soluble complexes, formed by the interaction of whey protein hidrolysate and mesquite gum (WPH: GM), like interfacial particles for milk fat droplets. The obtained fractions have a different melting point (18.48 to 39.79 °C). The relation WPH: GM for the emulsification of milk fat fractions was 1:1 with pH 3.5 and 10% solids. The viscosity for emulsions O/W (ϕ : 0.3) with different milk fat fractions weren't significantly different ($p \leq 0.05$). Maintained 6 days of stability at 5 ± 1 °C. The superficial mean diameter $D(3,2)$ was between 3.0 and 3.14 μm in the first 24 hours of storage. The obtained results for viscoelasticity, suggests than the mechanical properties obtained in the emulsions were for the protector effect in the interface by the biopolymer complexes and not for the thermal properties in the fractions. The utilization of soluble complexes stabilize the milk fat fractions, with a mean coalescence rate of 2.45×10^{-07} for the treatments until the crystallization of milk fat at 5°C . Increasing the possibility of utilization of these emulsions in frozen foods.

KEY WORDS: dry fractionation, mesquite gum, soluble complexes, Carreau-Yasuda, electrostatic interaction

¹Thesis Universidad Autónoma Chapingo
Dulce Maria Pedroza Pedroza
Consuelo S.O. Lobato Calleros

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

En la actualidad para la formulación de alimentos procesados, se busca implementar opciones que minimicen la utilización de ingredientes sintéticos, con el fin de inferir positivamente en la apreciación del consumidor. El fraccionamiento de la grasa láctea es una oportunidad de obtener ingredientes diferenciados, que permitan conservar atributos sensoriales e incidir en la estructura del alimento. Este proceso toma parte de las características térmicas de los lípidos (punto de fusión y cristalización) para inducir la separación de sus componentes sin utilizar solventes. De esta manera se podrá utilizar, acorde de las características del alimento, la fracción más conveniente. Sin embargo, la grasa láctea dentro de una matriz alimentaría debe de utilizar partículas o moléculas que las protejan de la oxidación o que eviten la formación de una capa de lípidos. Para ello se utilizan emulsificantes que de manera efectiva garanticen la retención de la grasa en el alimento. Entre las moléculas naturales con acción emulsificante figuran los fosfolípidos y los complejos poliméricos. Estos últimos pueden ser formados a través de las interacciones proteína: polisacárido con lo cual se incrementan las posibilidades de enriquecer nutricionalmente un alimento. Los complejos biopoliméricos han sido utilizados en la estabilización de emulsiones múltiples o sencillas como las O/W, utilizando diferentes fuentes para la inducción del acomplejamiento. En este trabajo se utilizará proteína de suero, por ser un ingrediente de fácil disposición en el mercado, la goma de mezquite se utilizará como alternativa a la goma arábiga además que propicia nuevas aplicaciones para este subproducto natural, brindando más opciones para impulsar una industria que procese este ingrediente alimenticio.

Por ello se generó la siguiente hipótesis: los complejos solubles formados entre la proteína de suero y la goma de mezquite poseen las características de estabilización necesarias para que las gotas de grasa láctea y sus fracciones puedan estar dispersas en una emulsión O/W

El objetivo general de este trabajo fue evaluar la utilización de los complejos solubles obtenidos con proteína de suero:goma de mezquite, para la estabilización de emulsiones O/W en las que se dispersarán fracciones de grasa láctea con diferentes puntos de fusión. La metodología se dividió en 3 etapas. En la primera se diseñó un proceso de modificación de grasas a escala laboratorio libre de solventes con el cual se pudieron obtener 3 fracciones con propiedades térmicas y composición química diferente entre sí. Particularmente, se observó la variación del colesterol y ácidos grasos insaturados debido al proceso empleado. Para la segunda fase se describieron las características fisicoquímicas (potencial zeta, diámetro volumétrico, rendimiento de coacervación, absorbancia) debidas a la variación de proteína en la formación de los complejos solubles proteína de suero:goma de mezquite utilizando 5 variaciones. En esta fase se definieron las condiciones químicas necesarias para la máxima interacción entre los biopolímeros. Finalmente, se utilizaron los complejos solubles como material de pared para la estabilización de emulsiones O/W en las que se utilizaron las diferentes fracciones de grasa láctea. Para la evaluación de estas emulsiones se utilizó la tasa de coalescencia y la morfología en función del tiempo además, se estudiaron las propiedades viscoelásticas.

Hasta ahora se carecen de trabajos en los que se describan los efectos de la utilización de complejos solubles como alternativa a las moléculas anfifílicas en emulsiones que contengan grasa láctea o fracciones. La información generada de esta investigación tiene el potencial de impulsar más trabajos en los que los perfiles de las grasas son modificados y utilizados en sistemas coloidales naturales para su aplicación en matrices alimentarias enriqueciendo nutricionalmente el alimento que las contenga.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Emulsiones

Los coloides consisten en una dispersión de una fase en otra. Algunos coloides son termodinámicamente estables y generalmente se forman espontáneamente, mientras que otros son metaestables, lo que significa que requieren de energía para ser preparados y para que las propiedades de dispersión se mantengan (Appelqvist, Golding, Vreeker, & Zuidam, 2007; Dickinson, 2006), por lo que es necesario utilizar moléculas con actividad interfacial para reducir la energía entre las fases y lograr un sistema estable en función del tiempo, para favorecer su adsorción en la interfase es necesario aplicar energía al sistema, para ello se utilizan fuentes externas (homogenización, presión, sonicación, etc) que favorezcan la formación de gotas con distribución homogénea de tamaño (Leal-Calderon, Bibette, & Schmitt, 2007 b).

Las emulsiones son un ejemplo de un coloide metaestable. Las emulsiones simples están compuestas por 2 líquidos inmiscibles (por lo regular aceite y agua) una dispersa en otra, en presencia de partículas o moléculas con actividad interfacial (anfifílicas) (Araiza-Calahorra et al., 2018). Otras emulsiones llamadas múltiples, consisten en pequeñas gotas de agua contenidas dentro de gotas de aceite más grandes dispersas en una fase acuosa continua. El arreglo de los líquidos (O/W/O, W/O/W, W/O, O/W, W/W/O,) dependerá de la funcionalidad para la que fueron diseñados (Leal-Calderon, Bibette, & Schmitt, 2007 a).

Las propiedades mecánicas y dinámicas presentadas en las emulsiones, dependerán de varios factores: la variación del volumen (ϕ) (va de 0 hasta 1), temperatura de almacenamiento, cantidad de emulsificante utilizado, viscosidad

de la fase continua, tipo de aceite utilizado, tamaño de gota obtenido y condiciones físicas de la fase continua (pH, presencia de iones, potencial zeta y concentración), entre otros. Al comprender los mecanismos y componentes que estabilizan a las emulsiones se podrán diseñar partículas coloidales funcionales con grado alimenticio.

2.2 Región interfacial

Durante el almacenamiento de una emulsión, las gotas dispersas están sometidas a la fuerza de gravedad, agitación y efectos térmicos. Estos fenómenos inducen la movilidad de las gotas logrando que eventualmente colapsen entre ellas (Ruíz-Ramos *et al.*, 2006). Las gotas de manera individual requieren de un tipo de barrera interfacial para prevenir la coalescencia entre las gotas vecinas.

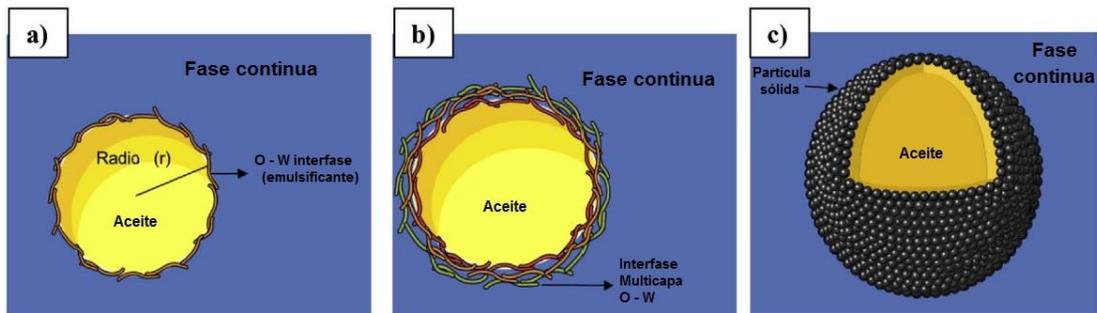


Figura 1. Esquema de estabilización de sistemas coloidales O/W a partir de tres mecanismos diferentes. Tomado de Araiza-Calahorra *et al.*, (2018).

La estabilización de sistemas coloidales (Figura 1) como las emulsiones pueden llevarse a cabo mediante tres mecanismos (Araiza-Calahorra *et al.*, 2018; Nushtaeva, 2016):

a) moléculas anfifílicas de bajo peso molecular. La estabilización es lograda por la utilización de surfactantes (tween, span, polisorbato, fosfolípidos, monoglicéridos, proteínas o polisacáridos como la goma arábiga) los cuales disminuyen la tensión superficial.

b) sistemas multicapas. Las gotas de aceite estarán estabilizadas electrostáticamente por capas de emulsificantes. Los polielectrolitos son adsorbidos por las fuerzas de atracción de los componentes utilizados, los cuales son añadidos de manera individual. Con ello se crea una barrera mecánica que al tener carga genera repulsión entre las gotas.

c) partículas pickering. Son estabilizadas por partículas sólidas que son adsorbidas de manera irreversible en la interfase

2.2.1 Biopolímeros

Los biopolímeros tienen la capacidad de actuar efectivamente como agentes estabilizadores en una amplia variedad de sistemas alimenticios. La mayoría de estas macromoléculas mantienen la estructura y el comportamiento de donde fueron extraídas.

Goma de mezquite

Los polisacáridos son moléculas compuestas por largas cadenas de monosacáridos ligados por enlaces glucosídicos susceptibles al hidrolisis. Tienen un largo número de grupos funcionales, composición química variable y diferentes pesos moleculares, lo que define su diversidad y propiedades fisicoquímicas. Son insolubles en agua y generalmente amorfos en la naturaleza (Devi, Sarmah, Khatun, & Maji, 2017).

Las partículas basadas en polisacáridos no tienen actividad superficial, éstas usualmente requieren de alguna modificación hidrofóbica con el fin de promover su carácter hidrófobo y aumentar su adherencia en interfases líquidas como O/W. Algunos polisacáridos de manera natural poseen una fracción de proteína anclada a su estructura, brindándole características interfaciales y estabilidad por factores estéricos.

La goma de mezquite (GM) es el exudado de color ámbar producida por árboles de *Prosopis spp.*, comparado funcionalmente con la goma arábica. Ha sido

utilizado como encapsulador de aceites, agente emulsificante y estabilizante (Jiménez-Alvarado, Beristain, Medina-Torres, Román-Guerrero, & Vernon-Carter, 2009; Vernon-Carter, Beristain, & Pedroza-Islas, 2000; Vernon-Carter, Pedroza- Islas, & Beristain, 1998).

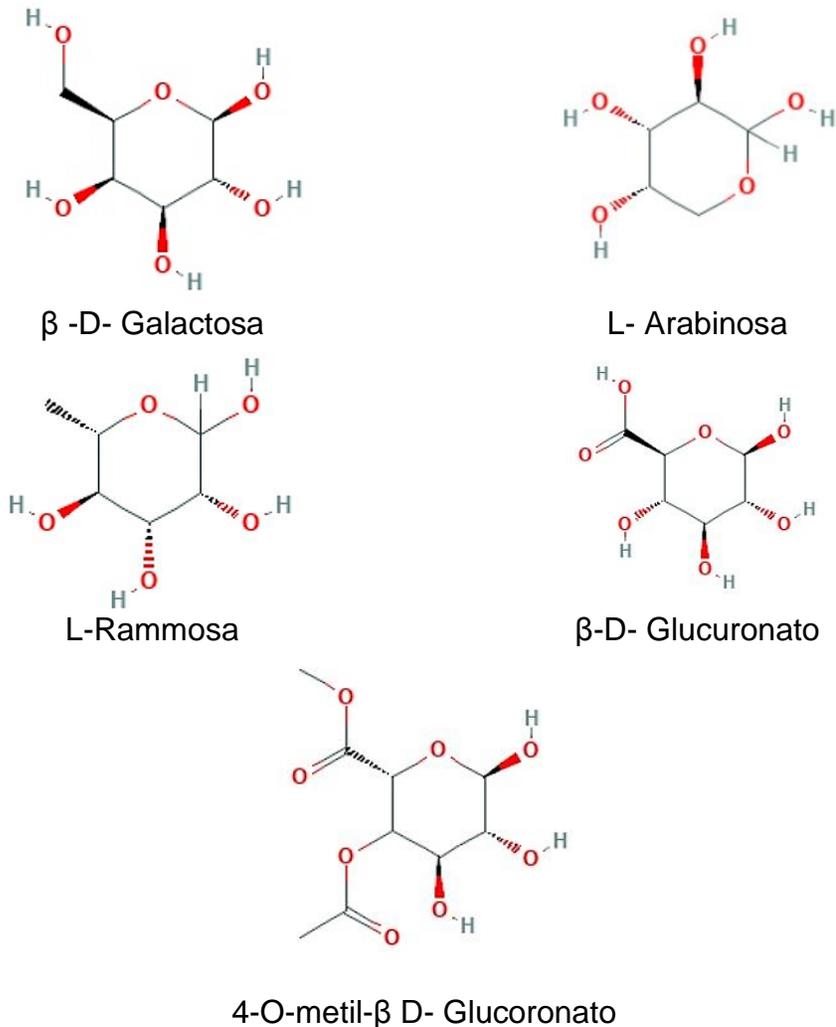


Figura 2. Estructuras químicas de los carbohidratos que componen a la GM

Es un polisacárido ramificado de naturaleza ácida formado por un núcleo de residuos de β -D-Galactosa, con estructura lineal (enlaces 1-3) y ramificada (enlace 1-6) (Figura 2). Posee azúcares como L-Arabinosa (estructura cíclica), L-Rammosa, β -D-Glucuronato y 4-O-metil- β -D-Glucuronato así como cadenas

laterales con oligosacáridos. Además contiene una pequeña fracción de proteína (~2.7%) ligada a la parte central de estructura lineal del polímero (López-Franco *et al.*, 2012; Vernon-Carter *et al.*, 2000). En esta fracción se puede llegar encontrar hasta un 32.6% de aminoácidos hidrofóbicos más no se identifica la presencia de cisteína (López-Franco *et al.*, 2012). Los polímeros como GM con repeticiones similares de monómeros en su estructura presentan un alto carácter hidrofílico y baja flexibilidad. La estructura macromolecular de la GM altamente ramificada toma una conformación globular desordenada en solución explicando su alta solubilidad en agua y comportamiento como fluido newtoniano incluso a una concentración de polímero muy alta (hasta 50%) (Acedo-Carrillo *et al.*, 2006).

Proteína de suero

Las proteínas globulares provenientes del suero de leche son una mezcla de proteínas como lo son la α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, seroalbúmina e inmunoglobulinas.

La combinación de factores estéricos y electrostáticos confiere una buena estabilidad coloidal en un medio acuoso (Wijaya, Patel, Setiowati, & Van der Meeren, 2017). Las proteínas de suero se adsorben espontáneamente en interfases líquidas durante la emulsificación. Son mayoritariamente usadas para fortalecer los alimentos nutricionalmente, para la formación de hidrogeles, sistemas para la encapsulación o formación de material interfacial. Las proteínas de suero con diámetros (1,0) en el intervalo 0.2 -0.5 μm han sido utilizadas para generar emulsiones O/W debido a su efecto pickering y propiedades elásticas. Las emulsiones menos estables se logran cuando las proteínas están cerca del punto isoeléctrico (pI) de las proteínas y con una alta fuerza iónica (>10mM) (Schröder, Berton-Cbarabin, Venema, & Cornacchia, 2017). Para esto último las proteínas pueden interaccionar con una gran variedad de polisacáridos y crear complejos con acción emulsificante/estabilizante (Devi *et al.*, 2017). Las proteínas de suero hidrolizadas son una mezcla heterogénea de péptidos, por su

tamaño los péptidos pueden cubrir partes en la interfase que usualmente no son cubiertas en su totalidad por las proteínas globulares (Kilara & Vaghela, 2004).

En un estudio comparativo de las propiedades emulsificantes de WPH y WPI (aislado de proteína de suero) utilizando como fase oleosa ácidos grasos de cadena media realizado por Schröder *et al.*, (2017) indican que la actividad superficial de WPH disminuyó a mayor grado de hidrolización; fue necesario utilizar una concentración mayor de WPH a diferencia de WPI (2 a 1) para lograr un tamaño de gota pequeño (nm) en la interfase; WPI presentó un menor potencial zeta a diferencia de WPH (hasta -30 mV en las concentraciones utilizadas y pH 7) a consecuencia de la hidrólisis, permitiendo que los péptidos contribuyan con la carga, particularmente los péptidos >5kDa fueron preferentemente adsorbidos en la interfase.

2.2.2 Complejos biopoliméricos

Las fuerzas de atracción o de repulsión entre los biopolímeros, pueden llevar a dos fenómenos: la formación de complejos o a una co-solubilización. Los complejos podrán ser solubles o insolubles (también llamados coacervados). Los complejos insolubles (CI) implican una separación de fases en la dispersión debida a la concentración de los biopolímeros (precipitado) y una fase pobre, llevado a cabo por la presencia de cargas opuestas entre los biopolímeros que se encuentran dispersos (Turgeon & Laneuville, 2009). Los complejos solubles (CS) son el resultado de interacciones de baja intensidad, por poseer baja densidad quedan suspendidos en el medio. Esta estructura puede formar una matriz donde la concentración de un polisacárido en particular es alta mientras que la proteína actúa como estabilizante a través de las zonas de unión formadas por las cadenas del polisacárido (Turgeon & Laneuville, 2009; Williams & Phillips, 2009).

Debido a la separación de fases inducida por la presencia de CI, la medición de la absorbancia del sobrenadante es un indicador cualitativo de su formación. Esto

permite identificar la relación o el pH en que los CS son formados y mantenidos. El primer punto en que las interacciones proteína: polisacárido comienzan a incrementar su turbidez se define como pH_c , y está relacionada con la formación de complejos solubles, esta transición ocurre a nivel molecular y es llamada la primera fase de acomplejamiento (Figura 3).

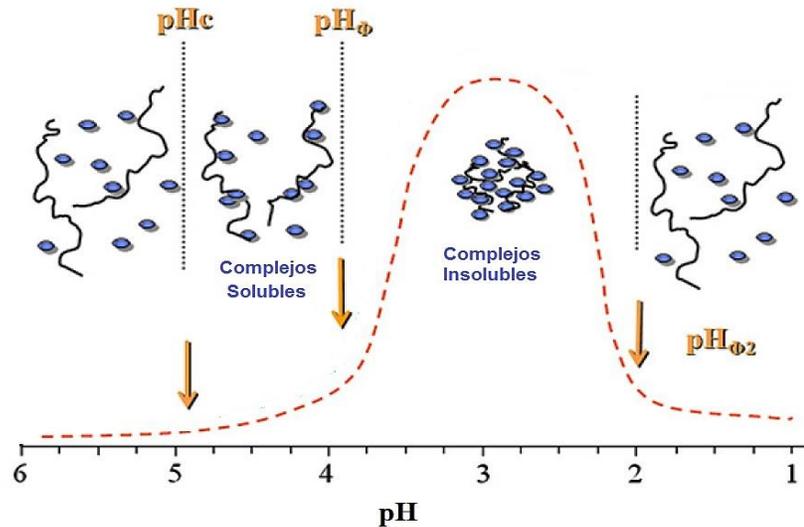


Figura 3. Representación esquemática de la formación de complejos biopoliméricos en función del pH. La línea en rojo representa la tendencia del rendimiento de coacervación (%). Tomado de (Turgeon & Laneuville, 2009; Weinbreck, Tromp, & de Kruij, 2004)

Esta región se mantiene durante un intervalo de carga negativa hasta que el pH está cercano al pI de la proteína. Si el pH continúa descendiendo cada vez más proteínas cubrirán el polisacárido hasta llegar a un segundo punto crítico (pH_ϕ) en donde los CS se acercan a la neutralidad y por lo tanto se puede determinar la absorbancia con lo cual se propicia la formación de CI que tendrán tendencia a precipitar (Figura 3). Cuando los CI pierden la equivalencia de carga debido a una disminución en el pH se llega a $pH_{\phi 2}$ el cual está relacionado con el pK_a de los grupos funcionales de los polisacáridos, los complejos comenzarán a separarse debido a las cargas positivas que rodean al polisacárido (Figura 3). La formación de un tipo de complejo proteína: polisacárido sobre el otro también

puede ser sometida a la variación de la relación proteína : polisacárido sin embargo, el pH deberá estar fijo (Turgeon & Laneuville, 2009).

En estudios realizados por otros autores, se ha observado que durante el cambio de pH las proteínas sufren cambios conformacionales lo cual brinda cambios morfológicos en los coacervados (Dickinson, 2017).

2.2.3 Mecanismos de desestabilización

Los cambios ocasionados en las gotas de una emulsión se deben principalmente a que colisionan y se agregan esto es debido a que las fuerzas de Van der Waals exceden las fuerzas de repulsión del potencial zeta, pues en ausencia de las fuerzas de repulsión las gotas flocculan rápidamente (Gohtani & Yoshii, 2018).

La fuerza que conduce a la coalescencia es la presión osmótica. Cuando las partículas interfaciales (emulsificantes o estabilizantes) coexisten con las gotas de emulsión existe un espacio vacío entre ellas fomentando la estabilización. La diferencia de concentración en las partículas coloidales induce la presión osmótica en los sitios vacíos de la fase dispersa. Con ello las moléculas se mueven de una región vacía a una aglomerada y las gotas comienzan a floccular (Gohtani & Yoshii, 2018; Leal-Calderon *et al.*, 2007 b).

La maduración de Ostwald incrementa el tamaño de la gota sin floccular o coalescer las gotas de emulsión. Este mecanismo es llevado a cabo por la diferencia en solubilidades (del material de pared) y la fase dispersa sin importar el tamaño de las gotas.

La fuerza de gravedad actuará directamente sobre las gotas de una emulsión que tenga diferente densidad con respecto al medio de dispersión. Estas tenderán a hacer una separación de fases ocupando la parte superior aquellas de menor densidad (cremado). La mayoría de los aceites comestibles en su estado líquido son de menor densidad que el agua, por lo que tienen tendencia a acumularse en la parte superior de las emulsiones. Implicando que las gotas estén en

contacto entre ellas por largos periodos, lo cual puede llevar a la floculación o a la coalescencia y eventualmente a la formación de una capa de aceite (Dickinson, 2006).

2.3 Fase oleosa

2.3.1 Características de los lípidos

Se estima que alrededor del 80% de la producción total de grasas y aceites está destinada a la industria alimentaria (Gunstone, 2006), los usos son para los aceites para freír, grasas para panificación, fase oleosa, productos untables, aceites para ensalada, mayonesa y grasas para confitería. Para que un ingrediente como las grasas pueda ser utilizado en una matriz alimenticia es necesario que posea las propiedades químicas y nutricionales dictadas por la funcionalidad del alimento, así como poseer los mecanismos de protección y dispersión adecuados. Este último requerimiento puede o no ser compatible para todos los productos que utilizan grasa, por ello es necesario inducir o cambiar las propiedades químicas y físicas de la grasa (Akoh & Min, 2002).

Una de las características más importantes en aceites y grasas grado alimenticio, son las propiedades térmicas asociadas con el punto de cristalización y punto de fusión, con la formación de sólidos-líquidos y el comportamiento de las grasas cuando son combinadas con otros componentes alimenticios (Sichien *et al.*, 2009) .Los aceites y las grasas pueden ser de origen vegetal (soya, girasol, cártamo, palma, coco entre otros) o animal (proveniente de la leche o los tejidos).

2.3.2 Grasa Láctea

Químicamente, la grasa láctea es una mezcla de diferentes ésteres de ácidos grasos que están compuestos por un alcohol llamado glicerol y 3 distintos ácidos grasos. Estos últimos representan alrededor del 90 % de la grasa de la leche. Los ácidos grasos están formados por una cadena alifática de carbonos unida a un grupo carboxílico. Cuando su cadena contiene uno o más dobles enlaces se denominan ácidos grasos insaturados, mientras que en los saturados su cadena

de carbonos contiene únicamente enlaces C-C sencillos. Hasta un 60 % de los ácidos grasos en la leche son saturados. Los ácidos grasos más abundantes de la leche son el ácido palmítico (C₁₆) y el ácido oleico (C_{18:1}). La conformación y estructura de los ácidos grasos definirán las propiedades físicas (punto de fusión, estabilidad, textura, etc.) de los triacilgliceroles (MacGibbon & Taylor, 2006; Palmquist, 2006). Este tipo de grasa no está exenta de las modificaciones tecnológicas para incrementar su funcionalidad en los alimentos.

2.3.3 Modificación fisicoquímica de las grasas

Para realizar los cambios fisicoquímicos en las grasas existen 2 tipos de modificaciones: biológicas (modificación genética o regulación de la alimentación) y tecnológicas (mezcla de aceites y grasa, fraccionamiento, hidrogenación, interesterificación, entre otras) (Akoh & Min, 2002; Gunstone, 2006).

Desde el punto de vista nutricional, las grasas de origen animal son percibidas con varias desventajas (ricas en colesterol y ácidos grasos saturados, pocos ácidos grasos esenciales y pocos antioxidantes), aunque se ha trabajado en la modificación biológica de grasas como la láctea, la percepción se mantiene sin cambios. Esto abre puerta a la utilización de técnicas de fraccionamiento y reemplazo que permitan mantener las características sensoriales y reducir el contenido total de grasas en los alimentos (Palmquist, 2006).

Entre las posibilidades existe la obtención de fracciones con diferentes características térmicas, conlleva a que la grasa láctea sea separada en diferentes fracciones relacionadas con los puntos de fusión de los perfiles que deseen ser obtenidos. Durante el fraccionamiento de la grasa se aplican diferentes temperaturas de separación, tiempos de maduración y separación de fases (Marangoni, 2002; Sichien *et al.*, 2009; Yella-Reddy, 2010); la cual es una alternativa que no utiliza solventes, manteniendo el grado alimenticio a los productos obtenidos. La combinación de fracciones o su utilización individual

permiten el control de las propiedades térmicas y físicas de productos alimenticios, incidiendo positivamente en la estructura del alimento y por ende en sus propiedades mecánicas (Petersen, Chaleepa, & Ulrich, 2013). Estas fracciones cristalizan separadamente y se comportan como componentes relativamente independientes (Marangoni, 2002).

2.3.4 Fase oleosa de las emulsiones

Las emulsiones permiten integrar dentro de un alimento una cantidad preestablecida de grasa o aceite, facilitando su dispersión, contribuyendo con la textura y características sensoriales. Por otro lado, la utilización de emulsiones simples con aceites vegetales, ricos en ácidos grasos insaturados, permite brindar una alternativa de reemplazo de grasas. Esta sustitución aunque contribuye con la estructura y estabilidad de las emulsiones, no superan al completo en grasa en las evaluaciones sensoriales de los productos que las contienen, empero las propiedades mecánicas se han visto mejoradas e incluso igualadas a aquellas completas en grasa.

2.4 Propiedades viscoelásticas de las emulsiones

Las propiedades reológicas pueden ser definidas como el comportamiento de un líquido o sólido sometido a la deformación. La viscosidad caracteriza la resistencia de la muestra a fluir y es definida como el cociente entre el esfuerzo cortante aplicado al fluido y la tasa de corte resultante. Una respuesta constante al esfuerzo cortante aplicado es típico de un fluido Newtoniano, mientras que la viscosidad aparente del fluido no Newtoniano depende de la tasa de corte. Generalmente, los polisacáridos generan una alta viscosidad a bajas concentraciones debido a su bajo peso molecular, por el contrario las proteínas poseen baja viscosidad (Turgeon & Laneville, 2009).

Mediante la estructura y el control reológico, la formación de una red de polímeros reduce la floculación disminuyendo el riesgo de deterioro o cambios físicos, de

presentarse los cambios serán debidos por el largo almacenamiento al que están sujetas las emulsiones (Dickinson, 2017; Nushtaeva, 2016).

2.5 Referencias

- Acedo-Carrillo, J. I., Rosas-Durazo, A., Herrera-Urbina, R., Rinaudo, M., Goycoolea, F. M., & Valdez, M. A. (2006). Zeta potential and drop growth of oil in water emulsions stabilized with mesquite gum. *Carbohydrate Polymers*, 65(3), 327–336. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.01.016>
- Akoh, C., & Min, D. B. (2002). *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, Biotechnology*. <https://doi.org/10.1201/9780203908815>
- Appelqvist, I. A. M., Golding, M., Vreeker, R., & Zuidam, N. J. (2007). Emulsions as Delivery Systems in Foods. In *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems* (pp. 41–81). Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1002/9780470277881.ch3>
- Araiza-Calahorra, A., Akhtar, M., & Sarkar, A. (2018). Recent advances in emulsion-based delivery approaches for curcumin: From encapsulation to bioaccessibility. *Trends in Food Science & Technology*, 71(Supplement C), 155–169. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.009>
- Devi, N., Sarmah, M., Khatun, B., & Maji, T. K. (2017). Encapsulation of active ingredients in polysaccharide–protein complex coacervates. *Advances in Colloid and Interface Science*, 239(Supplement C), 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.05.009>
- Dickinson, E. (2006). *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques, 2nd edition, Julian McClements. CRC Press, Boca Raton, FL (2005), pp. 609. Food Hydrocolloids* (Vol. 20). <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.05.001>
- Dickinson, E. (2017). Biopolymer-based particles as stabilizing agents for emulsions and foams. *Food Hydrocolloids*, 68(Supplement C), 219–231. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.024>
- Gohtani, S., & Yoshii, H. (2018). 6 - Microstructure, composition, and their relationship with emulsion stability A2 - Devahastin, Sakamon BT - Food Microstructure and Its Relationship with Quality and Stability. In *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* (pp. 97–122). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100764-8.00006-X>
- Gunstone, F. (2006). 1 - Introduction: Modifying lipids – why and how? BT - Modifying Lipids for Use in Food. In *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* (pp. 1–8). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845691684.1>
- Jiménez-Alvarado, R., Beristain, C. I., Medina-Torres, L., Román-Guerrero, A., &

- Vernon-Carter, E. J. (2009). Ferrous bisglycinate content and release in W1/O/W2 multiple emulsions stabilized by protein–polysaccharide complexes. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2425–2433. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.06.022>
- Kilara, A., & Vaghela, M. N. (2004). 4 - Whey proteins A2 - Yada, R.Y. BT - Proteins in Food Processing. In *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* (pp. 72–99). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9781855738379.1.72>
- Leal-Calderon, F., Bibette, J., & Schmitt, V. (2007 b). Introduction BT - Emulsion Science: Basic Principles. In F. Leal-Calderon, J. Bibette, & V. Schmitt (Eds.) (pp. 1–4). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-39683-5_1
- López-Franco, Y. L., Córdova-Moreno, R. E., Goycoolea, F. M., Valdez, M. A., Juárez-Onofre, J., & Lizardi-Mendoza, J. (2012). Classification and physicochemical characterization of mesquite gum (*Prosopis* spp.). *Food Hydrocolloids*, 26(1), 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.05.006>
- MacGibbon, A. K. H., & Taylor, M. W. (2006). Composition and Structure of Bovine Milk Lipids BT - Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids. In P. F. Fox & P. L. H. McSweeney (Eds.) (pp. 1–42). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/0-387-28813-9_1
- Marangoni, A. G. (2002). *The Functionality of Milk Fat Fractions in Confectionery and Plastic Fats*. <https://doi.org/10.1201/9781420010169.ch9>
- Nushtaeva, A. V. (2016). Natural food-grade solid particles for emulsion stabilization. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 504, 449–457. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.05.084>, 449–457. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.05.084>
- Palmquist, D. L. (2006). Milk Fat: Origin of Fatty Acids and Influence of Nutritional Factors Thereon BT - Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids. In P. F. Fox & P. L. H. McSweeney (Eds.) (pp. 43–92). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/0-387-28813-9_2
- Petersen, S., Chaleepa, K., & Ulrich, J. (2013). Importance of emulsions in crystallization—applications for fat crystallization. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 7(1), 43–48. <https://doi.org/10.1007/s11705-013-1309-6>
- Ruíz-Ramos, J. O., Pérez-Orozco, J. P., Báez-González, J. G., Bósquez-Molina, E., Pérez-Alonso, C., & Vernon-Carter, E. J. (2006). Interrelationship between the viscoelastic properties and effective moisture diffusivity of emulsions with the water vapor permeability of edible films stabilized by mesquite gum–chitosan complexes. *Carbohydrate Polymers*, 64(2), 355–363. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.12.020>

- Schröder, A., Berton-Carabin, C., Venema, P., & Cornacchia, L. (2017). Interfacial properties of whey protein and whey protein hydrolysates and their influence on O/W emulsion stability. *Food Hydrocolloids*, 73(Supplement C), 129–140. <http://lib.ugent.be/catalog/rug01:001669530>
- Sichien, M., Thienpont, N., Fredrick, E., Trung Le, T., Van Camp, J., & Dewettinck, K. (2009). 4 - Processing means for milk fat fractionation and production of functional compounds A2 - Corredig, Milena BT - Dairy-Derived Ingredients. In *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* (pp. 68–102). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845697198.1.68>
- Turgeon, S. L., Schmitt, C., & Sanchez, C. (2007). Protein–polysaccharide complexes and coacervates. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 12(4), 166–178. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cocis.2007.07.007>
- Turgeon, & Laneville, S. I. (2009). CHAPTER 11 - Protein + Polysaccharide Coacervates and Complexes: From Scientific Background to their Application as Functional Ingredients in Food Products. In S. Kasapis, I. T. Norton, & J. B. B. T.-M. B. S. Ubbink (Eds.) (pp. 327–363). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374195-0.00011-2>
- Vernon-Carter, E. J., Beristain, C. I., & Pedroza-Islas, R. (2000). Mesquite gum (Prosopis gum). In G. Doxastakis & V. B. T.-D. in F. S. Kiosseoglou (Eds.), *Novel Macromolecules in Food Systems* (Vol. 41, pp. 217–238). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0167-4501\(00\)80011-4](https://doi.org/10.1016/S0167-4501(00)80011-4)
- Wijaya, W., Patel, A. R., Setiowati, A. D., & Van der Meeren, P. (2017). Functional colloids from proteins and polysaccharides for food applications. *Trends in Food Science & Technology*, 68(Supplement C), 56–69. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.003>
- Williams, P. A., & Phillips, G. O. (2009). 1 - Introduction to food hydrocolloids. In G. O. Phillips & P. A. B. T.-H. of H. (Second E. Williams (Eds.), *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* (pp. 1–22). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845695873.1>
- Yella Reddy, S. (2010). Improving Plasticity of Milk Fat for Use in Baking by Fractionation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(5), 493–497. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1520-2>

3. OBTENCIÓN, COMPOSICIÓN QUÍMICA Y COMPORTAMIENTO TÉRMICO DE FRACCIONES DE GRASA LÁCTEA

Las estrategias de reducción o sustitución de grasa láctea, buscan tener opciones que no modifiquen el perfil sensorial, que brinden una estructura estable acorde al alimento que la contenga y que su consumo implique menores riesgos a la salud. En este trabajo se aplicó a la grasa láctea anhidra (AMF) la técnica de doble fraccionamiento de lípidos para realizar la inducción y maduración de cristales. La AMF fue fraccionada a 20 °C obteniendo un rendimiento de 29.3 % \pm 0.65 de fracción líquida (LMF). La fase sólida (FS) fue fraccionada a 30 °C obteniendo un 54.6 % \pm 5.6 de fracción líquida (MMF) y el resto (16.7 %) de fase sólida (HMF). El análisis térmico indica que el punto de fusión de las fracciones está en un intervalo de 39.8 a 18.5 °C (HMF>AMF>MMF>LMF) y para el punto de cristalización entre 9.9 y 25.2 °C (LMF>MMF>AMF>HMF). LMF contiene un 4 % más de C18:1 que AMF; los demás ácidos grasos (C4:0 a C14:0) se mantienen constantes ($p \leq 0.05$) entre las fracciones. Las fracciones exhibieron un comportamiento predominantemente elástico en función de la temperatura ($G' > G''$). El método aplicado permite la obtención de 3 fracciones con funcionalidad térmica diferente.

Palabras clave: doble fraccionamiento, cristalización, cromatografía de gases, DSC, oleína, viscoelasticidad

Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria
Universidad Autónoma Chapingo
Dulce Maria Pedroza Pedroza
Consuelo S.O. Lobato Calleros

OBTENTION, CHEMICAL COMPOSITION AND THERMAL BEHAVIOR OF MILK FAT FRACTIONS

The strategies for reduction or substitution of milk fat in food, focus on a good sensorial perception, stable structure until its use and its consumption must not imply any risk of health. In this work, dry fractionation of lipids was used to induce the formation and maturity of milk fat crystals. This technique was applied at 20 °c over AMF, the yield obtained from liquid fraction was 29.27 % \pm 0.65 (LMF), then solid phase was dry fractionated at 30 °c and the yield obtained was 54.6 % \pm 5.6 of liquid fraction (MMF) and the rest was a solid fraction (HMF). Thermal behavior indicates that the melting point of each fraction was between 39.8 to 18.5 °c (HMF>AMF>MMF>LMF) and the crystallization point was between 9.9 to 25.2 °c (LMF>MMF>AMF>HMF). LMF contains 4% more C 18:1 than AMF; the rest of the fatty acids (C 4:0 a C 14:0) still constant ($p \leq 0.05$) in comparison with the other fractions.

Keywords: dry fractionation, DSC, gas chromatography, crystallization, olein, viscoelasticity

Thesis Universidad Autónoma Chapingo

Dulce Maria Pedroza Pedroza

Consuelo S.O. Lobato Calleros

3.1. Introducción

La grasa láctea (GL) se encuentra dispersa en la leche en forma de glóbulos; el núcleo posee alrededor del 98 % de la grasa de la leche y está compuesto por acilglicéridos (mono-, di-, tri-) además, de vitaminas liposolubles (A, D, E, K) y esteroides (MacGibbon & Taylor, 2006; Palmquist, 2006; Truong, Bansal, Sharma, Palmer, & Bhandari, 2014). Cerca del 35% de los acilglicéridos está constituido por ácidos insaturados (C18:1). La presencia de ácidos grasos saturados es relativamente alta (60%) de los cuales 81.9% son de cadena larga (C14-C18), 6.6% de cadena media (C14 - C18) y 8.4% de cadena corta (C4 - C8) (MacGibbon & Taylor, 2006). La composición química de la GL puede variar significativamente entre estación del año, etapa de lactación o tipo de alimento para el ganado. Este tipo de variaciones puede influir en las propiedades físicas de los glóbulos de grasa, en la funcionalidad de la GL y en la textura final de los alimentos que la contienen (Lopez, Bourgaux, Lesieur, Riaublanc, & Ollivon, 2006). La GL es considerada como una de las mezclas lipídicas más complejas, ya que contiene una amplia variedad de triacilglicéridos (TGA).

La importación de GL en México incrementó un 27% del 2015 al 2016 (Trademap, 2016), por su extenso uso como ingrediente de diversos alimentos procesados como confitería, galletas, cubiertas de chocolate y panificación, además de su utilización en productos lácteos como crema, queso, mantequilla y helado. Debido a que las propiedades físicas (estabilidad térmica, formación de cristales, firmeza, formación de espumas y cremas, anti-aglomerante de proteína, etc) y las propiedades sensoriales (textura, sabor, aroma, color) de la GL contribuyen a las características de calidad de los alimentos que la contienen (Kaylegian, Hartel, & Lindsay, 1993; Marangoni, 2002; Yella Reddy, 2010). Por su contenido en colesterol y ácidos grasos saturados, los consumidores tienen una percepción negativa sobre los efectos de la GL sobre su salud. Sin embargo, las grasas son un componente esencial en la alimentación y su inclusión en una dieta

balanceada no debe de tener efectos negativos (Chilton, Shehan, & Hayes, 2015; Lamarche *et al.*, 2016; Parodi, 2016).

Con el fin de cubrir las expectativas nutricionales y sensoriales de los consumidores, así como las características estructurales y mecánicas requeridas por la industria procesadora de alimentos, se han propuesto diferentes técnicas para modificar la composición química de la GL. Una de ellas es la formulación específica del alimento destinado al ganado lechero; no obstante ello puede afectar negativamente el rendimiento de producción de leche o incrementar la susceptibilidad de esta última a fenómenos de oxidación (Jenkins & Harvatine, 2014). La aplicación de métodos físicos como la combinación de grasa con aceites ricos en ácidos grasos insaturados o el fraccionamiento, son métodos ampliamente utilizados por la ausencia de solventes químicos, y por ser procesos relativamente simples que permiten conservar parte de las propiedades sensoriales de la grasa (Marangoni, 2002).

El fraccionamiento, libre de solventes, implica la formación de cristales que estarán inmersos en grasa fundida y la separación de las dos fases, estearina (fracción sólida) y oleína (fracción líquida). De acuerdo a los perfiles lipídicos que se deseen obtener, se puede llevar nuevamente el fraccionamiento de las fases separadas (oleína o estearina), lo cual es denominado doble fraccionamiento (Bonomi, Luccas, & Kieckbusch, 2012; Dimick, Reddy, & Ziegler, 1996). Las principales variables implicadas en el proceso de fraccionamiento de la GL son: composición química, tasa de enfriamiento, temperatura de fraccionamiento, tiempo de maduración, velocidad de agitación y método de separación. Variaciones en una o más variables implica la obtención de productos diferentes, siendo necesaria su caracterización fisicoquímica para identificar sus posibles aplicaciones en los alimentos (Lopez & Ollivon, 2009; Tran & Rousseau, 2016).

Estudios previos en el fraccionamiento de la GL, han reportado que la utilización de oleínas en alimentos procesados aumenta la absorción y la velocidad de

metabolismo de lípidos, por contener un mayor número de TAG de bajo peso molecular ricos en ácidos grasos de cadena corta y ácidos grasos insaturados (Bonomi *et al.*, 2012). Por su parte la estearina posee potencial para la protección de agentes bioactivos en algunos alimentos funcionales pues contiene una mayor cantidad de ácidos grasos saturados (Li, Truong, & Bhandari, 2017; Queirós, Grimaldi, & Gigante, 2016). Las fracciones de alto punto de fusión de la GL imparten características estructurales adecuadas como inhibidores de cristalización en chocolates y comida congelada (Kaylegian, Hartel, & Lindsay, 1993; Marangoni, 2002; Queirós *et al.*, 2016;).

Para describir el comportamiento térmico de la GL, varios autores han utilizado los fundamentos de la Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, por sus siglas en inglés). Mediante esta técnica se pueden identificar principalmente los cambios en la estructura de la GL a causa del fundido o la formación de cristales. En varios trabajos se han identificado 3 zonas isotérmicas durante el fundido, en el rango de fundido de -40°C a 40°C (Anihouvi, Blecker, Dombree, & Danthine, 2013; Li *et al.*, 2017; Lopez & Ollivon, 2009; Narine & Marangoni, 2002). Por su parte, las propiedades mecánicas de GL, pueden ser estudiadas mediante su cristalización. La determinación de los parámetros reológicos, como módulo de almacenamiento (G') y de pérdida (G''), se relacionan con el nivel organizacional de la red cristalina formada en estado sólido, la cual es afectada por la temperatura y la composición química. La organización estructural de la GL puede ser modificada a fin de optimizar su funcionalidad, lo cual también influirá en las características macroscópicas del alimento que la contenga (Narine & Marangoni, 2002; Queirós *et al.*, 2016).

Las investigaciones realizadas sobre fracciones de la GL se han dirigido al proceso de obtención y a sus propiedades físicas y térmicas, con el fin de caracterizar y comprender su comportamiento. Muy escasos estudios se han llevado a cabo sobre el proceso de doble fraccionamiento de la GL y las propiedades viscoelásticas de las fracciones derivadas de este proceso. El

fraccionamiento de la GL puede constituir un proceso para la obtención de diversas fracciones, que difieran en su perfil nutricional y sus propiedades funcionales. Lo anterior constituye una opción interesante para la producción de materias primas con distintas propiedades fisicoquímicas y mecánicas, útiles para la industria alimentaria. El objetivo particular del presente trabajo fue el de caracterizar las propiedades químicas, térmicas y mecánicas de las fracciones de grasa láctea obtenidas mediante un proceso de doble fraccionamiento libre de solventes.

3.2. Materiales y métodos

Grasa láctea anhidra (AMF; Fonterra, Auckland, Nueva Zelanda), con <0.1% de humedad fue usada en esta investigación. Para evitar los efectos fisicoquímicos de fenómenos de la oxidación (rancidez, reducción de color, modificación del perfil lipídico, incremento de humedad) y contaminación física. Después de su adquisición, la AMF fue separada en lotes de 350 g los cuales fueron colocados en bolsas de nylon y polietileno, que fueron selladas al vacío usando el equipo Torrey Evd-20 (Torrey, Monterrey, Nuevo León, México). Las bolsas fueron reempacadas con bolsas negras para evitar la exposición de la luz y almacenadas bajo refrigeración ($5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) hasta su requisición.

Determinación de condiciones físicas para el fraccionamiento

En la fase de maduración se induce la formación de la fase sólida donde los cristales deberán tener un tamaño suficiente para no ser destruidos durante el proceso de separación y que a su vez quede atrapada la menor cantidad de fase líquida posible. Como experimento preliminar se determinó el tiempo de maduración a través del porcentaje de fase líquida obtenida, a partir del fraccionamiento de 200g de AMF colocaron en un rotavapor (Hahnvapor, HS-2005S, Hahnshin Scientific Co., Kyungki Do, Corea del Sur). Para el fraccionamiento a 20°C se evaluó el rendimiento a las 2, 4, 6 y 8 horas de maduración. Por su parte, el fraccionamiento a 30°C se utilizaron 4,5, y 6 horas.

En ambos procesos de fraccionamiento la agitación permaneció constante (50 rpm). La mezcla de grasa cristalizada y fundida se centrifugó a 10 000 rpm por 15 minutos (Centrifuga 5810 R, Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Posteriormente, fue filtrada la fase líquida para eliminar residuos sólidos y se cuantificó el porcentaje extraído. El tiempo de maduración con mayor porcentaje significativo de fase líquida extraída, fue el empleado en el resto del experimento.

3.2.1 Fraccionamiento de la grasa láctea anhidra

La AMF se sometió a un proceso de doble fraccionamiento, de acuerdo a la metodología propuesta por Dimick *et al.* (1996) con ligeras modificaciones (Figura 4). Brevemente, lotes de 300 g de AMF se colocaron en un rotavapor (Hahnvapor, HS-2005S, Hahnshin Scientific Co., Kyungki Do, Corea del Sur) y se mantuvieron a 60°C por 20 min con agitación de 50 rpm. Posteriormente, se disminuyó la temperatura hasta 20 ± 0.4 °C añadiendo hielo con una tasa de enfriamiento de 2°C/min en la muestra. Las condiciones térmicas y de agitación se mantuvieron durante 130 min. La mezcla de grasa cristalizada y fundida se centrifugó a 10 000 rpm, 20 °C y 15 min (Centrifuga 5810 R, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y el pellet resultante se separó de la fase líquida. Esta última se filtró al vacío para eliminar impurezas y cristales de grasa, a través de papel Whatman no.1, con ello se obtuvo una fracción líquida conformada de TAG con punto de fusión menor a 20 °C, y se denominó LMF.

Para el segundo fraccionamiento (Figura 4), se tomaron 330 g del pellet a partir del fraccionamiento de AMF y se procedió al borrado de la memoria cristalina., mediante el calentamiento a 60 ± 2 °C por 20 minutos y agitación a 50 rpm. Para inducir la nucleación, la temperatura de la mezcla de grasa se disminuyó (2°C/min) hasta alcanzar 30 ± 0.4 °C. Estas condiciones se mantuvieron durante 240 minutos con agitación constante a 50 rpm, permitiendo la formación de los cristales, para poder llevar a cabo la posterior separación de fases. La mezcla de fases grasas se centrifugó a 10 000 rpm a 30°C por 15 minutos y el pellet resultante se separó de la fase líquida. Esta última, fue filtrada al vacío a través

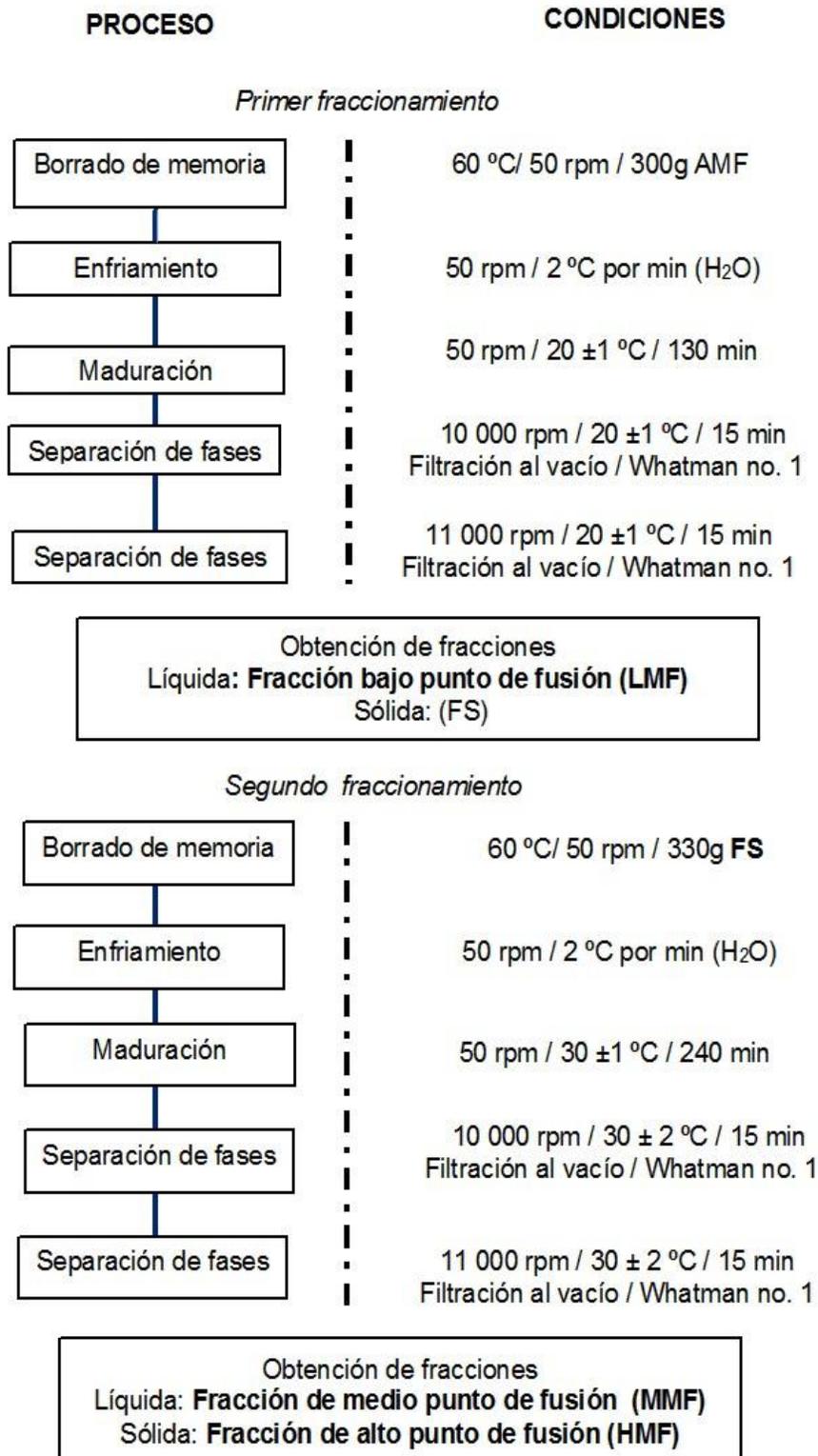


Figura 4. Esquema de doble fraccionamiento.

de papel Whatman no.1, con el fin de eliminar impurezas. La fracción líquida conformada de TAG con punto de fusión menor a 30°C, se denominó MMF. El pellet (grasa sólida) conformado por TAG de punto de fusión mayor a 30 °C, se denominó HMF. Cada fracción obtenida (LMF, MMF y HMF) se colocó en frascos de vidrio color ámbar, para inhibir posibles reacciones de oxidación, y se almacenaron a $5 \pm 2^\circ\text{C}$. Para evitar las reacciones de oxidación, en cada fracción obtenida (LMF, MMF y HMF), se utilizaron frascos ámbar como recipientes de almacenamiento y fueron mantenidos a $5 \pm 2^\circ\text{C}$.

3.2.2 Composición química de las fracciones de GL.

La determinación de la naturaleza de los ácidos grasos constituyentes de cada una de las fracciones de grasa láctea obtenidas, se realizó mediante Cromatografía de Gases, de forma posterior a la metilación de los ácidos grasos, por el método de Trifluoruro de boro, (método 969.33, AOAC, 1995). Cien mg de muestra fueron derivatizados con 4 ml de Trifluoruro de boro en solución metanólica al 14% (v/v), ($\text{BF}_3 \cdot \text{CH}_3\text{OH}$ al 14% Sigma Aldrich, Toluca, Estado de México, México) durante 26 minutos a ebullición constante. Los ácidos grasos metilados, obtenidos en la fracción saponificable, fueron separados por la columna AT-FAME ($\text{Ø}=0.25\text{mm}$ y $e=0.25\mu\text{m}$) con una rampa de temperatura de $40^\circ\text{C}/3\text{ min}$ y $10^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 200°C (método 963.22 de la AOAC, 1995) (Wolff, Bayard, & Fabien, 1995); montada en el cromatógrafo de gases Agilent 6890 (Agilent, Santa Clara, California, EUA). El cálculo del porcentaje de cada ácido graso se realizó acorde a los picos y tiempos de retención identificados por un detector FID (Detector de Ionización de Flama) y comparados con los obtenidos para el estándar interno Metil valerato ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_2$; Sigma Aldrich, Toluca, México) (994.10, AOAC, 2008) (Molkentin & Precht, 1998). Las inyecciones se realizaron por triplicado, y los reactivos utilizados para la determinación de ácidos grasos fueron grado analítico y disolventes grado HPLC.

La fracción no saponificable obtenida durante la derivatización de 100 mg de cada una de las muestras (LMF, MMF, HMF y AMF) fue recuperada para realizar la

cuantificación de colesterol por Cromatografía de Gases. Los esteroides fueron extraídos por lavados continuos de benceno e hidróxido de potasio al 50% p/v (C_6H_6 J.T. Baker, Xalostoc, México; KOH, Química Suastes, Ciudad de México, México) hasta su concentración por rotavapor. La derivatización se llevó a cabo con éter de trimetilsililo (TMS, Sigma Aldrich, Toluca, Estado de México, México), posteriormente se colectó la fase orgánica en la que se encontraban los metil esteroides con hexano (método 976.26, AOAC, 1995). Un μ L de la fase orgánica rica en metil esteroides se inyectó en el cromatógrafo de gases Agilent 6890 (Agilent, Santa Clara, California, EUA) equipado con una columna capilar no polar ($\varnothing=0.25$ mm y $e= 0.17\mu$ m), aplicando las siguientes temperaturas: inyector (250°C), detector (300°C) y una rampa de temperatura de $20^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 230°C y de $40^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 255°C (método 994.10, AOAC, 1995) (Molkentin, J., 2006). El contenido de colesterol se determinó considerando los tiempos de retención de los picos identificados por el detector FID y su comparación con el obtenido para el estándar interno α -5-colestano.

3.2.3 Análisis calorimétrico para las fracciones de GL

La energía de transición, así como el punto de fusión y cristalización de cada fracción de GL se determinaron a partir de termogramas obtenidos por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) (TA Instruments, Q2000, New Castle, EUA). Se colocaron de manera individual 7.7 ± 6 mg de muestra (LMF, MMF, HMF y AMF) en una charola de aluminio y se sellaron herméticamente para propiciar las condiciones fisicoquímicas de un sistema cerrado (sin cambios de masa, solo energía). Las muestras fueron colocadas en el sistema de carga automática del equipo para poder ejecutar el protocolo: calentamiento a 80°C ($dT/dt = 4^\circ\text{C min}^{-1}$) y sostenimiento por 10 minutos (eliminación del historial térmico); enfriamiento hasta -30°C ($dT/dt = 1^\circ\text{C min}^{-1}$) (etapa de cristalización), y calentamiento hasta 60°C ($dT/dt = 2^\circ\text{C min}^{-1}$) (fundido de estructuras cristalinas) (Anihouvi *et al.*, 2013; Lopez *et al.*, 2006; Lopez & Ollivon, 2009). El punto de cristalización, el punto de fusión y la entalpía total se determinaron a

partir de los termogramas con el software del equipo (TA Universal analysis, New Castle, EUA).

3.2.4 Propiedades viscoelásticas de las fracciones de GL

Las propiedades viscoelásticas de las fracciones de GL en función de la temperatura, se evaluaron mediante la determinación de los parámetros viscoelásticos G' (módulo de almacenamiento) y G'' (módulo de pérdida) equipado con una geometría cono-plato (ϕ 5 cm, 0.3 mm de gap, CP50, Anton Paar) y con control de la temperatura por peltier (Physica TEK 150P). Previamente a las determinaciones reológicas, las muestras de cada fracción grasa se sometieron a calentamiento a 60 ± 2 °C por 20 min con el fin de lograr el borrado de la memoria térmica. Muestras de 1.5 ± 0.3 g de cada una de las fracciones (20 ± 2 °C) se sometieron a enfriamiento (5 °C/min) hasta alcanzar una temperatura de 4 °C. Las muestras se dejaron reposar a esta temperatura durante 15 min con objeto de que recuperaran su estructura. Posteriormente, las muestras se sometieron a calentamiento en un intervalo de temperaturas de 4 a 40 °C aplicando una tasa de calentamiento de 2 °C/min, deformación de (0.01%) y 1 Hz de frecuencia. Los valores de los módulos G' , G'' y factor de cedencia ($\tan \delta = G''/G'$) fueron obtenidos con el software del equipo.

3.2.5 Análisis estadístico de datos

Todos los experimentos se realizaron por triplicado de manera independiente, usando un diseño completamente al azar. Todas las mediciones se llevaron a cabo por triplicado y los valores informados corresponden a las medias y desviación estándar. Los resultados se sometieron a análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA) y en los casos pertinentes a prueba de comparación de medias de Tukey. El nivel de significancia se estableció en $p \leq 0.05$. El análisis de datos se realizó con el software Statgraphics 7 (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc, Cambridge, MA, EUA).

3.3. Resultados y discusión

El proceso de fraccionamiento a 20°C se fijó en 120 minutos de maduración de cristales obteniendo un 29.27 ± 3.3 % de LMF (fase líquida), Para el segundo fraccionamiento realizado a fraccionamiento a 30 °, se obtuvo 54.66 ± 5.66 % de extracción de la fase líquida (MMF), y 42.94 ± 4.77 % tras 240 minutos de maduración. Para mantener una baja variación en el porcentaje de extracción, es necesario realizar la separación de fases en un ambiente con temperatura controlada a 30 °C.

3.3.1 Composición química de la AMF y sus fracciones

En el Cuadro 1 se muestran los tipos de ácidos grasos y su contenido porcentual en la AMF y las tres fracciones obtenidas a partir de esta última, pudiendo observarse que los contenidos en ácidos grasos de C4:0 hasta C14:0 fueron comparables ($p > 0.05$) en la AMF y las distintas fracciones.

En contraste, los ácidos grasos palmítico, esteárico y oleico se distribuyeron de manera desigual en las fracciones grasas, y en consecuencia sus contenidos variaron significativamente en las mismas. Los contenidos de los ácidos grasos palmítico y esteárico fueron significativamente mayores en HMF respecto a aquellos en LMF y MMF, pero comparables ($p > 0.05$) a aquel en AMF. La distribución del ácido oleico en las fracciones grasas fue la que presentó mayor variación, disminuyendo su contenido de la siguiente forma: $LMF > MMF > HMF$. En adición, el contenido de ácido oleico en la AMF fue distinto ($p \leq 0.05$) de aquellos presentes en las distintas fracciones, encontrándose su valor entre aquellos para MMF y LMF. Estos resultados son acordes al bajo punto de fusión del ácido oleico (13 °C), lo cual influyó en su mayor retención en la fracción LMF de menor punto de fusión (Fracción líquida del primer fraccionamiento). El perfil de ácidos grasos (Cuadro 1) confirmó que la fracción HMF contuvo la mayor cantidad de ácidos grasos saturados (84.98 %) que el resto de la fracciones MMF (80.21 %) y LMF (77.41 %), destacando los ácidos palmítico y esteárico. Estos resultados son acordes a lo informado por Bonomi *et al.* (2012), quienes

reportaron que las estearinas son ricas en TAG (C-42 a C-54), constituidos por ácidos grasos de cadena larga. La fracción LMF concentró la mayor cantidad de ácido oleico (C18:1) y la menor cantidad de ácidos grasos de cadena corta C4:0 – C8:0 (4.68 %) y media C10:0 – C14:0 (26.63 %). Por su parte la fracción MMF presentó el mayor contenido (5.52 %) de ácidos grasos de cadena corta (C4:0 a C8:0).

Cuadro 1. Perfil de ácidos grasos. Composición porcentual de ácidos grasos constituyentes de la grasa láctea anhidra y de sus fracciones

| <i>Ácido graso</i> | ^z AMF(%) | ^y LMF(%) | ^x MMF(%) | ^w HMF(%) |
|-------------------------|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| ácido butírico (C4:0) | 1.47± 0.07 a ^v | 1.47± 0.02 a | 1.48± 0.11 a | 1.53± 0.19 a |
| ácido caproico (C6:0) | 1.82± 0.06 a | 1.76± 0.03 a | 2.31± 0.06 a | 1.88± 0.33 a |
| ácido caprílico (C8:0) | 1.47± 0.06 a | 1.45± 0.03 a | 1.73± 0.07 a | 1.47± 0.21 a |
| ácido cáprico (C10:0) | 3.69± 0.16 a | 3.64± 0.11 a | 4.05± 0.10 a | 3.73± 0.12 a |
| ácido láurico (C12:0) | 7.60± 0.37 a | 7.45± 0.29 a | 7.82± 0.05 a | 7.79± 0.06 a |
| ácido mirístico (C14:0) | 16.07± 0.47 a | 15.54± 0.46 a | 15.97± 0.43 a | 16.70± 0.74 a |
| ácido palmítico (C16:0) | 39.27± 0.36ab | 37.27± 0.02 a | 37.73± 0.80 a | 40.88± 0.93 b |
| ácido esteárico (C18:0) | 10.07± 0.32ab | 8.82± 0.32 a | 9.13± 0.38 a | 10.99± 0.40 b |
| ácido oleico (C18:1) | 18.53± 0.51 b | 22.5± 0.66a | 19.79± 0.46 b | 15.02± 0.47 c |
| Saturados | 81.43 | 77.41 | 80.21 | 84.98 |
| Insaturados | 18.53 | 22.59 | 19.79 | 15.02 |

^zAMF: Grasa Láctea Anhidra; ^yLMF: Fracción de bajo punto de fusión; ^xMMF: Fracción de medio punto de fusión; ^wHMF: Fracción de alto punto de fusión. ^vMedias seguidas con la misma letra en cada fila no son diferentes (Tukey p=0.05).

La composición de los acilglicéridos contenidos en AMF influyen en las propiedades fisicoquímicas y funcionales de la red de lípidos que la constituyen; algunas de estas propiedades incluyen las mecánicas (textura, viscoelasticidad), microestructurales (polimorfismo) y térmicas (punto de fusión y cristalización)

(Kerr, Tombokan, Ghosh, & Martini, 2011). La presencia de los ácidos grasos en cada fracción está relacionada con su ubicación al conformar los TAG. El ácido palmítico (C16:0) es uno de los ácidos que tienen mayor presencia en la composición de los acilglicéridos, de la GL, acompañado de ácidos grasos de cadena corta o media (Fox, Uniacke-Lowe, McSweeney, & O'Mahony, 2015). Las condiciones utilizadas para el doble fraccionamiento favorecen la separación de los TAG, más no de cada una de los ácidos grasos que los componen. Lopez *et al.* (2006), informaron sobre la composición química de 2 fracciones de GL obtenidas a 21 °C, en comparación con aquella de AMF, encontrando que los mismos TAG estuvieron presentes en ambas fracciones, aunque en proporciones diferentes, como resultado del fraccionamiento térmico. En ese estudio se indica que la oleína, que puede ser comparada con la fracción LMF de este trabajo, estuvo enriquecida con TAG conformados con 1 ácido graso de cadena larga y 2 ácidos grasos de cadena larga insaturada o un ácido graso mono- insaturado y 2 ácidos grasos de cadena media. Por su parte Dimick *et al.*, (1996) reportaron una estearina con punto de fusión de 42 °C, conteniendo más de un 50 % de ácidos grasos saturados de cadena larga (C14:0 – C18:0) y menos del 10 % de ácidos grasos de cadena media (C10:0 – C14:0).

Cuadro 2. Contenido de colesterol (mg/100g) de la grasa láctea anhidra y de sus fracciones

| ^z AMF(%) | ^y LMF(%) | ^x MMF(%) | ^w HMF(%) |
|------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 230.244 ± 4.60c ^y | 264.570 ± 7.94a | 244.158 ± 5.61b | 196.449 ± 6.09d |

^zAMF: Grasa Láctea Anhidra; ^yLMF: Fracción de bajo punto de fusión; ^xMMF: Fracción de medio punto de fusión; ^wHMF: Fracción de alto punto de fusión. ^yMedias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes (Tukey p= 0.05).

El colesterol se distribuyó de manera heterogénea en las fracciones grasas, presentando contenidos significativamente distintos y variando de la siguiente forma: LMF > MMF > HMF. El contenido de colesterol de AMF tuvo un valor

intermedio a aquellos para las fracciones MMF y HMF. Estos resultados parecen indicar una mayor afinidad del colesterol a los TAG ricos en ácidos grasos insaturados (Cuadro 2).

El colesterol es un esteroide con carácter anfifílico e insoluble en agua, compuesto por un grupo hidroxilo, 4 carbociclos y una cadena alifática de 6 carbonos. El polimorfismo de la grasa láctea está influenciado por la temperatura, concentración y composición química. Aunado a ello, la presencia de colesterol es uno de los factores que puede afectar las interacciones entre las cadenas alifáticas (Tran & Rousseau., 2016). El colesterol tiende a formar monocapas estables en la superficie del agua, tiene influencia en la formación de interfases con características líquido-cristalinas, Dado que aumenta el espacio entre las cadenas alifáticas de los fosfolípidos. Se ha identificado que el colesterol está implicado en mecanismos de ordenamiento molecular, pues incrementa la fluidez de la fase gel en lípidos saturados y condensa las fases fluidas en lípidos insaturados, induciendo la estructuración de una mesofase líquido-cristalina ordenada, caracterizada por un empaquetamiento de mediana densidad (McMullen, Lewis, & McElhaney, 2004).

La transición de fases debidas al colesterol han sido principalmente estudiadas con fosfolípidos y esfingolípidos, por su aplicación y utilización en la formación de bicapas y monocapas lipídicas (McIntosh, 1978; Simons & Ikonen, 2000; Quinn & Wolf, 2009). Las moléculas de colesterol se alinean por sí solas en la interfase entre las cabezas hidrófilas y las cadenas hidrófobas de los TGA. Lopez & Ollivon (2009) reportaron que la oleína puede mantener una estructura 3L lamelar (ordenamiento lado a lado de las cadenas). Así, el estado líquido de LMF, puede atribuirse a la presencia de ácidos grasos insaturados, así como también a la entropía en las cadenas alifáticas de los TGA contenidos, debido a la separación entre cadenas inducida por el colesterol. Lo anterior, mediante interacciones de van der Waals entre las cadenas alifáticas y los anillos planares-rígidos que conforman al colesterol. Por su parte, la fracción HMF, sólida a temperatura

ambiente, probablemente presente mayoritariamente una estructura 2L (mayor ordenamiento que 3L), puesto que los espacios entre cadenas son menores, al contener el menor contenido de colesterol y ácidos grasos insaturados (Cuadro 2). Sin embargo, no se descarta la presencia de un porcentaje bajo de lamelas 3L, a causa del arrastre de MMF. (Figura 5a). La presencia de 2 tipos de estructura lamelar en la estearina, también fue reportada por Lopez *et al.* (2006).

La interacción colesterol- cadenas alifáticas son más atractivas que las interacciones colesterol-colesterol o cadena alifática-cadena alifática. A mayor concentración de colesterol mayor espaciamiento entre cadenas induciendo con ello el cambio de la fase gel desordenada a una fase lamelar líquido-cristalina ordenada (Cheng, Ropers, & Lopez, 2017; MacGibbon & Taylor, 2006).

3.3.2 Comportamiento térmico

La transición sólido-líquido de un material es influenciada por la energía térmica del entorno. La temperatura de procesamiento, almacenamiento o consumo de un alimento que contiene grasa, será el agente que propicie los cambios de fase, que podrán ser o no favorables, influyendo directamente en la estructura, la presentación del producto final y la aceptación sensorial del producto final.

Los puntos de fusión y cristalización de fracciones grasas, dependen del punto de fusión de la AMF que se somete a fraccionamiento; existiendo diversas variaciones entre tipos de AMF. Lopez, Bourgaux, Lesieur, Riaublanc, & Ollivon, (2006) trabajaron con AMF con punto de fusión de 37.5 °C, por su parte Dimick *et al.* (1996), realizaron un doble fraccionamiento a partir de AMF con un punto de fusión 31 °C. Truong *et al.* (2014), realizaron un fraccionamiento a 21 °C de AMF con punto de fusión de 36 °C. Aunado al origen, raza y alimentación brindada al animal, los puntos de fusión o cristalización pueden diferir entre trabajos experimentales. En la Figura 5 se muestran los eventos exotérmicos de cristalización (a) y endotérmicos de fusión (b) que sufrieron las fracciones grasas y la AMF cuando se sometieron a cambios de temperatura. Durante la

cristalización (Figura 5a), la AMF presentó dos picos exotérmicos característicos (Lopez *et al.*, 2006; Queirós *et al.*, 2016): uno de ellos ocurrió en el rango de temperatura de 19.5 a 16.4 °C atribuido a la cristalización de TAG conteniendo ácidos grasos de cadena corta y el segundo ocurrió en el rango de temperatura de 14 a - 12 °C atribuido a la cristalización de TAG constituidos principalmente por ácidos de grasos de cadena larga.

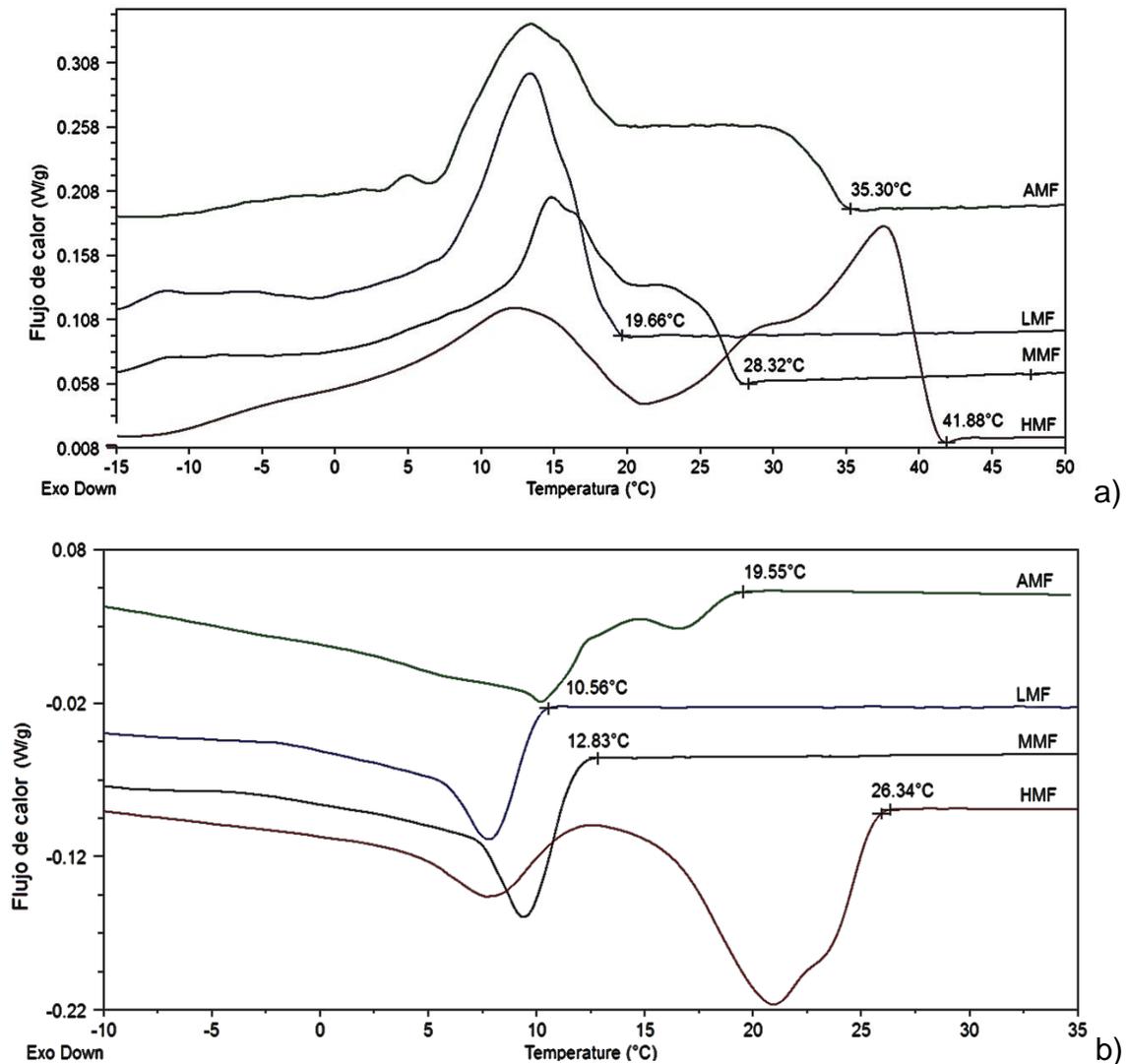


Figura 5. Termogramas de la grasa láctea anhidra (AMF) y sus fracciones. Se muestra el flujo de calor en función de la temperatura, durante el a) calentamiento (2°C/min) y b) enfriamiento (1°C/min).

Lopez *et al.*, 2009 asociaron un primer pico en la cristalización de AMF al comportamiento térmico de una estructura α 2L y el segundo pico al de una estructura α 3L, constituidas principalmente por ácidos grasos de cadena corta y larga, respectivamente. Los termogramas de las fracciones grasas difirieron en el número de picos o transiciones y el rango de temperaturas en los que ocurrieron. La fracción LMF presentó un solo pico exotérmico, que inició a una temperatura de 9.9 °C y se extiende hasta aproximadamente - 15.0 °C. El termograma de MMF, muestra también un solo pico exotérmico, que inicia 13.9 °C y finaliza alrededor de - 10 °C. Por su parte, el termograma de la fracción HMF indicó la ocurrencia de dos transiciones exotérmicas; la primera en el rango de temperatura de 26.6 a 13 °C, y la segunda de 13.9 a alrededor de 0 °C. Los puntos de cristalización en las fracciones y AMF, calculados con el software del equipo, determinan la temperatura a la cual la muestra comienza a formar una red ordenada, y es útil para la determinar temperaturas idóneas para realizar su separación mediante fraccionamiento térmico (Marangoni, 2002). Los puntos de cristalización de la AMF y las fracciones grasas difirieron significativamente, variando de la siguiente forma: HMF > AMF > MMF > LMF, como se esperaba, de acuerdo a su composición en ácidos grasos (Cuadro 2).

El termograma endotérmico de AMF (Figura 5b) mostró la ocurrencia de 3 transiciones térmicas: (1) - 10 a 6.6 °C; (2) 6.6 a 15.2 °C y (3) 15.2 a 35.4 °C. La observación de 3 transiciones en AMF durante el calentamiento, coincide con lo reportado por Lopez *et al.* (2009), para AMF. Los eventos o transiciones térmicas se encuentran relacionados con la longitud de cadena de los ácidos grasos y su posición en los TAG. De acuerdo a Dimick *et al.* (1996), y Lopez *et al.* (2006), las transiciones señaladas pueden relacionarse con la presencia de TAG constituidos por ácidos grasos que difieren en su punto de fusión, de la siguiente manera: alto, medio y bajo punto de fusión.

El doble fraccionamiento utilizado, tiene como desventaja la obtención de fracciones que presentan dos o más rangos de temperatura asociados con

transiciones sólido-líquido, puesto que contienen cierta cantidad de TAG con rangos de puntos de fusión distintos a los de la mayoría de los TAG que conforman la fracción. No obstante, la aplicación conjunta de centrifugación y filtración al vacío, utilizada en este trabajo, permitió la obtención de las fracciones LMF y MMF con cierto grado de homogeneidad en el comportamiento térmico de los TAG que las constituyeron. Lo anterior, evidenciado por una única transición térmica observada en sus termogramas (Figura 5b), siendo más estrecha y definida la correspondiente a LMF. Para el caso de HMF, se observan dos transiciones o picos en el termograma, que van de -10 a 20 °C y de 20 a 41 °C. La presencia de una segunda transición (-10 a 20 °C) indica que en la fracción HMF existe cierta cantidad de TAG de puntos de fusión intermedios, que fueron arrastrados de la MMF durante el segundo fraccionamiento. Esto se debe a que durante la formación de los cristales (fase sólida) estos atrapan pequeñas cantidades de la fase oleosa líquida, cuyo entrapamiento en la red cristalina dificulta su separación. Aun cuando HMF mostró más de un rango de temperatura de fusión al igual que AMF, exhibió un comportamiento térmico distinto (Cuadro 3). Los puntos de fusión de la AMF y las fracciones grasas difirieron significativamente, variando de la siguiente forma: HMF > AMF > MMF > LMF.

Cuadro 3. Temperaturas de transición y entalpías de cristalización y fusión de las fracciones grasas y grasa láctea.

| Código de la grasa | Punto de fusión (°C) | Entalpía de fusión (J/g) | Punto de cristalización (°C) | Entalpía de cristalización (J/g) |
|--------------------|---------------------------|--------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| ^Z AMF | 35.48 ± 0.8c ^v | 73.03 ± 2.1a | 19.77 ± 0.3c | 62.20 ± 3.7b |
| ^Y LMF | 19.10 ± 0.9a | 81.65 ± 1.9b | 10.55 ± 0.8a | 60.73 ± 2.5b |
| ^X MMF | 28.53 ± 0.4b | 73.33 ± 1.7a | 13.41 ± 0.7b | 46.82 ± 1.2a |
| ^W HMF | 41.60 ± 2.5d | 96.70 ± 2.5c | 25.89 ± 1.0d | 82.22 ± 5.4c |

^ZAMF: Grasa Láctea Anhidra; ^YLMF: Fracción de bajo punto de fusión; ^XMMF: Fracción de medio punto de fusión; ^WHMF: Fracción de alto punto de fusión. ^vMedias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes (Tukey p = 0.05).

Los valores de entalpía de cristalización y de fusión (calor asociado con las transiciones térmicas) de las fracciones grasas y la AMF se muestran en el Cuadro 3, observándose que no existió una tendencia clara en sus valores de acuerdo a la composición en ácidos grasos de las fracciones y de AMF. Se ha informado que la entalpía de transición (cristalización y fusión) de los TAG es afectada por varios factores, tales como interacciones moleculares (fuerzas de London, fuerzas de van der Waals), tipo de empaquetamiento de los cristales (influenciado por su tamaño y simetría), composición en ácidos grasos, posición de los ácidos grasos, etc (Narine & Marangoni, 2002; Tran & Rousseau, 2016; Truong et al., 2014). Por ejemplo, los ácidos grasos saturados son moléculas que pueden ordenarse para formar estructuras compactas, que pueden ser afectadas por contacto con ácidos grasos insaturados, ya que ambos tipos de moléculas presentan ángulos diferentes en las cadenas alifáticas. Lo anterior, causa reducciones en la entalpía de fusión (Fox *et al.*, 2015).

Los resultados expuestos, indican que el fraccionamiento de AMF permitió la obtención de fracciones grasas con distintas propiedades térmicas y perfiles de ácidos grasos; además de distintos contenidos en colesterol.

3.3.3 Propiedades viscoelásticas en función de la temperatura

El arreglo estructural individual de los componentes de un alimento, así como el resultante de su interacción con el resto de los componentes, definen las características mecánico-sensoriales específicas de los productos alimenticios. Es relevante entonces el estudio de las propiedades mecánicas de las fracciones grasas como función de la temperatura y su comparación con aquellas de la AMF, con el fin de definir su aplicación en el desarrollo de sistemas alimenticios novedosos. El módulo de almacenamiento G' es una medida de la energía almacenada y de la elasticidad que es capaz de mantener un material cuando es sometido a una cierta deformación. El módulo de pérdida G'' es una medida de la energía disipada y carácter viscoso de un material cuando es sometido a una cierta deformación. La medición de parámetros mecánicos de un material como

función de la temperatura es usada para examinar la dependencia de su estructura al calor (Narine & Marangoni, 2002).

En la figura 6 a) y b) puede observarse el comportamiento de los valores de G' y G'' de las fracciones grasas y la AMF como función de la temperatura; pudiendo observarse para todos los casos perfiles de curvas similares, pudiendo apreciarse una región inicial en la que los valores de G' y G'' presentan un máximo y permanecen prácticamente constantes, independientemente de cambios en la temperatura, indicando ello que aun cuando esté ocurriendo ruptura de enlaces y deformación en la estructura debido al calentamiento, estos procesos están siendo reversibles. Esta región es considerada como viscoelástica lineal, puesto que los valores de los módulos no varían con la deformación que está sufriendo la grasa mediante su calentamiento. Los valores de G' y G'' correspondientes a la región viscoelástica lineal (RVL) (Cuadro 4) variaron como sigue: HMF > MMF = AMF > LMF.

Cuadro. 4 Parámetros reológicos en la regiones viscoelástica lineal y no lineal, y temperatura de cambio de comportamiento reológico ($\tan \delta = 1$).

| Código de la grasa | Región Viscoelástica Lineal (RVL) | | | Inicio de región viscoelástica no lineal | Temperatura $\tan \delta = 1$ | |
|--------------------|-----------------------------------|---------------------------|----------------------|--|-------------------------------|--------------|
| | $G' \times 10^{-5}$ (Pa) | $G'' \times 10^{-3}$ (Pa) | $\tan \delta (10^2)$ | °C | $G' \times 10^{-5}$ (Pa) | °C |
| ^Z AMF | 1.9 ± 0.04 b ^y | 11.5 ± 0.038 c | 0.16 ± 0.003 a | 18.7 ± 0.74 c | 1.6 ± 0.058 b | 34.1 ± 0.56c |
| ^Y LMF | 1.3 ± 0.10a | 8.5 ± 0.096a | 0.15 ± 0.008a | 12.3 ± 0.93 a | 1.2 ± 0.13a | 16.8 ± 0.71a |
| ^X MMF | 2.0 ± 0.03c | 9.8 ± 0.027 b | 0.20 ± 0.0007 b | 16.4 ± 0.32 b | 1.7 ± 0.047 b | 27.2 ± 0.32b |
| ^W HMF | 2.2 ± 0.18c | 11.0 ± 0.15c | 0.20 ± 0.002b | 25.5 ± 1.2 d | 2.0 ± 0.14c | 39.2 ± 1.4d |

^ZAMF: Grasa Láctea Anhidra; ^YLMF: Fracción de bajo punto de fusión; ^XMMF: Fracción de medio punto de fusión; ^WHMF: Fracción de alto punto de fusión. ^YMedias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes (Tukey $p = 0.05$).

Estos resultados indican que la HMF fue significativamente más elástica que el resto de las fracciones grasas y AMF; mientras que LMF fue el material graso con menor elasticidad. Los valores de G'' variaron como sigue: $HMF = AMF > MMF > LMF$. A partir de estos resultados puede inferirse que los ácidos grasos de cadena larga saturados presentes tanto en HMF como en AMF confirieron carácter viscoso a estos materiales, incrementado su resistencia a fluir. Tanto las fracciones grasas como AMF mostraron comportamiento reológico predominantemente elástico; lo anterior evidenciado por los valores de $\tan \delta$ son menores a la unidad (Cuadro 4).

A temperaturas mayores a las correspondientes a la RVL, puede observarse la inflexión de las curvas de G' y G'' y disminución pronunciada de los valores (Figuras 6a y 6b), iniciando así la región de comportamiento viscoelástico no lineal. Esta etapa de la prueba es caracterizada por rompimiento de enlaces y estructuras, cuya reorganización rebasa el tiempo de prueba.

La temperatura de inicio para RVL varió significativamente entre los materiales grasos (Cuadro 4): $HMF > AMF > MMF > LMF$. A partir de esta región los materiales grasos comenzaron a perder su estructura sólida viscoelástica, siendo más evidente este fenómeno al acercarse a su punto de fusión. A mayor diferencia entre el punto de fusión y el punto de caída de G' serán menores las diferencias en textura (Marangoni *et al.*, 2012). A causa de su distinta composición en ácidos grasos y a la formación de arreglos estructurales (polimorfismo), las fracciones grasas y la AMF mostraron distintos valores de temperatura a los cuales los valores de G' y G'' fueron iguales, resultando en valores de $\tan \delta = 1$. La igualdad de valores de G' y G'' indica el inicio de la transición de estado sólido a líquido o fusión y por tanto, la temperatura a la que ocurre este fenómeno es comparable al punto de fusión determinado por otros métodos (Figura 6d). En el Cuadro 4 puede observarse que las temperaturas a las que las fracciones grasas y la AMF pasaron de un comportamiento

predominantemente sólido a un estado predominantemente líquido fueron comparables a los puntos de fusión determinados mediante DSC (Cuadro 3).

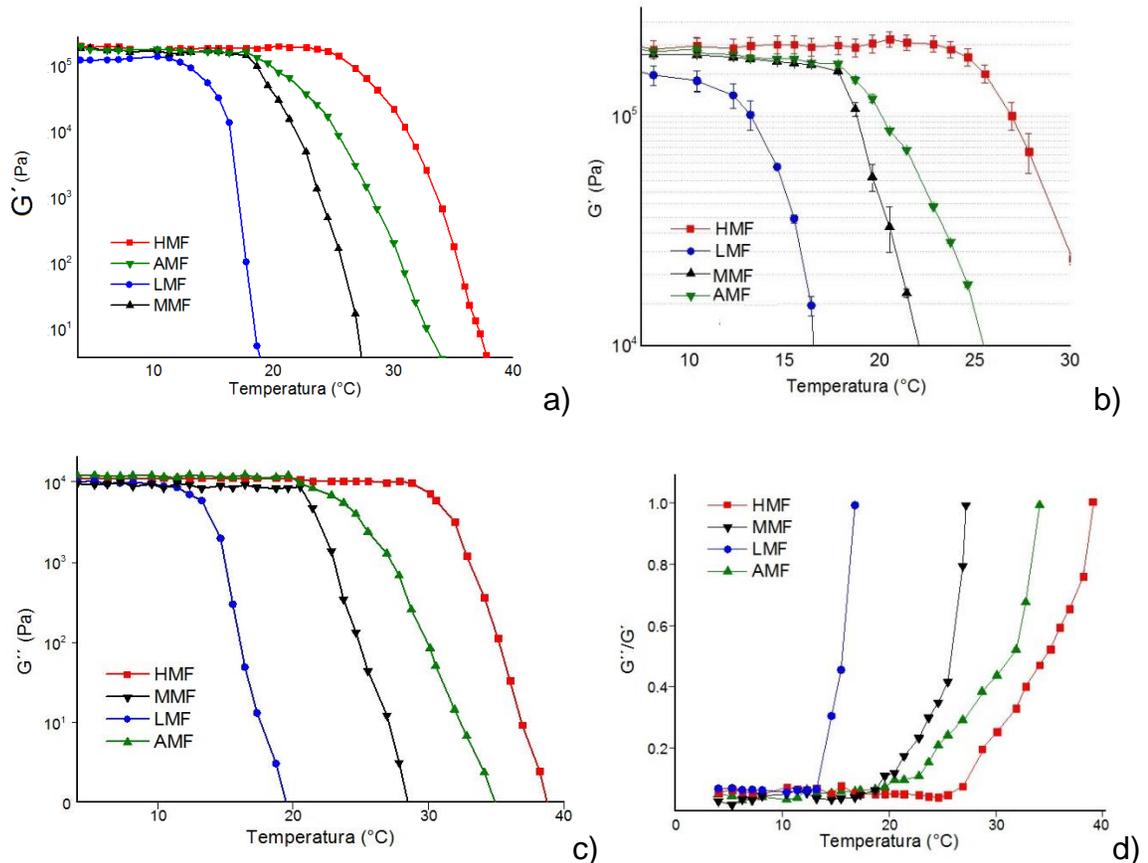


Figura 6. Variaciones en los módulos viscoelásticos de las fracciones grasas y la grasa láctea anhidra como función de la temperatura: (a) módulo de almacenamiento (G'), b) Zona de inflexión para RVL, (c) módulo de pérdida (G''), (d) Factor de cedencia (G''/G').

3.4. Conclusiones

Mediante la aplicación de un proceso de doble fraccionamiento a grasa láctea anhidra (AMF), fue posible la obtención de tres fracciones de grasa láctea, denominadas como (HMF, MMF y LMF) de acuerdo a sus puntos de fusión alto, medio y bajo, respectivamente. El rendimiento obtenido por cada 100g de AMF sometido al doble fraccionamiento fue de $29.27 \pm 0.65\%$ para LMF, 38.65 ± 5.66

% para MMF y 30.37 ± 4.77 % para HMF. La merma del proceso fue de <2%. Las fracciones grasas y la AMF presentaron contenidos en ácidos grasos de cadena corta y media (C4:0 a C14:0) comparables. Los contenidos de los ácidos grasos palmítico y esteárico fueron significativamente mayores en HMF respecto a aquellos en LMF y MMF, pero similares a aquel en AMF. El contenido de ácido oleico en la fracción HMF fue significativamente menor que aquel presente en AMF y el resto de las fracciones grasas. La misma tendencia se observó para el contenido de colesterol.

La entalpía causada por el cambio de estado en las fracciones grasas y AMF, no presentó alguna tendencia con respecto a la composición en ácidos grasos. La temperatura de transición sólido-líquido es menor para LMF seguida de MMF, AMF y HMF, siguiendo un orden inverso para el punto de cristalización. Ambas variables térmicas difirieron significativamente para las fracciones y AMF, El comportamiento elástico de las fracciones y AMF permanecen constantes pese a los cambios de temperatura y deformación de la estructura. HMF presentó el mayor comportamiento elástico, MMF y LMF obtuvieron valores similares y LMF fue el material graso con menor elasticidad. La región viscoelástica no lineal se hizo evidente conforme las fracciones y AMF alcanzaban el estado líquido. La pérdida de la resistencia en la estructura cristalina, conforme la temperatura igualó el punto de fusión de los materiales grasos estudiados, permitió que el factor de cedencia alcanzará el valor de 1.

3.5. Agradecimientos

Los autores agradecen a la M.C Carmen Márquez Alonso del Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México por su invaluable cooperación en la determinación del perfil de ácidos grasos.

3.6 Referencias

Anihouvi, P. P., Blecker, C., Dombree, A., & Danthine, S. (2013). Comparative Study of Thermal and Structural Behavior of Four Industrial Lauric Fats. *Food*

and *Bioprocess Technology*, 6(12), 3381–3391.
<https://doi.org/10.1007/s11947->

- AOAC 1998. Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists, Washinton D.C. EUA.
- Bonomi, E. C., Luccas, V., & Kieckbusch, T. G. (2012). Characterization of the Stearin Obtained by Thermal Fractionation of Anhydrous Milk Fat. *Procedia Engineering*, 42, 918–923.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.07.484>
- Cheng, K., Ropers, M.-H., & Lopez, C. (2017). The miscibility of milk sphingomyelin and cholesterol is affected by temperature and surface pressure in mixed Langmuir monolayers. *Food Chemistry*, 224(Supplement C), 114–123. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.035>
- Chilton, A. B., Shehan, C. V, & Hayes, J. E. (2015). *Type of milk typically consumed, and stated preference, but not health consciousness affect revealed preferences for fat in milk. Food Quality and Preference* (Vol. 49). <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2015.12.001>
- Dimick, P. S., Reddy, S. Y., & Ziegler, G. R. (1996). Chemical and thermal characteristics of milk-fat fractions isolated by a melt crystallization. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(12), 1647–1652. <https://doi.org/10.1007/BF02517966>
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H., & O'Mahony, J. (2015). *Dairy chemistry and biochemistry, second edition. Dairy Chemistry and Biochemistry, Second Edition*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2>
- Jenkins, T. C., & Harvatine, K. J. (2014). Lipid feeding and milk fat depression. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 30(3), 623–642. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2014.07.006>
- Kaylegian, K. E., Hartel, R. W., & Lindsay, R. C. (1993). Applications of Modified Milk Fat in Food Products. *Journal of Dairy Science*, 76(6), 1782–1796. [https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77510-4](https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77510-4)
- Kerr, R. M., Tombokan, X., Ghosh, S., & Martini, S. (2011). Crystallization behavior of anhydrous milk fat-sunflower oil wax blends. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2689–2695. <https://doi.org/10.1021/jf1046046>
- Lamarche, B., Givens, D. I., Soedamah-Muthu, S., Krauss, R. M., Jakobsen, M. U., Bischoff-Ferrari, H. A., ... Despres, J.-P. (2016). Does Milk Consumption Contribute to Cardiometabolic Health and Overall Diet Quality? *The Canadian Journal of Cardiology*, 32(8), 1026–1032. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2015.12.033>
- Lopez, C., Bourgaux, C., Lesieur, P., Riaublanc, A., & Ollivon, M. (2006). Milk fat and primary fractions obtained by dry fractionation 1. Chemical composition

- and crystallisation properties. *Chemistry and Physics of Lipids*, 144(1), 17–33. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2006.06.002>
- Lopez, C., & Ollivon, M. (2009). Triglycerides obtained by dry fractionation of milk fat: 2. Thermal properties and polymorphic evolutions on heating. *Chemistry and Physics of Lipids*, 159(1), 1–12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2009.02.009>
- MacGibbon, A. K. H., & Taylor, M. W. (2006). Composition and Structure of Bovine Milk Lipids BT - Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids. In P. F. Fox & P. L. H. McSweeney (Eds.) (pp. 1–42). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/0-387-28813-9_1
- Marangoni, A. G. (2002). *The Functionality of Milk Fat Fractions in Confectionery and Plastic Fats*. <https://doi.org/10.1201/9781420010169.ch9>
- McMullen, T. P. W., Lewis, R. N. A. H., & McElhaney, R. N. (2004). Cholesterol–phospholipid interactions, the liquid-ordered phase and lipid rafts in model and biological membranes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 8(6), 459–468. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cocis.2004.01.007>
- Palmquist, D. L. (2006). Milk Fat: Origin of Fatty Acids and Influence of Nutritional Factors Thereon BT - Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids. In P. F. Fox & P. L. H. McSweeney (Eds.) (pp. 43–92). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/0-387-28813-9_2
- Parodi, P. W. (2016). Cooperative action of bioactive components in milk fat with PPARs may explain its anti-diabetogenic properties. *Medical Hypotheses*, 89, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2015.12.028>
- Queirós, M. S., Grimaldi, R., & Gigante, M. L. (2016). Addition of olein from milk fat positively affects the firmness of butter. *Food Research International*, 84(Supplement C), 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.03.017>
- Tran, T., & Rousseau, D. (2016). Influence of shear on fat crystallization. *Food Research International*, 81(Supplement C), 157–162. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.022>
- Truong, T., Bansal, N., Sharma, R., Palmer, M., & Bhandari, B. (2014). Effects of emulsion droplet sizes on the crystallisation of milk fat. *Food Chemistry*, 145(Supplement C), 725–735. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.07>
- Yella Reddy, S. (2010). Improving Plasticity of Milk Fat for Use in Baking by Fractionation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(5), 493–497. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1520-2>

4. CARACTERIZACIÓN DEL ACOMPLEJAMIENTO DE HIDROLIZADO DE PROTEÍNA DE SUERO Y GOMA DE MEZQUITE

La interacción electrostática entre moléculas de proteínas y polisacáridos bajo condiciones particulares de pH y relación en peso entre ambos biopolímeros, puede promover la formación de complejos solubles (CS) o complejos insolubles denominados coacervados (CI), dependiendo del grado de neutralización de las cargas eléctricas de los biopolímeros. La neutralización parcial de las cargas eléctricas de los biopolímeros rinde la formación de complejos solubles; mientras que la neutralización casi completa de sus cargas produce complejos insolubles. En este trabajo se identificaron las condiciones fisicoquímicas necesarias para la eficiente formación de complejos biopoliméricos, utilizando proteína de suero hidrolizada (WPH) y goma de mezquite (GM). Se utilizaron las condiciones de pH a 3.5 y concentración de 1% p/p, en 5 relaciones diferentes (2:1, 1:1, 0.5:1, 0.4:1, 0.3:1, WPH:GM). Tras su acomplejamiento, las relaciones con menor contenido de WPH obtuvieron un rendimiento >30%, mientras que la relación 1:1 obtuvo el menor rendimiento de coacervación (<18%), favoreciendo la formación de CS. La absorbancia mantiene un comportamiento inverso al rendimiento de coacervación. Por su parte el potencial zeta fue negativo para todos los tratamientos donde a mayor rendimiento de coacervación menor es la magnitud del potencial zeta. La relación 1:1 reporta -6.10 ± 0.2 mV y 1:03 se obtuvo -2.2 ± 0.2 mV. El diámetro promedio volumétrico de los complejos insolubles se sitúa entre 1.01 y $0.734 \mu\text{m}$ hasta $0.734 \mu\text{m}$, donde a mayor rendimiento de coacervación, menor diámetro. La relación 1:1 permite la máxima formación de CS al tener la menor absorbancia (3.54 ± 0.01), con el menor tamaño de partícula ($D_{3,0}: 1.044 \mu\text{m}$) y mayor potencial zeta ($-6.20 \text{ mV} \pm 0.18$) por lo que pueden ser utilizados como materiales de pared en partículas coloidales.

Palabras clave: complejos biopoliméricos, interacción electrostática, absorbancia, rendimiento de coacervación

Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria

Universidad Autónoma Chapingo

Dulce Maria Pedroza Pedroza

Consuelo S.O. Lobato Calleros

CHARACTERIZATION OF COMPLEXATION (PROTEIN: POLYSACCHARIDE) OF WHEY PROTEIN HYDROLYZED AND MEZQUITE GUM

The electrostatic interaction between proteins and polysaccharides molecules under particular conditions of pH and weight ratio between both biopolymers, may promote the formation of soluble complexes (CS) or insoluble complexes named coacervates (CI), depending on the degree of neutralization of the electrical charges of the biopolymers. The partial neutralization of the electric charges of the biopolymers yields the formation CS; while the almost complete neutralization of its electric charges produces CI. In this work the pH and weight ratio between whey protein hydrolyzed (WPH) and mesquite gum (GM) were determined in order to obtain soluble complexes.

Achieving its complexation was determined the formation of the CI, in the supernatant were determined absorbance and zeta potential. Individually the particle size of the complex (CI, CS) was reported. On the proved relations CI's did not exhibit significant difference in the particle size ($p \leq 0.05$); ratio 1: 1 exhibit the smaller absorption, smaller CS size particle (D3.0: 1.044 μm) and maximum zeta potential (-6.20 mV). This relation could be used as wall material on colloidal particles.

Keywords: biopolymeric complexes, electrostatic interacción, coacervation yield

Thesis Universidad Autónoma Chapingo

Dulce Maria Pedroza Pedroza

Consuelo S.O. Lobato Calleros

4.1 Introducción

La goma de mezquite (GM) es el exudado de los árboles de mezquite (*Prosopis* spp.) distribuidos en las zonas áridas de América del Norte. Esta goma, es un arabinogalactano ramificado con una pequeña fracción proteica (0.7-5.8% p/p). Su funcionalidad y estructura es análoga a la de la goma arábica, de importación, por lo cual resulta interesante explicar las propiedades de la GM y en consecuencia, ampliar su potencial de aplicación en la industria alimentaria mexicana (Jiménez-Alvarado *et al.*, 2009; Vernon-Carter *et al.*, 2000, 1998). Además de los polisacáridos, varias proteínas son ampliamente utilizadas para la formulación y desarrollo de alimentos procesados con características particulares; este el caso, de la proteína de lactosuero. Esta última, es altamente apreciada, debido a su habilidad emulsificante, capacidad de formación de sistemas de encapsulación y propiedades de estructuración, entre otras; además de contribuir a la calidad nutricia de los alimentos a los que es incorporada (Wijaya *et al.*, 2017; Devi *et al.*, 2017; Kilara & Vaghela, 2004).

Se ha informado que complejos biopoliméricos proteína-polisacárido exhiben propiedades funcionales superiores a aquellas que presentan de manera individual. Los complejos proteína-polisacárido son formados mediante interacciones electrostáticas entre los grupos con carga eléctrica de signos opuestos que los conforman. Varios factores influyen en la intensidad de las interacciones electrostáticas mencionadas, siendo los principales el pH y la relación en peso entre biopolímeros (Amit & Bandyopadhyay, 2012; Turgeon & Laneuville, 2009; Weinbreck *et al.*, 2004). El proceso de complejamiento entre biopolímeros puede resultar en la formación de complejos que permanecen solubles (CS) en la dispersión, conforme a la neutralización parcial de las cargas eléctricas de los biopolímeros reaccionantes y a la existencia de cierta carga eléctrica global. En contraste, complejos insolubles o coacervados (CI) son formados cuando ocurre la casi total neutralización de las cargas eléctricas de los biopolímeros reaccionantes y en consecuencia, una carga eléctrica global

muy baja, cercana a cero (Jiménez-Alvarado *et al.*, 2009; Turgeon & Laneuville, 2009; Wijaya *et al.*, 2017). Con base en lo expuesto, para la formación de complejos biopoliméricos, es necesario determinar el intervalo de pH en el cual los dos biopolímeros presentan carga eléctrica neta de signo opuesto. Lo anterior, mediante la medición de sus valores de potencial zeta como función del pH. Asimismo, es importante determinar el efecto de la relación en peso entre biopolímeros, a cierto valor de pH, sobre el rendimiento en la formación de compuestos solubles o insolubles, según sea el caso.

Los CS y los CI tienen diferentes aplicaciones en los campos de la Biotecnología, la industria farmacéutica y alimentaria. Dependiendo de sus características fisicoquímicas, mecánicas (viscoelasticidad), emulsificante, encapsulante, etc. Así, los CS, objeto de este estudio, han sido usados exitosamente para la formación y estabilización de emulsiones sencillas aceite-en-agua (Jiménez-Alvarado *et al.*, 2009), y emulsiones múltiples agua-en-aceite-en agua (Hernández-Marín, Lobato-Calleros, & Vernon-Carter, 2013) ambas formuladas con el objetivo de proteger agentes bioactivos y liberarlos de manera controlada. En particular, la habilidad emulsificante/estabilizante de los CS en emulsiones, ha despertado gran interés en su obtención y caracterización, debido a que se ha informado que los emulsificantes sintéticos pueden ocasionar problemas a la salud del ser humano (Piorkowski, & McClements, 2013). En contraste los CS constituyen opciones naturales para la formulación y desarrollo de diversos alimentos, como bebidas, derivados lácteos y productos cárnicos procesados, entre otros.

El objetivo de este trabajo fue el de determinar las características fisicoquímicas (potencial zeta, tamaño y rendimiento de coacervación) entre los complejos solubles y complejos insolubles, formados por las interacciones hidrolizado de proteína de lactosuero: goma de mezquite utilizando 5 variaciones de proteína WPH:GM.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Materiales

En la formación de los complejos proteína: polisacárido se utilizó hidrolizado de proteína de lactosuero (WPH. Hilmar 8390, Hilmer Cheese Company, Hilmar, California, EUA) conteniendo 80% de proteína en base seca. Como polisacárido se utilizó goma de mezquite (GM) purificada (Figura 7). Hidróxido de Sodio (NaOH) y ácido clorhídrico (HCl) grado analítico se adquirieron en Química Suastes (Tláhuac, Ciudad de México, México) además de agua desionizada.

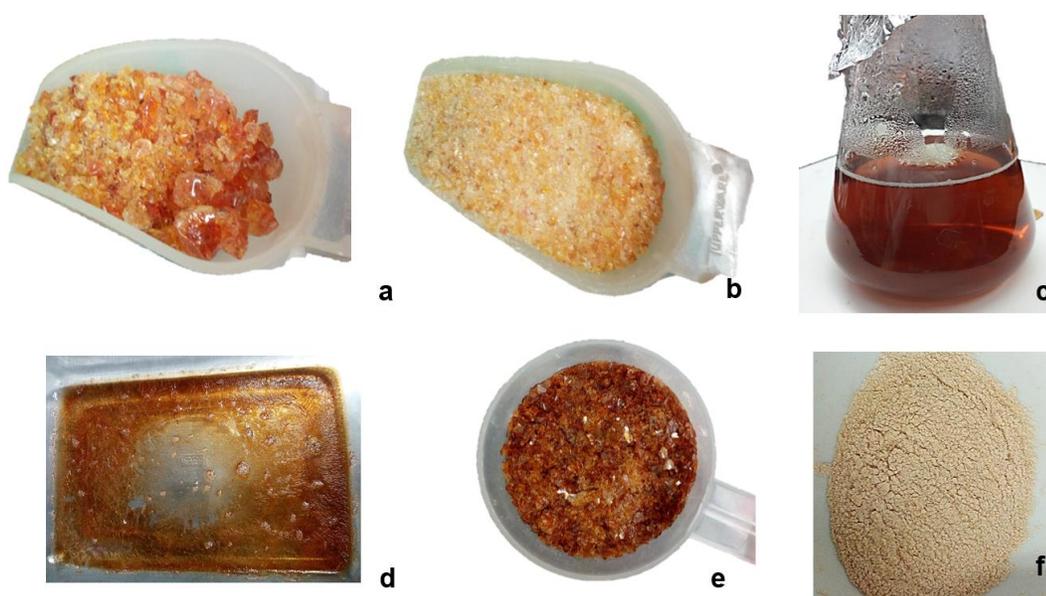


Figura 7. Purificación de goma de mezquite (GM). Apariencia del material en las diferentes etapas de purificación. a) selección, b) maceración c) dispersión d) y e) secado f) almacenamiento.

Purificación de goma de mezquite

El exudado de los árboles de *Prosopis* spp., conocido como árbol de mezquite, fue recolectado en el estado de San Luis Potosí y purificado previamente a su uso. Brevemente, se seleccionaron los exudados de color ámbar-claro, ausentes de corteza o rastros minerales (Figura 7a) (López-Franco *et al.*, 2012); Estos fueron macerados utilizando una trituradora de alimentos (6640, Sunbeam México, Tlalnepantla, Estado de México, México) hasta tener una apariencia

granulosa (Figura 7b), y se dispersaron (15 % p/p) en agua (50 °C, 60 minutos, 600 rpm) (230 Vac, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) (Figura 7c). La dispersión se filtró a través de papel Whatman no. 1 (Jiménez-Alvarado *et al.*, 2009) y se secó en estufa a 53 ± 2 °C (Riessa, Ciudad de México, México) durante 15 h (Figura 7d) para posteriormente, ser pulverizadas con mortero (Figura 7f) y almacenadas a temperatura ambiente en frascos ámbar.

4.2.2 Determinación del potencial zeta de los biopolímeros

Con la finalidad de determinar el intervalo de pH en el cual WPH y GM presentan la máxima diferencia estequiométrica entre cargas eléctricas de signo opuesto, se midieron los valores de potencial zeta (ζ) de disoluciones de WPH y GM (0.05 % p/p) en un intervalo de pH de 2 a 7 (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, Reino Unido). Los valores de pH se variaron cada 0.5 unidades y se ajustaron mediante la adición de HCl 0.1 N o NaOH 0.1 N.

4.2.3 Determinación del efecto de la relación en peso entre WPH y GM biopolímeros sobre la formación de complejos solubles

Se estudió el efecto de las siguientes relaciones en peso WPH: GM ($R_{WPH:GM}$): $R_{2:1}$, $R_{1:1}$, $R_{0.5:1}$, $R_{0.4:1}$ y $R_{0.3:1}$, sobre la formación de CS entre estos biopolímeros, manteniendo en todos los casos una concentración total de biopolímeros de 1 % p/p y un valor de pH de 3.5 (Cuadro 5). Disoluciones de WPH con las concentraciones establecidas en el Cuadro 5, se prepararon usando agua desionizada, a temperatura ambiente, aplicando agitación continua a 600 rpm, durante 5 h (PRO 10 power, IKAMAG, IKA Works, Inc, Wilmington, EUA). Posteriormente, el pH de las disoluciones se ajustó a 3.5 (pH 120, Conductronic, Santa Cruz Buenavista, Puebla, México) mediante la adición de HCl 0.1 N o NaOH 0.1 N y se almacenaron a 5 ± 1 °C por 19 h. Después de este tiempo, a cada disolución de WPH a temperatura ambiente, se le incorporó la cantidad adecuada de GM en polvo, para obtener el valor de $R_{WPH:GM}$ en particular (Cuadro 5), aplicando agitación continua a 600 rpm, durante 5 h. Las disoluciones

conteniendo WPH y GM se almacenaron a $5 \pm 1^\circ\text{C}$ por 19 h para la formación de los complejos. R_{0.3:1}

Cuadro 5. Relaciones en peso entre hidrolizado de proteína de lactosuero y goma de mezquite usadas para la formación de complejos solubles

| Relación | ^z WPH (g) | ^y GM (g) |
|--------------------|----------------------|---------------------|
| R _{1:2} | 0.33 | 0.66 |
| R _{1:1} | 0.5 | 0.5 |
| R _{1:0.5} | 0.66 | 0.33 |
| R _{1:0.4} | 0.7 | 0.3 |
| R _{1:0.3} | 0.76 | 0.24 |

^zWPH: Hidrolizado de proteína de lactosuero; ^yGM: Goma de mezquite

Para obtener un panorama general del fenómeno de acomplejamiento entre WPH y GM, como función de distintas relaciones en peso entre biopolímeros, se midió la absorbancia generada en los sobrenadantes de distintas dispersiones (cuadro 5) (Ramírez-Santiago *et al.*, 2012). Cada dispersión fue centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos a 20 °C (5810 R, Eppendorf, Hamburg, Alemania), para favorecer la separación de los CS (sobrenadante) y los CI (material insoluble). La absorbancia de los sobrenadantes (CS-200 UV Globe, Spectronics Instruments Inc, Rochester, EUA) se midió a 229.5 nm, longitud de onda a la cual los complejos solubles mostraron la mayor absorbancia (Hernández-Marín, Lobato-Calleros, & Vernon-Carter, 2013).

4.2.4 Rendimiento de coacervación

El rendimiento de CI (coacervación) resultante de las diferentes relaciones en peso entre WPH y GM (Cuadro 5), se determinó conforme a lo propuesto por Jiménez-Alvarado *et al.*, (2009). Brevemente, el material insoluble o precipitado obtenido después de separar el sobrenadante de las dispersiones de biopolímeros, como se describió en la sección 4.2.3, se secó en estufa a $45 \pm 1^\circ\text{C}$ (Riossa, Ciudad de México, México) hasta peso constante. El rendimiento de

coacervación para cada mezcla de biopolímeros, se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\%RC = \frac{m_c}{m_{bp}} \times 100 \quad (1)$$

Donde %RC es el rendimiento de coacervación, m_{bp} es la masa total de biopolímeros usados en la preparación de la dispersión y m_c es la masa del CI deshidratado.

4.2.5 Diámetro volumétrico medio de los complejos solubles

Los sobrenadantes de las dispersiones de WPH y GM (Cuadro 5), obtenidos como se describió en la sección 4.2.3, se utilizaron determinar el diámetro volumétrico medio $D(3,0)$ de los CS a corde la ecuación 2, con un equipo Mastersizer 3000 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) utilizando un índice de refracción de 1.334 (correspondiente al agua usada como dispersante).

$$D(3,0) = \sqrt[3]{\frac{\sum d^3}{n}} \quad (2)$$

Donde $\sum d^3$ es la sumatoria de todos los diámetros de la gota medidos y elevados al cubo ; n es el número de sumandos.

4.2.6 Medición de potencial zeta en los complejos solubles

El potencial zeta del sobrenadante de las dispersiones de WPH y GM (Cuadro 5), obtenidos como se describió en la sección 4.2.3, fue determinado en el equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Insuments Ltd., Malvern, Worcestershire, Reino Unido). El software del equipo convierte las mediciones de movilidad electroforética en potencial zeta (ζ) a partir del modelo matemático de Smoluchowski (Cuevas-Bernardino *et al.*, 2017).

4.2.7 Análisis de datos

Todos los experimentos se realizaron por triplicado de manera independiente, usando un diseño completamente al azar. Todas las mediciones se llevaron a cabo por triplicado y los valores informados corresponden a las medias \pm desviación estándar. Los resultados se sometieron a análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA) y en los casos pertinentes a prueba de comparación de medias de Tukey. El nivel de significancia se estableció en $p \leq 0.05$. El análisis de datos se realizó con el software Statgraphics 7 (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc, Cambridge, MA, EUA).

4.3. Resultados y discusión

4.3.1 Potencial zeta de los biopolímeros

Los valores del potencial zeta (ζ) como función de pH (Figura 8) para la dispersión WPH, variaron de 30.0 ± 0.7 mV a pH = 2 hasta -31 ± 1.2 mV a pH = 7, pasando por el punto isoeléctrico (pI) de WPH a un valor de pH = 4.27 (potencial zeta = 0) (Figura 8). Estos resultados coinciden con lo informado para proteínas de lactosuero por otros autores (Hernández-Marín *et al.*, 2013; Ramírez-Santiago *et al.* 2012; Jiménez-Alvarado *et al.*, 2009).

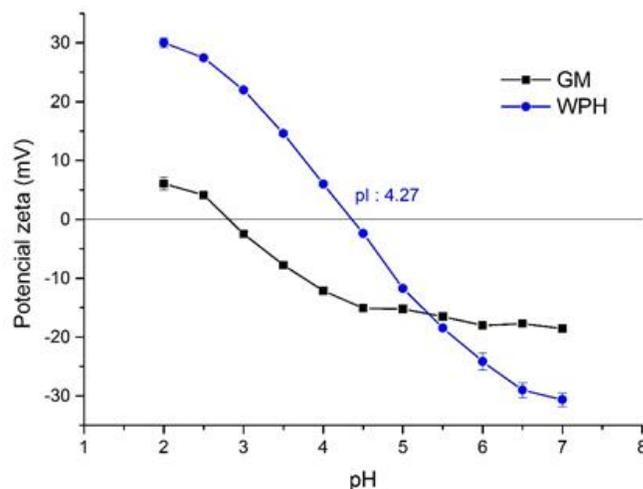


Figura 8. Potencial zeta y punto isoeléctrico (pI) en función del pH de las diluciones de GM y WPH al 0.05% (p/p) analizadas de manera individual.

La variación del ζ aumenta en magnitud conforme el pH se aleja del pI a causa de la protonación los grupos funcionales (NH_3^+ y COO^-) de sus terminales y radicales que conforman a los aminoácidos. La carga positiva ($\text{pH} > \text{pI}$) se debe por la presencia de grupos amonio ($-\text{NH}_3^+$), como resultado de la protonación de los grupos amino ($-\text{NH}_2$). La carga negativa ($\text{pH} < \text{pI}$) es atribuida a los grupos carboxilato ($-\text{COO}^-$) producto de la ionización de los grupos carboxílicos ($-\text{COOH}$) (Hernández-Marín *et al.*, 2013; Ramírez-Santiago *et al.* 2012; Jiménez-Alvarado *et al.*, 2009).

Para el caso de GM, el potencial zeta (ζ) es mayor conforme se acerca a la neutralidad ($\text{pH} 7$). Indicativo de la ionización de su grupos carboxilicos, ($-\text{COOH}$) presentes en los grupos del ácido D-glucurónico y ácido 4-O-metil-glucurónico encontrados en las cadenas ramificadas (Vernon-Carter *et al.*, 2000, 1998). La carga de GM prevaleció con signo (-) tras el pI en $\text{pH} 2.18$, asociado con la fracción proteica ligada a su estructura. Las diferencias pueden relacionarse a las variaciones químicas intrínsecas de los exudados de los árboles de *Prosopis* spp., por efecto de la edad del árbol, estación de colecta, condiciones ambientales, origen, así como el nivel de pureza obtenido por la purificación de GM antes de su aplicación (Cuevas-Bernardino *et al.*, 2017).

4.3.2 Determinación del punto de máxima interacción electrostática

La formación de los complejos solubles depende del grado de ionización de los biopolímeros. Entre $\text{pH} 2$ a 4.25 WPH y GM mantienen las cargas con signo opuesto. Espinosa-Andrews *et al.* (2013), mencionan que la fuerza de interacción electrostática o SEI (Strenght Electrostaical Interaction) por sus siglas en inglés, es el producto del valor absoluto del potencial zeta de los polielectrolitos con carga contraria (Cuadro 6). De acuerdo al cálculo del SEI para WPH:GM con pH entre 3 y 4 (con incrementos de 0.1), la mayor interacción entre los biopolímeros se logró a $\text{pH} 3.5$ con $126.58 \pm 0.40 \text{ mV}^2$, valor reportado de igual manera por (Jiménez-Alvarado *et al.*, 2009). Conforme el potencial zeta de WPH se acerca al

pI, el SEI fue menor. El comportamiento de SEI, entre los biopolímeros utilizados sigue la misma tendencia reportada por Weinbreck *et al.*,(2004).

Cuadro 6. Fuerza de interacción electrostática (SEI) calculada con el potencial zeta (ζ) de las dispersiones, acorde (Espinosa-Andrews *et al.*, 2013).

| pH | ζ WPH ^z (mV) | ζ GM ^y (mV) | SEI (mV ²) |
|-------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| 3.00 | 22.00 | -2.30 | 50.6 |
| 3.10 | 20.52 | -3.57 | 73.26 |
| 3.20 | 19.04 | -4.85 | 92.34 |
| 3.30 | 17.56 | -6.12 | 107.47 |
| 3.40 | 16.08 | -7.39 | 118.83 |
| 3.50 | 14.6 | -8.67 | 126.58 |
| 3.60 | 12.88 | -9.32 | 120.04 |
| 3.70 | 11.16 | -9.97 | 111.27 |
| 3.80 | 9.44 | -10.62 | 100.25 |
| 3.90 | 7.72 | -11.27 | 87.00 |

^zWPH: Hidrolizado de proteína de suero; ^yGM: Goma de mezquite

4.3.3 formación de complejos solubles entre WPH y GM

En las relaciones empleadas se observó la formación conjunta los CI y CS. El rendimiento de coacervación en las relaciones R_{0.3:1} y R_{1:1} fue el mayor (37.70 ± 0.46 %) y menor (16.50 ± 0.65 %) respectivamente (Figura 9).

Existe una mayor formación de CI cuando esta presente una menor cantidad de proteína con respecto a GM. La formación de CS se favoreció con la relación R_{1:1}, en vista que los sitios de interacción con carga negativa (-COO⁻) presentes en GM no fueron neutralizados en su totalidad por los grupos con carga positiva (-NH₃⁺) de WPH. (Turgeon & Laneuville, 2009). Jiménez-Alvarado *et al.* (2009), indica que el grado de ionización esta influenciado por la flexibilidad del los biopolímeros, su concentración y relación en la dispersión.

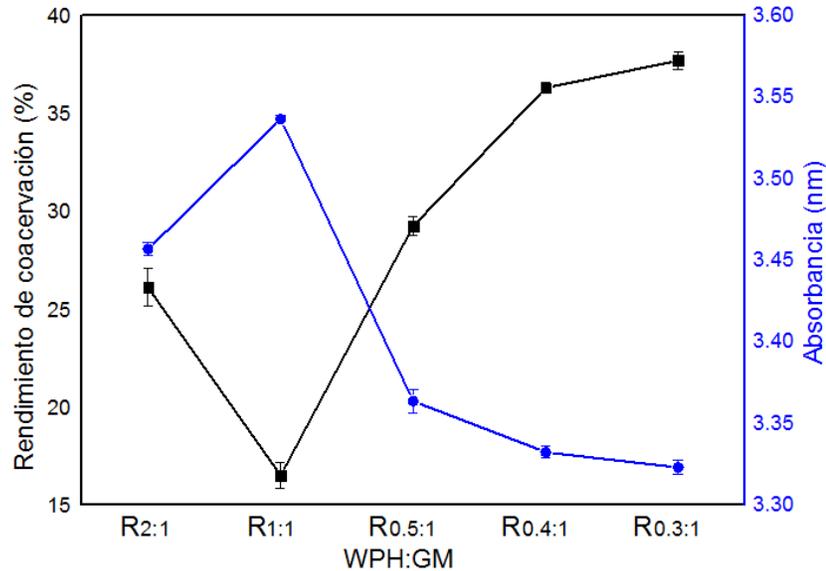


Figura 9. Rendimiento de coacervación y absorbancia registrada por triplicado para las relaciones probadas. Las barras reflejan la variación en el mismo punto

La absorbancia del sobrenadante de las disoluciones de cada relación, es un indicador de la dispersión de la luz debida a la presencia de los sólidos disueltos. Sin embargo, en este trabajo se utilizó como indicador de la formación de complejos solubles (Hernández-Marín *et al.*, 2013; Ramírez-Santiago *et al.* 2012).

La Figura 9 muestra los valores de absorbancia obtenidos en función de la variación de la relación entre los biopolímeros. Observando 2 regiones, caracterizadas por altos y bajos valores de proteína de la siguiente manera: 1) cuando la WPH se encuentra en menor proporción con respecto a GM (R_{0.3:1}, R_{0.4:1}) se induce la neutralización de los aniones de GM, favoreciendo la formación de CI. 2) Cuando WPH y GM son equivalentes la absorbancia es baja, debido a la neutralización parcial de la cadena de GM con los péptidos de WPH (Turgeon & Laneuville, 2009; Weinbreck, Tromp, & de Kruif, 2004). Con los resultados obtenidos se observa que la relación WPH:GM presenta una elevada formación de CI, al ser equivalentes se fomenta la formación de complejos solubles. Para las relaciones (WPH:GM) R_{0.4:1} y R_{0.3:1} la absorbancia fue

equiparable ($p > 0.05$). El rendimiento de coacervación, al variar la relación de biopolímeros, fue de la siguiente forma $R_{1:1} < R_{2:1} < R_{0.5:1} < R_{0.3:1} = R_{0.4:1}$. Al incrementar la diferencia entre los biopolímeros se induce la formación de CI.

4.3.4 Diámetro promedio volumétrico de complejos solubles

Los CS muestran diferenciación entre la relación $R_{0.4:1}$ y $R_{0.3:1}$. Para las relaciones $R_{2:1}$, $R_{1:1}$ y $R_{0.5:1}$ reportan un diámetro volumétrico medio similar $> 1.02 \mu\text{m}$. Para su medición, los CS fueron dispersos en agua a 200 rpm, esto pudo influir para formar conglomerados de CS con el fin de proteger las zonas hidrófobas de la proteína. A diferencia de los complejos entre proteína de chícharo (PPI) y GM reportados por Cuevas-Bernardino *et al.* (2017), quienes reportaron el diámetro hidrodinámico de 400 nm, para los CS con relación 2:1 (PPI:GM) y reportando una correlación positiva entre el diámetro hidrodinámico y el contenido de PPI. Esto último coincidió con este trabajo. Las proteínas al dispersarse con mayor velocidad que un polisacárido, pueden estar cambiando de ubicación de una manera más rápida. La reestructuración es llevada a cabo al incrementar las cargas en las moléculas, conforme el pH disminuye y se favorece si existe la agitación (Turgeon & Laneuville, 2009).

El tamaño de partícula es un factor determinante si se utilizan los complejos como emulsionantes, donde a menor tamaño mayor velocidad para migrar a la región interfacial (Kilara & Vaghela, 2004). Cuando los complejos solubles son encontrados como partículas independientes, una capa puede formarse alrededor de la interfase hidrófila/hidrófoba, brindando estabilización estérica y electrostática. Permitiendo que las gotas dispersas en una emulsión puedan mantener su tamaño y ser estables ante la coalescencia (Turgeon & Laneuville, 2009; Weinbreck *et al.*, 2004).

El ζ de los CS fue distinto ($p \leq 0.05$) para cada relación. En presencia de un mayor número de sitios neutralizados el ζ fue menor y mayor la formación de CI. La tendencia de solubilidad es confirmada por el ζ . Para las relaciones probadas fue

$R_{1:1} > R_{2:1} = R_{0.5:1} > R_{0.4:1} > R_{0.3:1}$ (Cuadro 7). Conforme las partículas presenten un incremento en carga electronegativa del mismo signo, tendrán tendencia a repelerse y permanecer solubles en la dispersión, incrementando la absorbancia (Ramírez-Santiago *et al.* 2012).

Cuadro 7. Variación de potencial zeta y diámetro promedio volumétrico D (3,0), determinado para los complejos solubles, con respecto a la relación WPH:GM

| Relación WPH:GM | Diámetro de complejos solubles D (3,0) μm | Potencial zeta (mV) |
|--------------------|--|---------------------|
| R _{2:1} | 1.032 \pm 0.008 ab | -5.01 \pm 0.7 c |
| R _{1:1} | 1.044 \pm 0.005 ab | -6.10 \pm 0.2 d |
| R _{0.5:1} | 1.054 \pm 0.005 ab | -4.7 \pm 0.3 c |
| R _{0.4:1} | 1.193 \pm 0.187 a | -3.4 \pm 0.3 b |
| R _{0.3:1} | 0.877 \pm 0.012 b | -2.2 \pm 0.2 a |

^z Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes (Tukey $p = 0.05$).

Sólo para los tratamientos R_{2:1} y R_{0.5:1} no hay diferencia significativa (Cuadro 7) para el ζ . Evidenciando que la solubilidad de los biopolímeros está implicada en la formación de los CS. Esto concuerda con el hecho de que WPH actúa efectivamente en la formación de CI cuando se encuentra en una menor cantidad con respecto a GM. Un macro-ion ramificado como GM alcanza su límite de expansión, antes que un macro-ion lineal (Jiménez-Alvarado *et al.* 2009). Aplicado a este trabajo, en las relaciones donde GM es el material en exceso, esta expansión le brinda una mayor capacidad de interacción con las moléculas de WPH que al ser más pequeñas migran con rapidez a los sitios (-) de GM (Devi *et al.*, 2017). Al medir el ζ de los complejos formados entre PPI:GM, reportado por Cuevas-Bernardino *et al.* (2017), la relación R_{0.5:1} reporta cerca de -20 mV. Donde a mayor contenido de GM, mayor fue la magnitud del ζ y la carga negativa se asoció con GM.

4.4 Conclusiones

En este trabajo se presentan la metodología y las condiciones para favorecer el la formación de complejos solubles e insolubles entre el hidrolizado de proteína de lactosuero y la goma de mezquite. Se demuestra que las características fisicoquímicas estudiadas dependen de la relación de los biopolímeros utilizados y de su concentración en la dispersión.

Las relaciones con menor contenido de proteína ($R_{0.3:1}$ y $R_{0.4:1}$; WPH:GM) ofrecieron significativamente un mayor rendimiento de coacervación. Mientras que cuando el contenido de los biopolímeros fue equivalente ($R_{1:1}$; WPH:GM) se favorece significativamente la formación de complejos solubles que aquel presente en el resto de las relaciones estudiadas. El potencial zeta de los complejos solubles formados por cada relación, mostró la misma tendencia que la absorbancia.

El diámetro volumétrico medio en los complejos solubles e insolubles WPH:GM está relacionado con la diferencia en peso entre ellas, obteniendo significativamente menor en aquellas relaciones con menor contenido de proteína.

4.5 Referencias

- Amit, K., & Bandyopadhyay, P. (2012). *Polysaccharide-Protein Interactions and Their Relevance in Food Colloids*. <https://doi.org/10.5772/50561>
- Cuevas-Bernardino, J. C., Leyva-Gutierrez, F. M. A., Vernon-Carter, E. J., Lobato-Calleros, C., Román-Guerrero, A., & Davidov-Pardo, G. (2017). Formation of biopolymer complexes composed of pea protein and mesquite gum – Impact of quercetin addition on their physical and chemical stability. *Food Hydrocolloids*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.11.015>
- Devi, N., Sarmah, M., Khatun, B., & Maji, T. K. (2017). Encapsulation of active ingredients in polysaccharide–protein complex coacervates. *Advances in Colloid and Interface Science*, 239, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.05.009>
- Espinosa-Andrews, H., Enríquez-Ramírez, K. E., García-Márquez, E., Ramírez-Santiago, C., Lobato-Calleros, C., & Vernon-Carter, J. (2013).

- Interrelationship between the zeta potential and viscoelastic properties in coacervates complexes. *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 161–166. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.053>
- Evans, M., Ratcliffe, I., & Williams, P. A. (2013). Emulsion stabilisation using polysaccharide–protein complexes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 18(4), 272–282. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.04.004>
- Hernández-Marín, N. Y., Lobato-Calleros, C., & Vernon-Carter, E. J. (2013). Stability and rheology of water-in-oil-in-water multiple emulsions made with protein-polysaccharide soluble complexes. *Journal of Food Engineering*, 119(2), 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.05.039>
- Jiménez-Alvarado, R., Beristain, C. I., Medina-Torres, L., Román-Guerrero, A., & Vernon-Carter, E. J. (2009). Ferrous bisglycinate content and release in W1/O/W2 multiple emulsions stabilized by protein–polysaccharide complexes. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2425–2433. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.06.022>
- Kilara, A., & Vaghela, M. N. (2004). 4 - Whey proteins A2 - Yada, R.Y. BT - Proteins in Food Processing. In *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* (pp. 72–99). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9781855738379.1.72>
- López-Franco, Y. L., Córdova-Moreno, R. E., Goycoolea, F. M., Valdez, M. A., Juárez-Onofre, J., & Lizardi-Mendoza, J. (2012). Classification and physicochemical characterization of mesquite gum (*Prosopis* spp.). *Food Hydrocolloids*, 26(1), 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.05.006>
- Piorkowski, D.T., McClements, D.J. (2013). Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. *Food Hydrocolloids*, 1-37.
- Ramírez-Santiago, C. , Lobato-Calleros, C., Espinosa-Andrews, H., Vernon-Carter, E.J. (2012). Viscoelastic properties and overall sensory acceptability of reduced fat Petit-Suisse cheese made by replacing milk fat with complex coacervate. *Dairy Science and technology*, 92:383-398.
- Turgeon, & Laneville, S. I. (2009). CHAPTER 11 - Protein + Polysaccharide Coacervates and Complexes: From Scientific Background to their Application as Functional Ingredients in Food Products. In S. Kasapis, I. T. Norton, & J. B. B. T.-M. B. S. Ubbink (Eds.) (pp. 327–363). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374195-0.00011->
- Vernon-Carter, E. J., Pedroza- Islas, R., & Beristain, C. I. (1998). Stability of capsicum annum oleoresin-in-water emulsions containing prosopis and acacia gums. *Journal of Texture Studies*, 29(5), 553–567.

- Weinbreck, F., Tromp, R. H., & de Kruif, C. G. (2004). Composition and Structure of Whey Protein/Gum Arabic Coacervates. *Biomacromolecules*, 5(4), 1437–1445. <https://doi.org/10.1021/bm049970v>
- Wijaya, W., Patel, A. R., Setiowati, A. D., & Van der Meeren, P. (2017). Functional colloids from proteins and polysaccharides for food applications. *Trends in Food Science & Technology*, 68, 56–69. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.003>

5. ESTABILIZACIÓN DE EMULSIONES O/W CON COMPLEJOS BIOPOLIMERICOS UTILIZANDO DIFERENTES FRACCIONES DE GRASA LÁCTEA

La utilización de partículas sólidas como estabilizantes, gana cada vez más atención. Por la posibilidad de sustitución de ingredientes sintéticos de bajo peso molecular por opciones naturales, presentes en múltiples alimentos procesados. Particularmente aquellas en las que se requiere estabilizar una interfase aceite/agua. En este trabajo, se utilizaron los complejos biopoliméricos formados entre proteína de suero hidrolizada y goma de mezquite como material de pared para la formación de gotas de grasa fraccionada (LMF, MMF, HMF y AMF) dispersas en una emulsión sencilla O/W (ϕ :0.3). La tasa de coalescencia en todos los tratamientos (1.04×10^{-6} a 4.95×10^{-7}) las identifican como emulsiones estables dentro de las 24 horas de almacenamiento ($5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$). El mayor diámetro D(3,2) fue obtenido en el tratamiento OW_HMF ($3.14 \pm 0.11 \text{ }\mu\text{m}$). y el menor con OW_LMF ($3.00 \pm 0.005 \text{ }\mu\text{m}$). Los valores del potencial zeta de los tratamientos no presenta diferencia significativa (-28 mV), por tanto favorece las fuerzas de repulsión entre las gotas. Las micrografías tomadas para cada tratamiento identifican la adsorción uniforme de complejos biopoliméricos en la interfase entre las gotas de grasa y la fase acuosa continua. El diámetro promedio superficial de $3.05 \pm 0.05 \text{ }\mu\text{m}$ en las emulsiones almacenadas hasta 6 días. Finalmente, cada emulsión tiene un comportamiento viscoelástico en el que $G' > G''$, la viscosidad aparente (2.7 a 3.56 Pa s) no presenta diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Las emulsiones obtenidas pueden ser utilizadas en matrices alimenticias de baja viscosidad por consiguiente propiciará su dispersión y eficiencia.

Palabras clave: goma de mezquite, fracciones de grasa, Carreau- Yasuda, propiedades viscoelásticas.

Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria

Universidad Autónoma Chapingo

Dulce Maria Pedroza Pedroza

Consuelo S.O. Lobato Calleros

STABILIZATION OF O/W EMULSIONS WITH POLIMERIC COMPLEXES USING DIFERENTS MILK FAT FRACTIONS

The use of solid particles as stabilizers is improve the possibilities of substitution of synthetic ingredients with high molecular weight, which are present in processed foods, by natural options. Particularly where it is necessary to stabilize an oil / water interfase. In this work, the biopolymer complexes, formed with hydrolyzed whey protein and mesquite gum, were used as wall material in the formation of oil droplets (LMF, MMF, HMF) dispersed in a O / W emulsion (ϕ : 0.3). The coalescence rate in all treatments ($1.04 \text{ E }^{-0.6} - 4.95 \text{ E }^{-07}$) is identified as a stable emulsion within 24 h of storage. The highest size (D (3.2)) was in OW_HMF (3.14 μm). and the lowest in OW_LMF (3.00 μm). The Zeta potential of the emulsions maintains a negative charge (-28 mV) in the dispersion, this promotes the repulsion forces between the droplets. The micrographs taken for each treatment identify a uniform coverage and average size of 3.3 μm after 6 days of storage. Finally, each section has a viscoelastic behavior with $G' > G''$, the apparent viscosity does not have significant differences ($p \leq 0.05$). The emulsions obtained could be used in food matrices with a low viscosity that promotes their dispersion and efficiency.

Key words: mesquite gum, milk fat fractions, viscoelasticity, whey protein

Thesis Universidad Autónoma Chapingo

Dulce Maria Pedroza Pedroza

Consuelo S.O. Lobato Calleros

5.1. Introducción

Las propiedades físicas de la grasa láctea (GL) son determinadas por los distintos triacilgliceroles (TGA) (>350 diferentes) que la componen (Lopez-Ollivon, 2009; Schien *et al.*, 2009). El fraccionamiento de GL permite dividir los componentes de la GL a partir de sus propiedades térmicas (cristalización y fundido) (Yella, 2009) generando dos fracciones (oleína y estearina). Estas adquirirán diferentes propiedades mecánicas (viscosidad, polimorfismo), químicas (perfil lipídico, contenido de colesterol) y sensoriales (sabor, olor, punto de fusión) (Marangoni, 2002; Anihouvi *et al.*, 2012). Lo cual es aprovechado por la industria procesadora de alimentos para cubrir y diseñar productos con funcionalidad específica (Palmquist, 2006).

Para favorecer la inclusión de lípidos en un alimento se utiliza la emulsificación. Este proceso deberá formar gotas de aceite con tamaño homogéneo, las cuales favorecen su dispersión en la matriz alimentaria y facilitan el contacto con otros componentes como biomoléculas, agua, sales y aditivos (Appelqvist, Golding, Vreeker, & Zuidam, 2007; Dickinson, 2006). Las emulsiones sencillas son sistemas compuestos por 2 líquidos inmiscibles donde uno está disperso en otro. Resultando en emulsiones aceite/agua (O/W) o agua en aceite (W/O) (Appelqvist, *et al.* 2007; Dickinson, 2006). Ambas fases son termodinámicamente inestables, ya que tienden a cambiar de tamaño o morfología en función del tiempo. Por ello, se utilizan emulsionantes sintéticos de bajo peso molecular que estabilizan la región interfacial entre los componentes lipídicos y los componentes solubles en agua (Leal-Calderon, Bibette, & Schmitt, 2007 b). En la actualidad, se buscan partículas que igualen o mejoren la actividad superficial de los componentes sintéticos. Entre las opciones naturales, figuran los fosfolípidos, monoglicéridos, proteínas (de suero y vegetales) o polisacáridos (goma arábiga, almidones modificados o pectinas) (Nushtaeva, 2016).

Como producto de una hidrólisis parcial de la α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina el hidrolizado de proteína de suero (WPH) es una mezcla heterogénea de

péptidos. Por su tamaño, pueden cubrir partes en la interfase que usualmente no son protegidas en su totalidad por las proteínas globulares (Kilara & Vaghela, 2004). Existen nuevas fuentes de polisacáridos con acción interfacial con poca difusión como la goma de mezquite, quien en funcionalidad y estructura es comparada con la goma arábica (Jiménez-Alvarado, Beristain, Medina-Torres, Román-Guerrero, & Vernon-Carter, 2009; Vernon-Carter, Beristain, & Pedroza-Islas, 2000; Vernon-Carter, Pedroza-Islas, & Beristain, 1998).

Las propiedades interfaciales entre las proteínas y polisacáridos pueden mejorarse cuando existen interacciones electrostáticas entre ellos para formar complejos biopoliméricos (CB) (Williams & Phillips, 2009). Para que los CB puedan actuar como emulsionantes/estabilizantes, deberán existir entre ellos cargas electrostáticas de signo opuesto con las que se induce su unión, de lo contrario la acción interfacial se verá disminuida provocando la desestabilización de la emulsión (Turgeon & Laneuville, 2009). Para comprobar la estabilidad de las emulsiones, se evalúan los cambios morfológicos que ocurren con las gotas de grasa dispersas (O) en la fase continua (W) en función del tiempo para lo cual se utilizan las técnicas de microscopía o medición de la tasa de coalescencia.

La determinación de las propiedades mecánicas (módulo de almacenamiento y pérdida) y la viscosidad, que ofrecen las gotas de grasa láctea en estado disperso, permiten hacer inferencias sobre las características estructurales que brindará la emulsión al alimento (Hernández-Marín *et al.*, 2013; Sagis & Scholten, 2014). Al caracterizar la funcionalidad de las emulsiones se podrá definir las condiciones necesarias para asegurar su estabilidad dentro de una matriz alimentaria y durante la elaboración del alimento.

Las emulsiones estabilizadas por complejos solubles han servido para encapsular componentes activos, mejorar el perfil nutricional y la estructura de los alimentos procesados en los que se sustituye grasa. El objetivo del presente capítulo fue determinar las propiedades fisicoquímicas y viscoelásticas de

emulsiones aceite-en-agua (O/W), constituidas por distintas fracciones de grasa láctea, estabilizadas mediante complejos solubles; formados a partir de hidrolizado de proteína de lactosuero (WPH) y goma de mezquite (GM).

5.2. Materiales y métodos

5.2.1 Materiales

Para la fase oleosa (O) de las emulsiones aceite-agua (O/W), se utilizaron de manera individual las fracciones de grasa láctea con diferente punto de fusión. LMF: fracción de bajo punto de fusión, MMF: fracción de medio punto de fusión y HMF: fracción alto punto de fusión y grasa láctea anhidra (AMF) (Fonterra, Auckland, Nueva Zelanda). El fraccionamiento se llevó a cabo en un rotavapor (Hahnvapor, HS-2005S, Hahnshin Scientific Co., Corea del Sur). La fracción de bajo punto de fusión (LMF), fue la fase líquida obtenida por el fraccionamiento a 20° C de 300 g de AMF (130 minutos de maduración a 20 ± 1°C y 50 rpm). Fueron utilizados 330 g, de la fase sólida del anterior proceso para el fraccionamiento a 30 °C (240 minutos de maduración a 30 ± 2°C y 50 rpm), obteniendo una fase líquida que se denominó como la fracción de medio punto de fusión (MMF) y la fase sólida como fracción de alto punto de fusión (HMF) (Lopez *et al.*, 2006; Marangoni, 2002; Yella Reddy, 2010). Los puntos de fusión para cada fracción fueron de 19.71 °C (LMF), 28.82 °C (MMF), 43.41 °C (HMF), y 36.02 °C para AMF.

Como emulsificantes naturales se utilizaron los complejos solubles formados por el hidrolizado de proteína de lactosuero (WPH. Hilmar 8390, Hilmar cheese company, California, EUA) y goma de mezquite (GM. Exudado de *Prosopis spp.* recolectado en el estado de San Luis Potosí, México). El proceso de purificación de GM consistió en la dispersión al 15 % p/p de los exudados que presentaron coloración ámbar claro y ausencia de residuos minerales (López-Franco *et al.*, 2012). La dispersión fue filtrada en 4 ocasiones a través de papel Whatman no. 1 (Jiménez-Alvarado *et al.*, 2009) y fue secada en estufa a 53 ± 2 °C (Riossa, Ciudad de México, México) durante 15 horas. Las partículas secas fueron

pulverizadas y almacenadas en frascos ámbar para prevenir reacciones de deterioro, contaminación y aglomeración por humedad.

Como fase acuosa (W) fue utilizada la dispersión al 10 % p/p de WPH:GM (1:1) en agua destilada. La dispersión fue agitada a 600 rpm por 8 horas (PRO 10 power, IKAMAG, IKA Works, Inc, Wilmington, EUA) e hidratada por 24 horas a 5 ± 1 °C. Posteriormente, se realizó el ajuste a pH 3.5 con ácido clorhídrico 1N (HCl) e hidróxido de sodio (NaOH) al 1N adquirido en Química Suastes, Tláhuac, Estado de México), (pH 120, Conductronic, Santa Cruz Buenavista, Puebla, México) y fue almacenada a 5 ± 1 °C por 19 horas.

5.2.2 Formación de emulsiones O/W

Se formularon cuatro emulsiones sencillas O/W con $\phi:0.3$, variando el punto de fusión de la fase oleosa (O). Sobre esta última se empleó la grasa láctea (AMF) y las 3 fracciones de grasa (LMF, MMF, HMF). La fase acuosa (W) de las emulsiones estuvo constituida por la dispersión al 10% p/p de WPH:GM (1:1) a pH 3.5, que corresponden a los tratamientos: O/W_{AMF} , O/W_{LMF} , O/W_{MMF} y O/W_{HMF} .

Previo a la homogenización, la fase oleosa (O) se sometió a 59 ± 2 °C por 20 minutos con el fin de eliminar la memoria cristalina. Las emulsiones sencillas se formaron a través de la incorporación gota a gota de la fase oleosa (O) a la fase acuosa (W) por la homogenización realizada con el equipo Ultra-turrax T50 basic (IKA Works, Inc. Wilmington, EUA) operado a 8000 rpm por 8 minutos, manteniendo la temperatura a 50 ± 2 °C mediante el uso de un baño maría. Las emulsiones fueron ajustadas a 10 °C por baño en hielo y almacenadas en refrigeración a 5 ± 1 °C.

Las condiciones de velocidad y tiempo fueron determinadas por experimentos preliminares en función de la estabilidad y tamaño de gota obtenidos a diferentes velocidades de homogenización, los resultados no son mostrados.

5.2.3 Estabilización de emulsiones O/W

Tamaño de gota y tasa de coalescencia

El diámetro volumétrico superficial $D(3,2)$ de cada tratamiento fue verificado durante los primeros 6 días cada 24 horas, empleando el analizador de partícula Mastersizer 3000 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) el índice de refracción fue de 1.452 para la fase oleosa (O) (Truong *et al.*, 2014).

La tasa de coalescencia (tiempo que tarda la fase oleosa en aumentar su tamaño) durante las primeras 12 horas fue calculada con la ecuación (3)

$$N_t = 6(\phi)10^{12} / \pi(D_{3,0}t)^3 \quad (3)$$

Donde ϕ es la fracción de la fase acuosa y $D_{(3,0)t}$ es el diámetro medio volumétrico en función del tiempo. Para cada emulsión se graficó el cambio logarítmico en N_t en función del tiempo (segundos) a 1, 4, 8, 12 y 24 horas (Ruíz-Ramos *et al.*, 2006). La ecuación lineal obtenida permite calcular la pendiente o constante de coalescencia (cambio de número de gotas de grasa m/L en función del tiempo). De acuerdo a Sherman, (1968) la emulsión simple será declarada como muy estable si la constante de coalescencia es $<10^{-11}$; como estable si la magnitud de la constante de coalescencia está entre 10^6 a 10^{-11} e inestable cuando la constante es $>10^{-6}$.

Morfología de las emulsiones O/W

Fueron tomadas micrografías de las emulsiones O/W en el día 1 y 6 de su preparación con un microscopio óptico (Olympus BX45, Olympus Optical, Tokyo, Japón) acoplado a una cámara digital (Media Cybernetics, EUA). Para la preparación de la muestra se tomaron 0.5 ml de la emulsión para ser dispersados (agitación suave por 30 segundos) en 6 ml de agua destilada a 20 °C y pH 3.5. Se colocaron unas gotas de la dilución en portaobjetos y fueron observadas las gotas formadas a un aumento de 100x, usando aceite de inmersión. Con ello se verificó visualmente la formación y morfología de las emulsiones. Se tomaron micrografías de las zonas representativas de la muestra.

Medición de la carga electrostática en las emulsiones O/W

Cada emulsión sencilla fue diluida al 0.01 % p/p (pH 3.5) para medir el potencial zeta, determinado por el equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, Reino Unido). Posteriormente, se cuantificó la movilidad electroforética de la muestra y a partir del modelo matemático de Smoluchowski se determinó el potencial zeta (ζ) (Cuevas-Bernardino *et al.*, 2017).

5.2.4 Propiedades reológicas

La medición de la viscosidad en cada tratamiento se determinó después de un día de preparación, aplicando pruebas dinámicas (curvas de flujo) y oscilatorias (barridos de amplitud). Utilizando un reómetro Physica MCR 301 (Anton Paar, Messtechnik, Stuttgart, Alemania) con geometría de cilindros concéntricos (14mm de diámetro interno). Se colocaron 3.7 ml de cada tratamiento en el sistema de medición, con un tiempo de recuperación de su estructura de 5 minutos. a 5.2 °C regulado por un recirculador de temperatura (Julabo MFI 32, Seelbach, Alemania).

Se obtuvieron las curvas de flujo donde la viscosidad (Pa*s) estuvo en función de la tasa de corte (1/s), en un intervalo de 10^3 a 10^{-3} con frecuencia de 1 Hz. Los datos experimentales fueron ajustados al modelo Carreau-Yasuda, utilizando el software del equipo (Rheoplus 32 V2.62, Stuttgart, Alemania), para definir la viscosidad aparente, tiempo de relajación, índice de comportamiento y viscosidad infinita (Carrillo-Navas *et al.*, 2012).

Los barridos de amplitud fueron utilizados para determinar la región viscoelástica lineal (RVL), donde el comportamiento viscoelástico no fue dependiente del esfuerzo o de la deformación. Se utilizó un intervalo de deformación de 0.001 a 100%, a una temperatura de 5.2 ± 0.5 °C controlado por un recirculador de temperatura (Julabo MFI 32, Seelbach, Alemania). Los valores del módulo de

almacenamiento (G'), módulo de pérdida (G'') y el factor de cedencia ($\tan \delta$) se obtuvieron del software del equipo (Rheoplus 32 V2.62, Stuttgart, Alemania).

5.2.5 Análisis estadístico de datos

Todos los experimentos se realizaron por triplicado de manera independiente, usando un diseño completamente al azar. Todas las mediciones se llevaron a cabo por triplicado y los valores informados corresponden a las medias y desviación estándar. Los resultados se sometieron a análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA) y en los casos pertinentes a prueba de comparación de medias de Tukey. El nivel de significancia se estableció en $p \leq 0.05$. El análisis de datos se realizó con el software Statgraphics 7 (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc, Cambridge, MA, EUA).

5.3. Resultados y discusión

5.3.1 Estabilización de emulsiones O/W

El proceso de emulsificación se llevó a cabo a 55 ± 2 °C, con el fin de borrar la memoria cristalina en la grasa, los cuales pudieran interferir con las interacciones hidrófobas entre la interfase (Jones, Lesmes, Dubin, & McClements, 2010).

En experimentos previos, se determinó que la concentración de biopolímeros a utilizar en la fase dispersa fuerde 10% p/p, respetando la relación 1:1 (WPH:GM). Se observó que las concentraciones menores a 9 % p/p, la separación de fases era evidente en menos de 20 horas (los resultados no son mostrados). Evans *et al.* (2013), demostraron que la concentración requerida para producir la emulsificación de triacilglicéridos de cadena media es alrededor de 10 % de goma arábica en la fase dispersa (W) con una ϕ de 0.15 en emulsiones O/W.

Cambios en el tamaño de gota en función del tiempo

El tamaño de gota de la fase oleosa en las emulsiones está definido por la homogenización aplicada. Los acción de los emulsificantes al reducir la energía interfacial así como de los estabilizantes al ser una barrera contra la coalescencia permitirán que las gotas mantengan su tamaño en función del tiempo (Dickinson,

2006). La tasa de coalescencia de las emulsiones O/W, definida como el tiempo que tarda la fase dispersa en aumentar su tamaño, al unirse unas gotas con otras permite definir la estabilidad de la emulsión. Para las emulsiones estabilizadas con complejos solubles almacenadas a 5 °C, la tasa de coalescencia fue de del orden logarítmico 10^{-6} y 10^{-7} , de acuerdo con Sherman (1968), se consideran como emulsiones estables siendo semejante el comportamiento entre tratamientos (Cuadro 8). Estos resultados nos indican que la tasa de cambio en el número de gotas por ml evitó la desestabilización acelerada de las emulsiones.

Cuadro 8. Tasa de coalescencia obtenida en las primeras 24 h de almacenamiento de los tratamientos.

| Tratamiento | Tasa de coalescencia a 24 h |
|---------------------------------|---|
| ^Z O/W _{AMF} | 2.45 E-07 ± 1.08 10 ⁻⁰⁷ a ^v |
| ^Y O/W _{LMF} | 2.93 E-07 ± 1.56 10 ⁻⁰⁷ a |
| ^X O/W _{MMF} | 4.95 E-07 ± 4.48 10 ⁻⁰⁷ a |
| ^W O/W _{HMF} | 1.05 E-06 ± 8.96 10 ⁻⁰⁶ a |

^ZO/W_{AMF}: Grasa Láctea Anhidra; ^YLMF: Fracción de bajo punto de fusión; ^XMMF: Fracción de medio punto de fusión; ^WHMF: Fracción de alto punto de fusión. ^v Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes (Tukey $p = 0.05$).

El potencial para estabilizar una emulsión es consecuencia del carácter polimérico y carácter viscoelástico en la interfase. Comparado contra los emulsificantes de bajo peso, los complejos solubles muestran una menor cinética de adsorción. Empero, se considera una adsorción irreversible (Tavernier *et al.*, 2016). Entre más pequeños sean los complejos solubles (<100 nm), con mayor rapidez serán adsorbidos en la interfase (Murphy, Farkas, & Jones, 2016). La elaboración previa de los complejos y su utilización posterior en la emulsión, previenen la floculación que puede ocurrir en el sistema capa por capa (Arditty, Schmitt, Giermanska-Kahn, & Leal-Calderon, 2004). Jiménez-Alvarado *et al.*(2009), reportaron una tasa de coalescencia (tras 20 días de almacenamiento) de 7.09×10^{-7} en emulsiones múltiples con D (3,0) de $2.05 \pm 0.07 \mu\text{m}$, las gotas

fueron protegidas con complejos WPC:GM con una relación 2:1, la fase oleosa estuvo compuesta de una emulsión sencilla (aceite de canola /30% de hierro bisglicinato). En comparación con este trabajo para la misma variable se obtuvo una menor tasa de coalescencia (O/W_{AMF} : $2.45 \cdot 10^{-07}$) y una menor estabilidad (6 días), donde los resultados obtenidos pueden ser relacionados con la grasa láctea y sus fracciones.

Por su parte Acedo-Carrillo *et al.* (2006), reportaron 7 días de estabilidad en emulsiones O/W, empleando como estabilizante/emulsificante 22% p/p de GM en la fase dispersa y empleando aceites con diferente longitud de cadena, obteniendo diámetro volumétrico entre 2.5 a 4.3 μm . Para este trabajo, la formación de complejos solubles, permitió la disminución de la concentración de la GM en la fase dispersa, logrando mantener sus características estéricas y electrostáticas, así como un diámetro volumétrico medio $> 1.90 \mu\text{m}$ tras 6 días de almacenamiento (Cuadro 9). Con ello, se observa que la utilización de complejos solubles permite la producción de emulsiones estables, con mayor eficiencia que cuando simplemente se utiliza WPH o GM (Girard, Turgeon, & Paquin, 2002).

Cuadro 9. Seguimiento del diámetro volumétrico medio D(3,0) de cada tratamiento en función del tiempo

| Tratamiento | 1 h (μm) | 24 h (μm) | 6 días (μm) |
|----------------------|--------------------------------|------------------------|--------------------------|
| ^z O/W_AMF | 2.01 ± 0.01 a ^v | 1.98 ± 0.004 a | 1.93 ± 0.02 ab |
| ^y O/W_LMF | 1.99 ± 0.01 a | 1.97 ± 0.01 a | 1.96 ± 0.02 a |
| ^x O/W_MMF | 2.00 ± 0.01 a | 1.98 ± 0.02 a | 2.00 ± 0.06 a |
| ^w O/W_HMF | 1.98 ± 0.03 a | 1.93 ± 0.04 a | 1.90 ± 0.04 b |

^zO/W_AMF: Grasa Láctea Anhidra; ^yLMF: Fracción de bajo punto de fusión; ^xMMF: Fracción de medio punto de fusión; ^wHMF: Fracción de alto punto de fusión. ^v Medias seguidas con la misma letra en cada fila no son diferentes (Tukey $p= 0.05$).

Tras una hora de preparación los tratamientos presentaron un diámetro semejante (Cuadro 9). Esta tendencia entre tratamientos se mantuvo hasta las 24 horas de almacenamiento lo cual coincide con la tasa de coalescencia

calculada. O/W_{LMF} y O/W_{MMF} se mantuvieron sin diferencia ($p < 0.05$) hasta los 6 días. Por su parte O/W_{AMF} y O/W_{HMF} redujeron su diámetro inicial (Cuadro 9). Esto puede estar correlacionado con el contenido de ácidos grasos saturados, que es mayor en estos tratamientos y el efecto de cremación. Al utilizar solo GM en la emulsificación de aceite de naranja se observa una tendencia de disminución del diámetro volumétrico tras 1 semana de almacenamiento, asociado al efecto del cremado de las gotas con $2.5 \pm 2 \mu\text{m}$ de diámetro volumétrico medio $D(3,0)$ (Acedo-Carrillo *et al.*, 2006).

5.3.2 Cambios en el Diámetro volumétrico superficial $D(3,2)$

Los resultados mostrados en el Cuadro 10 presentan una tendencia a la reducción del diámetro $D(3,2)$ en las emulsiones durante el almacenamiento $5 \pm 1^\circ\text{C}$. Koupantsis & Kiosseoglou (2009) reportan que las emulsiones estabilizadas con complejos biopoliméricos mantienen su tamaño a -15°C por 7 días, utilizando como fase oleosa aceite de maíz.

Cuadro 10. Variaciones del diámetro volumétrico-superficial medio $D(3,2)$ en función del tiempo

| Tratamiento | 24 h (μm) | 72 h (μm) | 6 días (μm) |
|--------------------------|--------------------------------|------------------------|--------------------------|
| ^z O/W_{AMF} | 3.02 ± 0.02 a ^z | 2.98 ± 0.01 b | 2.94 ± 0.01 c |
| ^y O/W_{LMF} | 3.0 ± 0.005 a | 3.03 ± 0.04 a | 3.04 ± 0.06 a |
| ^x O/W_{MMF} | 3.05 ± 0.05 b | 3.05 ± 0.02 b | 3.13 ± 0.09 a |
| ^w O/W_{HMF} | 3.14 ± 0.11 a | 3.12 ± 0.08 a | 3.10 ± 0.1 a |

^z O/W_{AMF} : Grasa Láctea Anhidra; ^y LMF : Fracción de bajo punto de fusión; ^x MMF : Fracción de medio punto de fusión; ^w HMF : Fracción de alto punto de fusión. ^v Medias seguidas con la misma letra en cada fila no son diferentes (Tukey $p = 0.05$).

El cuadro 10 muestra que solo el tratamiento que contenía AMF, presentó una reducción en el tamaño de gota entre el primer y último día de almacenamiento. Por su parte, aquellos que contenían fracciones de grasa láctea de alto y bajo

punto de fusión mantuvieron el tamaño inicial tras 6 días de almacenamiento (Cuadro 10). OW_{MMF} incrementa el diámetro volumétrico-superficial medio después de las 72 horas de almacenamiento. Los cambios de tamaño presentados en los tratamientos no propiciaron la separación de fases en las emulsiones tras 6 días de almacenamiento.

Las proteínas del suero, como WPH, al ser utilizado como emulsificante retardan la cremación de las emulsiones sin embargo, otros autores consideran que no son lo suficientemente eficientes contra la coalescencia, a diferencia de los surfactantes de bajo peso molecular (Kilara & Vaghela, 2004). Al utilizar el concentrado de proteína de suero y Tween 80 como emulsificantes para la emulsificación de fracciones de grasa láctea. Truong *et al.* (2014), indicaron que al adsorber en la interfase macromoléculas como las proteínas, se reduce la eficiencia de formación de gotas pequeñas en comparación con los surfactantes de bajo peso molecular (Tween 80). Dado que estos últimos tienen una tasa de difusión mayor provocando una rápida adsorción en la interfase. Las emulsiones estabilizadas con WPC mantuvieron el mismo tamaño (0.13-3.10 μm) sin agregación o cremado por 24 horas. En comparación con este trabajo, la acción interfacial de los complejos solubles logró una estabilidad de hasta por 6 días con tamaño similar de las gotas de grasa láctea (cerca de 3 μm), brindando mayor estabilidad que la proteína de suero (utilizada por si sola) y por el Tween 80.

5.3.3 Potencial zeta de emulsiones

La protección brindada por la capa de CS en la interfase de las gotas de grasa y agua no presentó cambios significativos entre los tratamientos ($p \leq 0.05$), después de 24 horas de almacenamiento (Cuadro 11). De esta manera los CS formados entre WPH:GM que están presentes en la fase dispersa mantienen un potencial zeta negativo, incrementando las fuerzas de repulsión entre gotas y favoreciendo la estabilidad. El potencial zeta con valor negativo, obtenido en las emulsiones, se relaciona con el aumento en el área superficial. A causa del incremento en el número de gotas pequeñas en la se incrementa la adsorción en

la interfase de una mayor cantidad de CS con carga negativa. Los grupos hidroxilos (-OH) de GM, lo que origina una alta densidad de carga asociadas a fuerzas repulsivas entre las gotas de grasa, permitiendo que la emulsión permanezca estable durante el almacenamiento. En la protección multicapa con GM en emulsiones O/W, se puede disminuir la magnitud del potencial zeta cuando existen más interacciones hidrófobas con la fase oleosa (Acedo-Carrillo *et al.*, 2006).

Cuadro 11. Potencial zeta de las emulsiones registrado a las 24 horas de almacenamiento

| Tratamiento | Potencial zeta |
|---------------------------------|------------------------------|
| ^z O/W _{AMF} | -27.83 ± 0.89 a ^z |
| ^y O/W _{LMF} | -27.93 ± 0.65 a |
| ^x O/W _{MMF} | -28.96 ± 0.74 a |
| ^w O/W _{HMF} | -28.75 ± 0.74 a |

^zAMF: Grasa Láctea Anhidra; ^yLMF: Fracción de bajo punto de fusión; ^xMMF: Fracción de medio punto de fusión; ^wHMF: Fracción de alto punto de fusión. ^v Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes (Tukey p = 0.05).

5.3.4 Micrografías

La morfología y la microestructura de los complejos formados son dependientes de los factores del medio en el que se encuentran (pH, contenido de biopolímeros, fuerza iónica, concentración de iones) y de las condiciones de procesamiento (temperatura, tiempo, tasa de corte) (Dickinson, 2017).

En la Figura 10 se observa que en los diferentes tratamientos a las 24 horas se tiene una mayor agregación de gotas, siendo notorio que en O/W_{HMF} (Figura 10d) hay gotas de mayor tamaño que en los demás tratamientos. Tras el almacenamiento (Figura 10h) para O/W_{HMF} se incrementan visualmente las gotas de menor tamaño, siendo comparables con las obtenidas para O/W_{AMF} y O/W_{LMF}

(Figura 10e,f). En las micrografías tomadas, las gotas mantienen una forma esférica definida, con pocas deformaciones en función del tiempo.

Durante la formación de la emulsión, una consecuencia de la estabilización por materiales de pared como los CS es la posibilidad de producir de manera indistinta gotas amorfas cuando estas se deformen a causa de la aplicación de una tasa de corte que serán capaces de regresar a su forma esférica normal. (Dickinson, 2017).

Turgeon, Schmitt, & Sanchez (2007) reporta que los complejos solubles tienden a reorganizar la interfase por medio de la coalescencia formando un microgel interfacial con baja permeabilidad al aire. De esta manera se podría ofrecer una protección contra la oxidación de grasas y un aumento en la vida de anaquel de la emulsión sin afectar la calidad sensorial de la grasa.

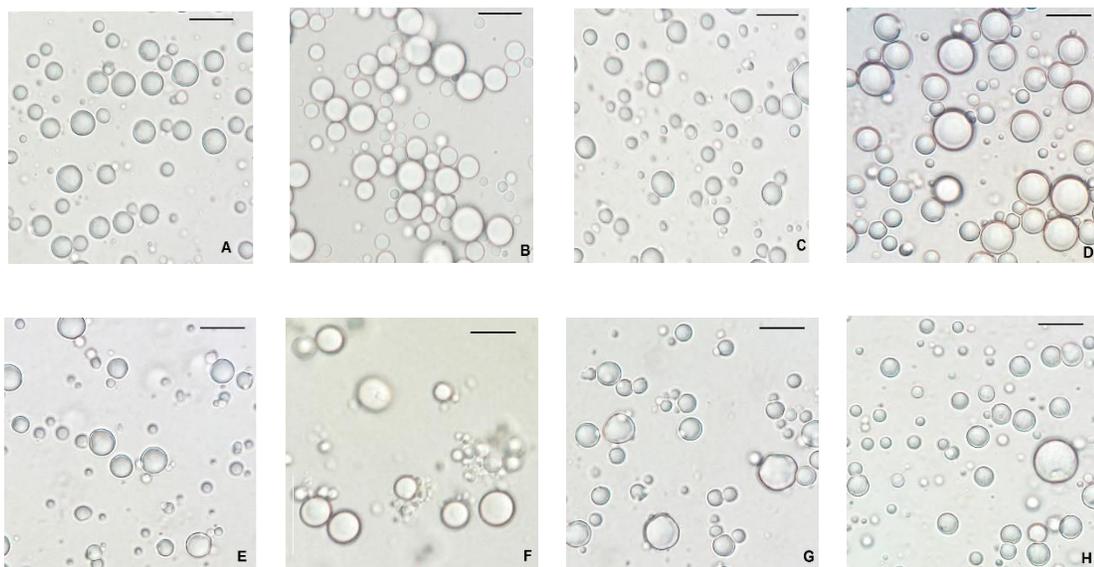


Figura 10. Micrografías (100x) de las emulsiones O/W a las 24 h y 6 días de almacenamiento A, E (O/W_{AMF}); B, F (O/W_{LMF}); C, G (O/W_{MMF}); D, G (O/W_{HMF}), cada una tomada a las 24 h y 6 días de almacenamiento, respectivamente. La barra en negro indica (10 μm).

Por el contenido de ácidos grasos saturados las fracciones de grasa láctea tienden a formar estructuras cristalinas durante el almacenamiento. En general a menor tamaño de gota de grasa menor será su punto de cristalización dado que

el tiempo de nucleación es mayor a menor tamaño de las gotas (Truong *et al.*, 2014). La distribución de tamaño en este trabajo fue amplia (span: 1.68 ± 0.02), por las micrografías obtenidas tras 6 días, las gotas no muestran deformaciones a causa del ordenamiento de las grasas. Confirmando que el tamaño de los CS, forma una protección densa en la superficie de las gotas de grasa almacenadas a 5 °C, sin que la cristalización provoque daños significativos en la estabilización.

5.3.5 Curvas de flujo de las emulsiones O/W

El incremento en la viscosidad está relacionado con el grado de empaquetamiento de las macromoléculas lo cual fortalece la estructura y propicia una mayor resistencia a fluir. La protección interfacial formada por dos o más capas posee una alta elasticidad y resistencia mecánica, evitando la coalescencia y contribuyendo a la viscosidad (Sagis & Scholten, 2014).

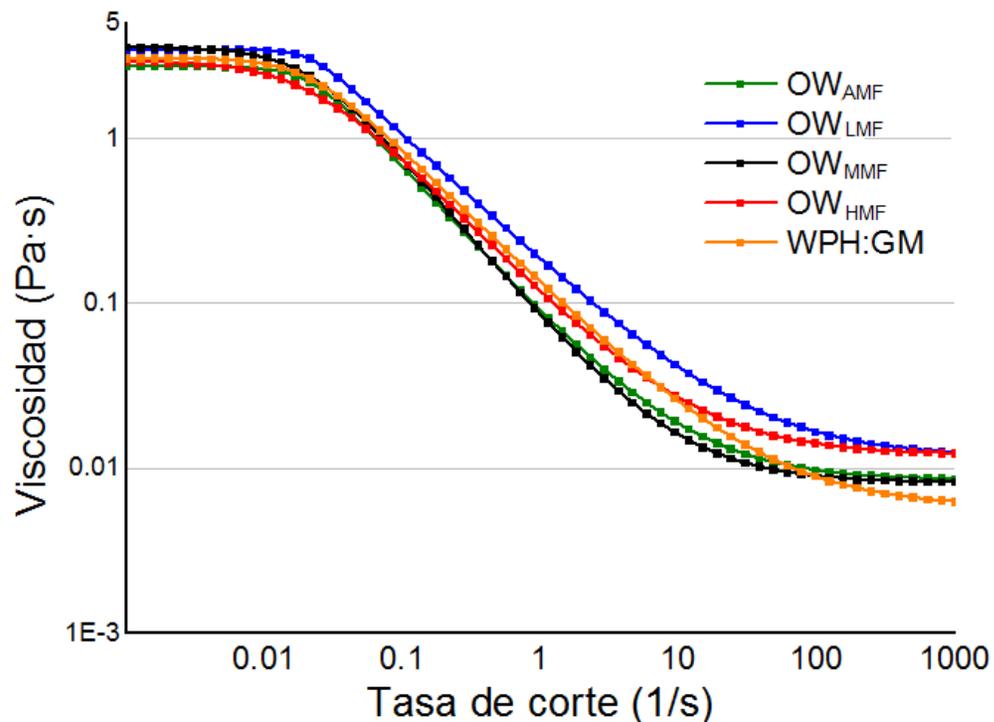


Figura 11. Curvas de flujo de emulsiones estabilizadas con CS ajustadas al modelo de Carreau-Yasuda.

Las curvas de flujo de los tratamientos y la fase dispersa (WPH:GM, 10% p/p y 1:1) fueron ajustadas al modelo Carreau-Yasuda para la determinación de la viscosidad (Figura 11) expresado en la Ecuación 4 (Carrillo-Navas *et al.*, 2012).

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

Este modelo permite describir regiones newtonianas del flujo a bajas y altas tasas de corte por los parámetros η_0 y η_∞ (respectivamente). La relajación de tiempo (λ) identifica la transición de comportamiento reoespesante (shear thickening) a reoadelgazante (shear thinning), por lo que $1/\lambda$ será la velocidad de cizalla crítica en el cual la viscosidad comienza a disminuir. El índice de flujo (n), proveniente del modelo de potencia, permite identificar el tipo de fluido. Y la constante de Yasuda (a) indica la región de transición entre η_0 y la caída potencial (Foegeding, Vardhanabhuti, & Yang, 2011; Somaris, Clemente Granados, & García-Zapateiro, 2017). La calidad de ajuste para los tratamientos fue >98% (Cuadro 12).

Cuadro 12. Parámetros reológicos del modelo Carreau-Yasuda para las emulsiones simples y complejo biopolimérico utilizado

| | ^z O/W _{AMF} | ^y O/W _{LMF} | ^x O/W _{MMF} | ^w O/W _{HMF} | ^v WHP:GM |
|-----------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------|
| D_0 | 2.7 ± 0.83 a ^u | 3.45 ± 0.94 a | 3.56 ± 0.95 a | 2.94 ± 0.88 a | 3.08 ± 0.89 a |
| λ | 47.46 ± 0.002a | 47.45 ± 0.01 a | 47.45 ± 0.001a | 47.46 ± 0.001 a | 47.45 ± 0.01 a |
| n | 0.184 ± 0.002 a | 0.172 ± 0.079 a | 0.149 ± 0.060 a | 0.192 ± 0.066 a | 0.207 ± 0.084 a |
| η_∞^* | 9.8 ± 0.06 ab | 12.0 ± 0.3 a | 8.3 ± 0.2 bc | 11 ± 1.0 a | 5.8 ± 1 c |
| R^2 | 0.98 | 0.99 | 0.98 | 0.99 | 0.99 |

^zAMF: Grasa Láctea Anhidra; ^yLMF: Fracción de bajo punto de fusión; ^xMMF: Fracción de medio punto de fusión; ^wHMF: Fracción de alto punto de fusión, ^vcomplejos biopoliméricos. ^u Medias seguidas con la misma letra en cada fila no son diferentes (Tukey $p = 0.05$). Los parámetros del modelo son: D_0 : Límite de la viscosidad cero; λ : Tiempo de relajación; n : Índice de comportamiento, η_∞ : Viscosidad Infinita; R^2 : Coeficiente de determinación. *Valores por 10^{-3}

La viscosidad lograda en η_∞ (0.0098 a 0.012 Pa*s⁻¹) mayor para O/W_{HMF} y O/W_{LMF} (Cuadro 12), se puede inferir que las gotas de la emulsión están en

estrecha interacción unas con otras (Karlsson, Ipsen, Schrader, & Ardö, 2005), lo cual puede ser comparado con el efecto de desestabilización por floculación. Por el contrario la viscosidad obtenida en η_0 (sin diferencias significativas) para los tratamientos puede indicar que las gotas de emulsiones se mantienen relativamente separadas (Cuadro 12).

Al calcular el tiempo de cizalla crítica a partir del valor λ se obtiene que la transición a fluido no newtoniano es a partir de una tasa de corte de 0.02 s^{-1} para todos los tratamientos. En el trabajo realizado por Santos, Calero, Guerrero, & Muñoz (2015), donde se determinó la viscosidad por el modelo Carreau-Yasuda, mencionan que la transición se relacionó positivamente con la inestabilidad de las emulsiones ante el cremado (a mayor magnitud, mayor resistencia al cremado). Los autores reportan que en emulsiones estabilizadas con complejos de proteína de papa y goma guar, el valor λ se mantuvo entre 1.05×10^{-3} a $8.33 \times 10^{-5} \text{ (s}^{-1}\text{)}$, significando una menor estabilización que la obtenida en este trabajo. Durante el incremento de la velocidad de cizallamiento las moléculas son más sensibles al flujo, aquellas que se alargan con mayor grado en dirección del flujo disminuyen su viscosidad, denominándose fluidos reoadelgazantes cuando el valor de n es <1 (Turgeon *et al.*, 2007), lo cual coincide con los resultados de este trabajo y con otros autores (Hernández-Marín *et al.*, 2013; Jiménez-Alvarado *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2015)

Las propiedades reológicas están relacionadas con las características moleculares de los biopolímeros, su flexibilidad y peso molecular. Algunos factores adicionales son la concentración y la interacción de los complejos solubles con los factores del entorno como el pH, fuerza iónica, presencia de otros componentes o iones (Dickinson, 2011).

Utilizando el modelo de la potencia para la determinación de viscosidad de soluciones al 10% (p/p) de GM, López-Franco *et al.* (2012), reportó el comportamiento como un fluido reoadelgazante (n : 0.90) y coeficiente de

viscosidad (k) de 24.89 mPa. Para este experimento, los complejos solubles utilizados en la interfase suponen una menor protección, en comparación de la formación de multicapas de un mismo biopolímero como GM. Los valores de viscosidad obtenidos son comparables con Jiménez-Alvarado *et al.* (2009), quienes indica que a una velocidad de cizalla de 10 a 100 (s^{-1}) los valores de viscosidad se encuentran entre 0.1 a 0.02 Pa*s en emulsiones múltiples estabilizadas (en la fase O/W) con complejos biopoliméricos WPC:GM. Para los tratamientos de este experimento entre la velocidad de cizalla de 10 a 100 ($1/s$) se tienen valores entre 0.034 ± 0.01 a 0.015 ± 0.01 Pa*s. La menor diferencia puede ser a causa de que en este estudio, se aplican velocidades de corte desde 0.001 (s^{-1}), con lo cual se somete a las emulsiones a una mayor deformación. En emulsiones múltiples con D(3,2) entre 2.7 y 3 μm estabilizadas con complejos biopoliméricos de WPC:CMC, se obtuvieron valores de viscosidad cercanos a 0.04 Pa*s (Hernández-Marín *et al.*, 2013). El tamaño de partícula del anterior trabajo se asemeja al obtenido para las O/W de este trabajo sin embargo la viscosidad fue mayor en los tratamientos en los que se utilizó grasa láctea o sus fracciones. Esto puede ser a causa a las condiciones del medio (pH, concentración de biopolímeros utilizados) y que la fase oleosa está compuesta de ácidos grasos saturados que presentan un mayor ordenamiento, induciendo un incremento en la resistencia a fluir. La utilización de fracciones de grasa láctea puede mejorar la viscosidad aun cuando la GM que la recubre no es lo suficientemente viscosa como la CMC.

La viscosidad de la emulsión puede estar afectada por el contenido de sólidos en la interfase, por el tipo de aceite y el tamaño de las gotas (Gohtani & Yoshii, 2018) donde a menor tamaño de partícula y menor adición de ácidos grasos insaturados la viscosidad es mayor.

5.3.6 Propiedades mecánicas de las emulsiones O/W

El comportamiento viscoelástico de las emulsiones cuando son sometidas a la deformación, puede ser caracterizado mediante los módulos de almacenamiento

(G') y de pérdida (G'') (Figura. 12). El módulo de almacenamiento se relaciona con comportamiento elástico de las emulsiones en función de la deformación. El tratamiento con O/W_{HMF} presentó la mayor elasticidad. Para el resto de los tratamientos el comportamiento elástico es similar ($O/W_{LMF} = O/W_{AMF} = O/W_{MMF}$) (Tabla 13). Esta tendencia coincide con el diámetro volumetrico-superficial medio obtenido a las 24 horas de almacenamiento, donde O/W_{HMF} presenta el mayor diámetro ($3.15 \mu\text{m}$) diferenciado con aquellos de menor punto de fusión (Cuadro 10).

Cuadro 13. Parámetros reológicos en la regiones viscoelástica lineal y no lineal, y deformación de cambio de comportamiento reológico ($\text{Tan } \delta = 1$)

| Código de la emulsión | Región Viscoelástica Lineal (RVL) | | | Inicio de región viscoelástica no lineal | | Deformación $\text{Tan } \delta = 1$ |
|-----------------------|-----------------------------------|----------------------------|------------------------------------|--|---------------------------|--------------------------------------|
| | G' (Pa) | G'' (Pa) | $\text{Tan } \delta \cdot 10^{-2}$ | % | G' (Pa) | % deformación |
| ^Z AMF | $2.5 \pm 0.6 \text{ b}^{\vee}$ | $0.55 \pm 0.03 \text{ d}$ | $22.0 \pm 0.3 \text{ c}$ | $0.316 \pm 0.15 \text{ b}$ | $2.83 \pm 0.26 \text{ b}$ | $1.60 \pm 0.14 \text{ c}$ |
| ^Y LMF | $2.1 \pm 0.5 \text{ b}$ | $1.20 \pm 0.06 \text{ a}$ | $55.2 \pm 0.1 \text{ a}$ | $0.501 \pm 0.21 \text{ a}$ | $2.13 \pm 0.72 \text{ d}$ | $0.80 \pm 0.25 \text{ d}$ |
| ^X MMF | $2.7 \pm 0.4 \text{ b}$ | $0.84 \pm 0.040 \text{ b}$ | $30.4 \pm 0.2 \text{ b}$ | $0.501 \pm 0.19 \text{ a}$ | $2.68 \pm 0.06 \text{ c}$ | $2.51 \pm 0.31 \text{ b}$ |
| ^W HMF | $3.7 \pm 0.3 \text{ a}$ | $0.69 \pm 0.03 \text{ c}$ | $18.1 \pm 0.4 \text{ d}$ | $0.316 \pm 0.27 \text{ b}$ | $4.23 \pm 0.32 \text{ A}$ | $7.9 \pm 2.8 \text{ a}$ |

^ZAMF: Grasa Láctea Anhidra; ^YLMF: Fracción de bajo punto de fusión; ^XMMF: Fracción de medio punto de fusión; ^WHMF: Fracción de alto punto de fusión. [∨]Medias seguidas con la misma letra en cada columna no son diferentes (Tukey $p = 0.05$).

El comportamiento viscoso relacionado con los valores de G'' , presentaron una tendencia similar que G' (Cuadro 13) donde $O/W_{HMF} > O/W_{MMF} = O/W_{AMF} = O/W_{LMF}$. Para ambos casos la presencia de los ácidos grasos insaturados tiene una relación negativa con el comportamiento viscoelástico; a menor contenido de ácidos grasos insaturados es mayor el valor de G' y G'' . En los tratamientos predominó el comportamiento elástico a bajas deformaciones donde los valores de $\text{Tan } \delta$ son menores a la unidad (Cuadro 13). El factor de cedencia de O/W_{AMF} fue alcanzando a bajas deformaciones (cerca de 3.16 %). Por parte

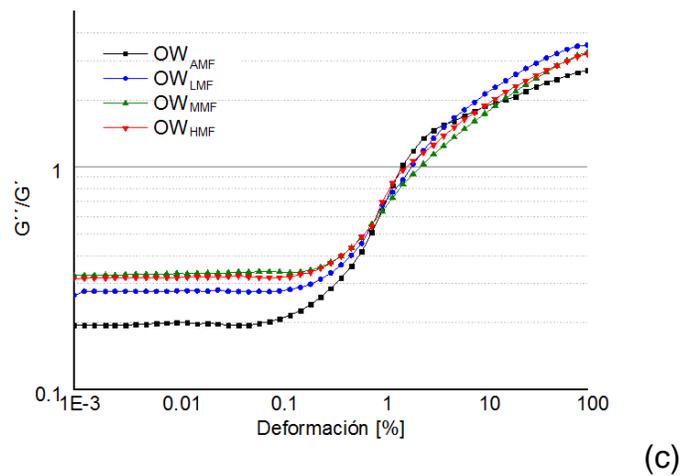
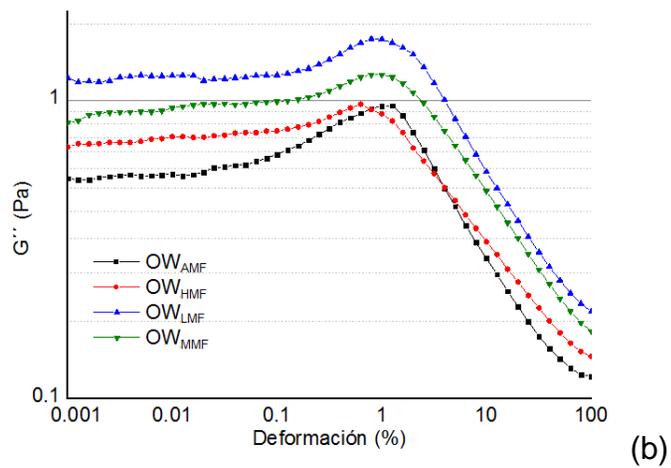
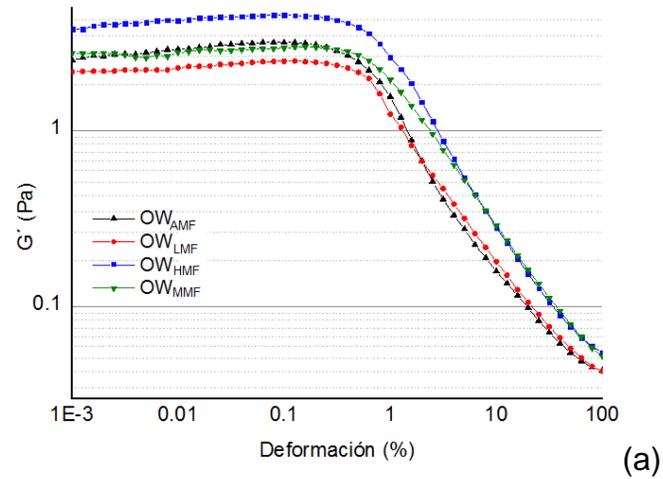


Figura 12. Variación de los módulos G' (a), G'' (b) y G''/G' (c) de las emulsiones O/W con diferentes fracciones de grasa láctea y AMF con complejos solubles WPH:GM (1:1, al 10% p/p) durante el barrido de deformación

de los tratamientos que utilizaron fracciones de grasa láctea se observó que a menor punto de fusión, mayor es la deformación necesaria para que $\tan \delta = 1$ (Cuadro 13).

En la Figura 12 a) y b) se observa el comportamiento de G' y G'' en función de la deformación para los tratamientos evaluados. De manera individual las curvas para G' mantienen una región con valores constantes a bajas deformaciones, identificándola como la región viscoelástica lineal (Cuadro 13), donde los cambios estructurales son revertidos por el tipo de materiales en la fase acuosa (Castel, Rubiolo & Carrara., 2017). El descenso pronunciado en los valores de G' indica que OW_AMF y OW_HMF así como OW_LMF y OW_MMF tienen comportamiento semejante entre sí (Cuadro 13). La caída del comportamiento elástico indica que el daño entre los enlaces de las moléculas que conforman a la muestra, rebasa el tiempo de reestructuración (Hernández-Marín *et al.*, 2013).

5.4 Conclusiones

La funcionalidad de las emulsiones está ligada a los componentes que le confieren estabilidad, al tamaño y a las propiedades reológicas. El empleo de complejos solubles, formados por WPH:GM (pH 3.5, 10% p/p, 1:1), como emulsificantes/estabilizantes permitió la estabilización hasta por 6 días de emulsiones O/W con 3 tipos de grasa láctea con distinto punto de fusión (HMF, MMF y LMF). El WPH mantuvo la capacidad de promover la formación y estabilización de las emulsiones mediante su acción interfacial, mientras que la GM inmovilizó la fase continúa al aumentar el impedimento estérico entre gotas.

Las emulsiones con fracciones de grasa y AMF mantuvieron una similar tasa de coalescencia durante las primeras 24 horas de almacenamiento ($5 \pm 1^\circ\text{C}$). El $D(3,2)$ para OW_HMF se mantuvo sin cambios significativos, a diferencia de aquellos con fracciones de LMF, MMF y AMF que presentaron una tendencia de reducción del diámetro superficial en función del tiempo.

La morfología de las gotas de AMF y sus fracciones, no muestran deformaciones a causa del ordenamiento de las grasas, por la temperatura de almacenamiento ($5 \pm 1^\circ\text{C}$) que induce el ordenamiento cristalino de la fase oleosa.

La capa de complejos solubles en la interfase de las gotas de grasa mantuvo el potencial zeta negativo con valores comparables entre emulsiones con grasa láctea de diferente punto de fusión.

El modelo Carreau-Yasuda confirma el comportamiento como fluido reoadelgazante, en todos los tratamientos y de en la fase acuosa, con la misma tendencia a fluir en función de la deformación. La protección interfacial formada por los complejos solubles posee una baja resistencia mecánica. El factor de cedencia fue significativamente mayor para el tratamiento con LMF, seguido por los valores similares de MMF y AMF y con menor valor aquellos con HMF. La transición de comportamiento elástico a viscoso ($\text{Tan } \delta = 1$) fue significativamente menor para O/W_{AMF} que para aquellas emulsiones con fracciones de grasa láctea.

Los complejos solubles elaborados con WPH:GM son una opción viable para la sustitución de surfactantes/estabilizantes sintéticos en los que es necesario estabilizar eficientemente lípidos saturados, como lo es la grasa láctea o sus fracciones.

5.5 Referencias

- Acedo-Carrillo, J. I., Rosas-Durazo, A., Herrera-Urbina, R., Rinaudo, M., Goycoolea, F. M., & Valdez, M. A. (2006). Zeta potential and drop growth of oil in water emulsions stabilized with mesquite gum. *Carbohydrate Polymers*, 65(3), 327–336. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.01.016>
- Amit, K., & Bandyopadhyay, P. (2012). *Polysaccharide-Protein Interactions and Their Relevance in Food Colloids*. <https://doi.org/10.5772/50561>
- Anihouvi, P. P., Blecker, C., Dombree, A., & Danthine, S. (2013). Comparative Study of Thermal and Structural Behavior of Four Industrial Lauric Fats. *Food and Bioprocess Technology*, 6(12), 3381–3391.

<https://doi.org/10.1007/s11947-012-0980-9>

- Appelqvist, I. A. M., Golding, M., Vreeker, R., & Zuidam, N. J. (2007). Emulsions as Delivery Systems in Foods. In *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems* (pp. 41–81). Blackwell Publishing.
<https://doi.org/10.1002/9780470277881.ch3>
- Arditty, S., Schmitt, V., Giermanska-Kahn, J., & Leal-Calderon, F. (2004). Materials based on solid-stabilized emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275(2), 659–664.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.03.001>
- Carrillo-Navas, H., Cruz-Olivares, J., Varela-Guerrero, V., Alamilla-Beltrán, L., Vernon-Carter, E. J., & Pérez-Alonso, C. (2012). Rheological properties of a double emulsion nutraceutical system incorporating chia essential oil and ascorbic acid stabilized by carbohydrate polymer–protein blends. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 1231–1235.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.09.005>
- Castel, V., Rubiolo, A., & Carrara, C. (2017). Droplet size distribution, rheological behaviour and stability of corn oil emulsions. *Food Hydrocolloids*, 63, 170–177.
- Cuevas-Bernardino, J. C., Leyva-Gutierrez, F. M. A., Vernon-Carter, E. J., Lobato-Calleros, C., Román-Guerrero, A., & Davidov-Pardo, G. (2017). Formation of biopolymer complexes composed of pea protein and mesquite gum – Impact of quercetin addition on their physical and chemical stability. *Food Hydrocolloids*.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.11.015>
- Dickinson, E. (2006). *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques, 2nd edition*, Julian McClements. CRC Press, Boca Raton, FL (2005), pp. 609. *Food Hydrocolloids* (Vol. 20). <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.05.001>
- Dickinson, E. (2017). Biopolymer-based particles as stabilizing agents for emulsions and foams. *Food Hydrocolloids*, 68, 219–231.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.024>

- Evans, M., Ratcliffe, I., & Williams, P. A. (2013). Emulsion stabilisation using polysaccharide–protein complexes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 18(4), 272–282. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.04.004>
- Girard, M., Turgeon, S. L., & Paquin, P. (2002). Emulsifying Properties of Whey Protein-Carboxymethylcellulose Complexes. *Journal of Food Science*, 67(1), 113–119. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb11369.x>
- Gohtani, S., & Yoshii, H. (2018). 6 - Microstructure, composition, and their relationship with emulsion stability A2 - Devahastin, Sakamon BT - Food Microstructure and Its Relationship with Quality and Stability. In *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* (pp. 97–122). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100764-8.00006-X>
- Hernández-Marín, N. Y., Lobato-Calleros, C., & Vernon-Carter, E. J. (2013). Stability and rheology of water-in-oil-in-water multiple emulsions made with protein-polysaccharide soluble complexes. *Journal of Food Engineering*, 119(2), 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.05.039>
- Jiménez-Alvarado, R., Beristain, C. I., Medina-Torres, L., Román-Guerrero, A., & Vernon-Carter, E. J. (2009). Ferrous bisglycinate content and release in W1/O/W2 multiple emulsions stabilized by protein–polysaccharide complexes. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2425–2433. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.06.022>
- Jones, O. G., Lesmes, U., Dubin, P., & McClements, D. (2010). *Effect of polysaccharide charge on formation and properties of polymer nanoparticles created by heat treatment. Food Hydrocolloids - FOOD HYDROCOLLOID* (Vol. 24). <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.11.003>
- Karlsson, A. O., Ipsen, R., Schrader, K., & Ardö, Y. (2005). Relationship Between Physical Properties of Casein Micelles and Rheology of Skim Milk Concentrate. *Journal of Dairy Science*, 88(11), 3784–3797.
- Kilara, A., & Vaghela, M. N. (2004). 4 - Whey proteins A2 - Yada, R.Y. BT -

- Proteins in Food Processing. In *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* (pp. 72–99). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9781855738379.1.72>
- Koupantsis, T., & Kiosseoglou, V. (2009). Whey protein–carboxymethylcellulose interaction in solution and in oil-in-water emulsion systems. Effect on emulsion stability. *Food Hydrocolloids*, 23(4), 1156–1163. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.09.004>
- Leal-Calderon, F., Bibette, J., & Schmitt, V. (2007a). Double Emulsions BT - Emulsion Science: Basic Principles. In F. Leal-Calderon, J. Bibette, & V. Schmitt (Eds.) (pp. 173–199). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-39683-5_7
- López-Franco, Y. L., Córdova-Moreno, R. E., Goycoolea, F. M., Valdez, M. A., Juárez-Onofre, J., & Lizardi-Mendoza, J. (2012). Classification and physicochemical characterization of mesquite gum (*Prosopis* spp.). *Food Hydrocolloids*, 26(1), 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.05.006>
- Lopez, C., & Ollivon, M. (2009). Triglycerides obtained by dry fractionation of milk fat: 2. Thermal properties and polymorphic evolutions on heating. *Chemistry and Physics of Lipids*, 159(1), 1–12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2009.02.009>
- Marangoni, A. G. (2002). *The Functionality of Milk Fat Fractions in Confectionery and Plastic Fats*. <https://doi.org/10.1201/9781420010169.ch9>
- Murphy, R. W., Farkas, B. E., & Jones, O. G. (2016). Dynamic and viscoelastic interfacial behavior of β -lactoglobulin microgels of varying sizes at fluid interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 466(Supplement C), 12–19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.12.012>
- Nushtaeva, A. V. (2016). Natural food-grade solid particles for emulsion stabilization. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 504(Supplement C), 449–457. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.05.084>

- Palmquist, D. L. (2006). Milk Fat: Origin of Fatty Acids and Influence of Nutritional Factors Thereon BT - Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids. In P. F. Fox & P. L. H. McSweeney (Eds.) (pp. 43–92). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/0-387-28813-9_2
- Ruíz-Ramos, J. O., Pérez-Orozco, J. P., Báez-González, J. G., Bósquez-Molina, E., Pérez-Alonso, C., & Vernon-Carter, E. J. (2006). Interrelationship between the viscoelastic properties and effective moisture diffusivity of emulsions with the water vapor permeability of edible films stabilized by mesquite gum–chitosan complexes. *Carbohydrate Polymers*, *64*(2), 355–363. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.12.020>
- Sagis, L. M. C., & Scholten, E. (2014). Complex interfaces in food: Structure and mechanical properties. *Trends in Food Science & Technology*, *37*(1), 59–71. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.02.009>
- Santos, J., Calero, N., Guerrero, A., & Muñoz, J. (2015). Relationship of rheological and microstructural properties with physical stability of potato protein-based emulsions stabilized by guar gum. *Food Hydrocolloids*, *44*, 109–114. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.09.025>
- Sherman, P. (1968). *Emulsion science*. London ; New York : Academic Press. Retrieved from <http://lib.ugent.be/catalog/rug01:001669530>
- Sichien, M., Thienpont, N., Fredrick, E., Trung Le, T., Van Camp, J., & Dewettinck, K. (2009). 4 - Processing means for milk fat fractionation and production of functional compounds A2 - Corredig, Milena BT - Dairy-Derived Ingredients. In *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* (pp. 68–102). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845697198.1.68>
- Somaris, E., Clemente Granados, Q., & García-Zapateiro, L. A. (2017). Propiedades Reológicas de la Pulpa de Papaya (Carga papaya). *Información Tecnológica*, *28*(4), 11–16. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000400003>
- Turgeon, S. L., Schmitt, C., & Sanchez, C. (2007). Protein–polysaccharide

- complexes and coacervates. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 12(4), 166–178. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cocis.2007.07.007>
- Turgeon, & Laneuville, S. I. (2009). CHAPTER 11 - Protein + Polysaccharide Coacervates and Complexes: From Scientific Background to their Application as Functional Ingredients in Food Products. In S. Kasapis, I. T. Norton, & J. B. B. T.-M. B. S. Ubbink (Eds.) (pp. 327–363). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374195-0.00011-2>
- Vernon-Carter, E. J., Beristain, C. I., & Pedroza-Islas, R. (2000). Mesquite gum (Prosopis gum). In G. Doxastakis & V. B. T.-D. in F. S. Kiosseoglou (Eds.), *Novel Macromolecules in Food Systems* (Vol. 41, pp. 217–238). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0167-4501\(00\)80011-4](https://doi.org/10.1016/S0167-4501(00)80011-4)
- Vernon-Carter, E. J., Pedroza- Islas, R., & Beristain, C. I. (1998). STABILITY OF CAPSICUM ANNUUM OLEORESIN-IN-WATER EMULSIONS CONTAINING PROSOPIS AND ACACIA GUMS. *Journal of Texture Studies*, 29(5), 553–567. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.1998.tb00183.x>
- Williams, P. A., & Phillips, G. O. (2009). 1 - Introduction to food hydrocolloids. In G. O. Phillips & P. A. B. T.-H. of H. (Second E. Williams (Eds.), *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* (pp. 1–22). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845695873.1>
- Yella Reddy, S. (2010). Improving Plasticity of Milk Fat for Use in Baking by Fractionation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(5), 493–497. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1520-2>