

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa



**ESTUDIO DEL EFECTO DE COMPLEJOS
BIOPOLIMÉRICOS EN LA ESTABILIZACIÓN Y
PROPIEDADES FUNCIONALES DE EMULSIONES
MÚLTIPLES CONTENIENDO HIERRO BIGLICINADO**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA
PRESENTA:
RUBÉN JIMÉNEZ ALVARADO

Director
Dr. E. Jaime Vernon Carter

México, D.F.

Febrero de 2010

ÍNDICE

	Pág.
1. Resumen	1
2. Abstract	4
3. Introducción	7
4. Antecedentes	12
4.1. Hierro y su importancia bioquímica	12
4.1.1. Hierro biglicinado	13
4.2. Emulsiones múltiples $W_1/O/W_2$	16
4.2.1. Estabilidad de emulsiones múltiples	17
4.2.1.1. Estabilidad por efectos estéricos	20
4.2.1.1.1. Biopolímeros	22
a). Goma de mezquite	22
b). Goma arábica	24
c). Pectinas	25
4.2.1.1.2. Complejos biopoliméricos	25
4.2.1.2. Estabilidad por efectos electrostáticos	27
4.2.1.2.1. Tensoactivos	28
4.2.1.2.2. Balance hidrófilo lipófilo	30
4.2.2. Cinéticas de liberación en emulsiones $W_1/O/W_2$	31
4.3. Reología	33
5. Justificación	38
6. Objetivos	39
6.1. Objetivo general	39

6.2.Objetivos particulares	39
7. Hipótesis	40
8. Materiales y métodos	41
8.1. Materiales	41
8.2.Preparación de las emulsiones	42
8.2.1. Formulación de la emulsión primaria (W_1/O)	42
8.2.1.1.Tasa de coalescencia de emulsiones ($(W_1/O)_{x,y}$)	43
8.2.2. Condiciones para la formulación de las emulsiones múltiples $W_1/O/W_2$	43
8.2.2.1.Determinación de potencial zeta	44
8.2.2.2.Acomplejamiento proteína:polisacárido, rendimiento de coacervado y diámetro z-promedio	44
8.2.2.3.Composición de los complejos proteína:polisacárido	45
8.2.2.4.Formulación de emulsiones múltiples ($(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$)	46
8.2.2.5.Tasa de coalescencia de las emulsiones múltiples ($(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$)	46
8.2.3. Efecto protector de las emulsiones ($(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$) contra la oxidación del hierro biglicinado	47
8.2.3.1. Rendimiento de encapsulación y cinéticas de liberación	47
8.2.4. Reología de las emulsiones múltiples ($(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$)	48
8.2.5. Análisis estadístico	49
9. Resultados y discusión	50
9.1. Caracterización de la emulsión primaria ($(W_1/O)_{x,y}$)	50
9.2. Efecto del pH, concentración, y proporción de biopolímeros sobre el rendimiento de coacervado	52

9.3. Caracterización de las emulsiones múltiples $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$	57
9.4. Efecto protector de las emulsiones múltiples $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ contra la oxidación del hierro biglicinado	59
9.5. Rendimiento de encapsulación y cinéticas de liberación	63
9.6. Reología de las emulsiones múltiples $W_1/O/W_2)_{a,b,c}$	65
10. Conclusiones	73
11. Perspectivas	75
12. Referencias	77
13. Anexos	83
13.1. Artículo: Ferrous bisglycinate content and release in $W_1/O/W_2$ multiple emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes	83
13.2. Potencial zeta	84
13.3. Cambio en el diámetro volumétrico medio ($d_{3,0}$) de las emulsiones primarias a diferentes concentraciones totales de tensoactivo	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Título de la Figura	Pág.
Figura 1. Dibujo del hierro biglicinado para representar correctamente la orientación de los enlaces de O, N, C y el metal y la orientación tetraédrica resultante de las dos estructuras de anillo del ligando. La figura está basada en espectrometría de difracción de rayos x de cristales puros de hierro biglicinado (Ashmead, 2001).	14
Figura 2. Formación del hierro biglicinado a partir de dos ligandos de glicina y un átomo de ión ferroso (Fe^{2+}).	15
Figura 3. Esquema de una emulsión múltiple $W_1/O/W_2$.	17
Figura 4. Representación global de la variedad de posibles vías de desestabilización para emulsiones W/O/W: (a), coalescencia de los glóbulos de aceite; (b) a (e), expulsión secuencial de gotas internas individuales; (f), (g), expulsión múltiple de gotas internas; (h) a (k), coalescencia y expulsión de las gotas internas; (l) a (n) disminución de tamaño de las gotas internas; (o) a (q), incremento de tamaño y expulsión de las gotas internas (Dickinson y McClements, 1995).	18
Figura 5. Representación esquemática de diferentes tipos de macromoléculas protuberantes (Walstra, 1993).	20
Figura 6. Representación esquemática de los mecanismos de estabilización estérica por moléculas protuberantes: restricción de volumen (izquierda) y mezclado (derecha) (Walstra, 1993).	21
Figura 7. Curva maestra para los módulos de almacenamiento y de pérdida en el dominio de la frecuencia (Medina-Torres, 2005).	35
Figura 8. Cambio en el diámetro volumétrico medio ($d_{3,0}$) de las emulsiones primarias: $(W_1/O)_{10\%,9:1}$ (\diamond); $(W_1/O)_{10\%,8:2}$ (\bullet); $(W_1/O)_{10\%,7:3}$ (Δ); $(W_1/O)_{10\%,6:4}$ (\blacktriangledown); y $(W_1/O)_{10\%,5:5}$ (\blacksquare) en el tiempo.	50
Figura 9. Potencial zeta en función del pH para las soluciones de biopolímeros: (\circ) WPC; (\blacklozenge) GA; (\blacktriangle) MG; y (\bullet) LMP.	52
Figura 10. Rendimiento de coacervado en función del pH y la concentración total de biopolímeros para los sistemas binarios: a) WPC:GA; b) WPC:MG; y c) WPC:LMP.	53

Figura 11. Rendimiento de coacervado basado en la proporción entre biopolímeros y la concentración total de WPC:MG a pH 3.5 en la fase acuosa externa de las emulsiones múltiples.	56
Figura 12. Micrograffias de la emulsión múltiple $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:MG}$ conteniendo hierro biglicinado: a) inmediatamente después de haber sido preparada, b) después de 2 días de almacenamiento, y c) después de 20 días de almacenamiento.	58
Figura 13. Cambio en el diámetro volumétrico medio ($d_{3,0}$) de las emulsiones múltiples: $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:GA}$ (◆), $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:MG}$ (▲), y $(W_1/O/W_2)_{0.7\%,2:1,WPC:LMP}$ (●) en el tiempo.	59
Figura 14. Datos experimentales y predichos teóricamente, usando el modelo de Higuchi (líneas discontinuas), de la liberación de hierro biglicinado de W_1 a W_2 en las emulsiones múltiples: $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:GA}$ (.....;◆), $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:MG}$ (- - ;▲), y $(W_1/O/W_2)_{0.7\%,2:1,WPC:LMP}$ (— —;●) en el tiempo.	64
Figura 15. Viscosidad en función de la velocidad de cizalla de las emulsiones múltiples frescas y después de 7 días de almacenamiento: a) $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:MG}$; b) $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:GA}$, y c) $(W_1/O/W_2)_{0.7\%,2:1,WPC:LMP}$.	67
Figura 16. Comportamiento reológico de la emulsión múltiple en función del tipo de polisacárido usado en la formación del complejo biopolimérico.	68
Figura 17. Aplicación de la regla de Cox-Merz para la emulsión $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:GA}$ recién preparada (a); y después de 7 días de almacenamiento (b).	70
Figura 18. Aplicación de la regla de Cox-Merz para la emulsión $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:GM}$ recién preparada (a); y después de 7 días de almacenamiento (b).	71
Figura 19. Aplicación de la regla de Cox-Merz para la emulsión $(W_1/O/W_2)_{0.7\%,2:1,WPC:LMP}$ recién preparada (a); y después de 7 días de almacenamiento (b).	72
Figura 20. Esquema que muestra el modelo de la doble capa.	85
Figura 21. Localización del potencial Zeta dentro de la doble capa.	86

ÍNDICE DE TABLAS

Título de la Tabla	Pág.
Tabla 1. Requerimientos dietéticos recomendados para el hierro.	12
Tabla 2. Clasificación de tensoactivos usados en alimentos.	29
Tabla 3. Tensoactivos empleados en la industria alimentaria.	31
Tabla 4. Modelos usados para describir cinéticas de liberación.	32
Tabla 5. Tasas de coalescencia ($K_{C(W_1/O)_x,y}$) de las emulsiones primarias $(W_1/O)_{x,y}$. El subíndice x denota la concentración total de tensoactivos y el subíndice y denota la proporción entre tensoactivos (OS:WS).	51
Tabla 6. Tamaño de gota a tiempo cero y $K_{C(W_1/O/W_2)_{a,b,c}}$ de las emulsiones múltiples $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ después de 20 días de almacenamiento.	59
Tabla 7. Variación de la cantidad de Fe^{2+} y Fe^{3+} en el tiempo, rendimiento de encapsulación para las emulsiones múltiples $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$, y pérdida de hierro total en W_1 después de 480 h de almacenamiento.	61
Tabla 8. Diámetro Z-promedio de los complejos Pr:Ps.	62
Tabla 9. Parámetros cinéticos de liberación para hierro biglicinado desde W_1 hacia W_2 en las emulsiones múltiples $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ durante las primeras 24 h y después de 24 h de almacenamiento para cada modelo cinético probado.	62

1. RESUMEN

Considerando la importancia que tiene el hierro en la biosíntesis de moléculas vitales (hemoglobina, miohemoglobina, enzimas metabólicas, etc.), hay una tendencia creciente a enriquecer la dieta con hierro. Entre las fuentes de hierro utilizadas, el hierro biglicinado tiene mejor potencial como fortificante para alimentos debido a su nivel de absorción en el intestino, y que esta absorción no se ve disminuida por precipitación ni por su unión con otras moléculas. Sin embargo, el hierro biglicinado aumenta en mayor grado la oxidación de ácidos grasos insaturados en comparación con otros fortificantes. Otro inconveniente es su inestabilidad, debido a que es oxidado a su forma férrica. Dicho inconveniente puede ser atenuado mediante su encapsulación en una emulsión. Por ese motivo, en este trabajo se entrampó una solución acuosa de hierro biglicinado en la fase acuosa interna (W_1) de una emulsión múltiple ($W_1/O/W_2$).

Se formuló una emulsión primaria (W_1/O) la cual contuvo 15% (p/p) de hierro biglicinado, equivalente a una fracción másica de fase dispersa (ϕ) de 0.5 constituida por una solución acuosa de hierro biglicinado al 30% de sólidos. Se seleccionaron los tensoactivos adecuados para estabilizar a la emulsión W_1/O en base al valor de su balance hidrófilo lipófilo (HLB), y se determinó la concentración y proporción de tensoactivos más adecuados para estabilizar a la emulsión W_1/O , encontrándose que la emulsión W_1/O más estable fue la estabilizada con una mezcla de Grindsted PGPR 90:Panodan SDK (proporción 6:4) con una concentración total de tensoactivos de 10% (p/p). La emulsión primaria fue reemulsificada para preparar la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$, la cual contuvo una fracción másica de fase dispersa de 0.2.

Se establecieron los valores de pH a los cuales existía interacción electrostática entre la proteína (concentrado de proteína de suero de leche (WPC)) y los polisacáridos probados (goma arábiga (GA), goma de mezquite (MG), y pectina de bajo metoxilo (LMP)) para

formar complejos biopoliméricos. Se encontró que hay un valor de pH donde existe la máxima diferencia estequiométrica de cargas electrostáticas entre proteína y polisacárido (pH_E), y que este valor de pH coincide con el pH al cual se obtuvo el máximo rendimiento de coacervado (pH_C) para cada complejo proteína:polisacárido (Pr:Ps) probado, siendo igual a 3 para el sistema binario WPC:GA, 3.5 para el sistema WPC:MG, y 3.0 para el sistema WPC:LMP.

Se evaluaron diferentes concentraciones y proporciones entre biopolímeros en solución acuosa para determinar cuáles producían el mayor rendimiento de coacervado. Se encontró que una proporción Pr:Ps igual a 2:1 produjo el mayor rendimiento de coacervado para los tres sistemas binarios. La concentración total de biopolímeros a la cual se obtuvo el máximo rendimiento de coacervado varió para cada sistema binario, encontrándose que era necesaria una concentración total de biopolímeros de 5% (p/p), para los sistemas WPC:GA y WPC:MG, y de 0.7% (p/p) para el sistema WPC:LMP.

Se formularon emulsiones $W_1/O/W_2$ en base a los resultados obtenidos de interacción entre biopolímeros y rendimiento de coacervado. Se determinaron las cinéticas de coalescencia de las emulsiones múltiples, siguiendo el cambio en el tamaño de partícula ($d_{3,0}$) en el tiempo, encontrándose que la emulsión $W_1/O/W_2$ estabilizada con WPC:MG presentó tamaños de gota más pequeños ($2.05 \mu m$), y menor tasa de coalescencia ($7.09 \times 10^{-7} s^{-1}$).

Se evaluó el efecto protector de las emulsiones múltiples contra la oxidación del hierro biglicinado, encontrándose una mejor protección contra la oxidación del hierro biglicinado ($29.75\% Fe^{3+}$) proporcionada por la emulsión $W_1/O/W_2$ estabilizada con WPC:MG.

Se determinaron las cinéticas de liberación de hierro biglicinado desde W_1 hacia W_2 en las emulsiones múltiples, y los datos experimentales fueron ajustados a siete diferentes modelos cinéticos de liberación, siendo el modelo de Higuchi el que mejor ajustó a los datos experimentales. Se encontró una tasa de liberación de hierro biglicinado más lenta desde W_1

hacia W_2 ($K_H = 0.69 \text{ mg mL}^{-1} \text{ min}^{-0.5}$ en las primeras 24 horas y $K_H = 0.07 \text{ mg mL}^{-1} \text{ min}^{-0.5}$ para los siguientes 19 días de almacenamiento, siendo K_H la constante cinética de liberación del modelo de Higuchi) en la emulsión múltiple estabilizada con WPC:MG.

Se evaluaron las propiedades reológicas de las emulsiones múltiples $W_1/O/W_2$ encontrándose que todas las emulsiones presentaron un comportamiento reoadelgazante, y que la emulsión estabilizada con el sistema binario WPC:LMP presentó un carácter más elástico ($G' > G''$) lo cual dio como resultado una emulsión con mayor tamaño de partícula y mayor polidispersidad debido a que ofreció mayor dificultad para la redispersión de la emulsión primaria, siendo por consecuencia menos estable.

Se obtuvieron mejores resultados en cuanto a eficiencia de encapsulación, protección contra la oxidación, y tasas de liberación más lentas de hierro biglicinado conforme aumentó el peso molecular del polisacárido que formó al complejo proteína:polisacárido.

De acuerdo a estos resultados, el factor que probablemente afectó en mayor medida la funcionalidad global de las emulsiones múltiples fue el grosor del complejo adsorbido alrededor de las gotas de aceite en las emulsiones $W_1/O/W_2$. Dicho grosor fue determinado indirectamente midiendo el diámetro z-promedio de los complejos, resultando que el valor mayor (529.4 nm) fue encontrado para el complejo WPC:MG.

2. ABSTRACT

A boost in the use of iron as food fortificant has occurred recently due to its importance in the biosynthesis of vital molecules (hemoglobin, miohemoglobin, metabolic enzymes, among others). Ferrous bisglycinate has a higher potential as fortificant, among the diverse sources of iron, because of its high bioavailability and absorption through the intestine are not limited by precipitation or by interaction with other molecules. Nevertheless, compared with other fortificants, ferrous bisglycinate increases markedly the oxidation of unsaturated fatty acids. Another disadvantage is its instability against oxidation. This disadvantage can be diminished through its encapsulation within an emulsion. Thus, a ferrous bisglycinate aqueous solution was entrapped in the inner phase (W_1) of water-in-oil-in-water ($W_1/O/W_2$) multiple emulsions.

A ferrous bisglycinate aqueous solution-in-mineral oil (W_1/O) emulsion containing 15% (w/w) ferrous bisglycinate and a dispersed phase mass fraction of 0.5 was formulated. Based on the hydrophilic-lipophilic balance (HLB) the most appropriate surfactants were selected for the stabilization of the W_1/O emulsion. The concentration and ratio between surfactants were determined, finding that the W_1/O emulsion was best stabilized with a mixture of Grindsted PGPR 90:Panodan SDK (6:4 ratio) with a total emulsifiers concentration of 10% (w/w). This primary emulsion was re-emulsified in order to prepare $W_1/O/W_2$ multiple emulsions with a dispersed mass fraction of 0.2.

The pH value at which the strongest electrostatic interaction between the protein (whey protein concentrate (WPC)) and the polysaccharides (gum arabic (GA), mesquite gum (MG), and low methoxyl pectin (LMP)) exists was determined. It was found that there is a pH value at which the maximum difference of electrostatic charges between protein and polysaccharide (pH_E) is reached, and this pH value agrees with the pH value at which the maximum

coacervate yield was reached (pH_C) for each protein:polysaccharide complex (Pr:Ps) tested, being equal to 3 for the binary system WPC:GA, 3.5 for the system WPC:MG, and 3.0 for the system WPC:LMP.

The coacervate yield varying the concentration and ratios between the polysaccharides in aqueous solutions was determined. It was found that the highest coacervate yield took place at 2:1 ratio (Pr:Ps) for all the binary systems. The total biopolymers concentration, at which the maximum coacervate yield was obtained, was different for each binary system, finding that a total biopolymers concentration of 5% (w/w) was necessary for the WPC:GA and WPC:MG binary systems, and 0.7% (w/w) for the WPC:LMP binary system.

Based on the results regarding the biopolymers interaction and coacervate yield, $W_1/O/W_2$ multiple emulsions were formulated. The coalescence rates of the $W_1/O/W_2$ multiple emulsions were determined following the change in their droplet size ($d_{3,0}$) through time, finding that the $W_1/O/W_2$ multiple emulsion stabilized with WPC:MG showed the smallest droplet sizes (2.05 μm), and a slower coalescence rate ($7.09 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$).

The protective effect of the $W_1/O/W_2$ multiple emulsions against oxidation of ferrous bisglycinate was evaluated, finding that the $W_1/O/W_2$ multiple emulsion stabilized with WPC:MG was the one that provided a better protection against ferrous bisglycinate oxidation (29.75% Fe^{3+}).

The rate of ferrous bisglycinate release from W_1 to W_2 in the $W_1/O/W_2$ multiple emulsions was determined. The experimental data were fitted to seven different release kinetic models, best fitting model being Higuchi's. A slower release rate (K_H) of ferrous bisglycinate, from W_1 to W_2 ($K_H = 0.69 \text{ mg mL}^{-1} \text{ min}^{-0.5}$) occurred in the first 24 hours, followed by a release rate of $0.07 \text{ mg mL}^{-1} \text{ min}^{-0.5}$ during the next 19 days of storage time in the $W_1/O/W_2$ multiple emulsion stabilized with WPC:MG.

The rheological properties of the $W_1/O/W_2$ multiple emulsions were evaluated, finding that all the emulsions showed a shear-thinning behavior, and the emulsion stabilized with the WPC:LMP binary system showed an elastic modulus (G') larger than the viscous modulus (G''), which resulting in the least stable emulsion, with a bigger droplet size and a higher polydispersity because it was more difficult to re-disperse in the primary emulsion.

Better encapsulation efficiencies, enhanced protection against oxidation and slower release rates of ferrous bisglycinate were achieved as the molecular weight of the polysaccharide making up protein:polysaccharide complex was higher. The multiple emulsion showing the best functional properties was that stabilized with the WPC:MG complex. Thus, the factor that probably affected most the overall functionality of multiple emulsions was the thickness of the complex adsorbed around the multiple emulsion oil droplets. These thicknesses were determined indirectly by measuring the z-average diameter of the complexes, and that of the WPC:MG (529.4 nm) was the largest.

3. INTRODUCCIÓN

El hierro biglicinado tiene un gran potencial como fortificador de alimentos porque su absorción no es disminuida por la acción de otras moléculas contenidas en los alimentos como los fitatos y polifenoles, siendo hasta seis veces mejor absorbido que otras fuentes de hierro como el sulfato ferroso, sin embargo, las soluciones acuosas de hierro biglicinado no son estables a la oxidación del ion ferroso (Fe^{2+}), tornándose de un color verde característico de Fe^{2+} a un color rojo característico del ion férrico (Fe^{3+}). Puesto que la fortificación de alimentos con hierro ha resultado ser una estrategia efectiva para solucionar problemas nutricionales de la población, es importante proteger al hierro biglicinado contra la oxidación mediante una emulsión múltiple cinéticamente estable. Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables constituidos por una dispersión de partículas líquidas en el seno de otra fase líquida no miscible. Comúnmente una de las fases de la emulsión es acuosa, pudiendo contener disueltas sustancias hidrófilas, y la otra fase es oleosa, la cual puede contener sustancias lipófilas. Las emulsiones múltiples pueden ser del tipo agua en aceite en agua ($W_1/O/W_2$) o del tipo aceite en agua en aceite ($O_1/W/O_2$). Por ejemplo una emulsión múltiple del tipo $W_1/O/W_2$ consiste de gotas de agua dispersas en grandes gotas de aceite (W_1/O), las cuales son redispersadas a su vez en una fase acuosa externa (W_2). Existen varios factores que afectan la estabilidad de una emulsión $W_1/O/W_2$. Entre los cuales tenemos: La migración del emulsionante lipófilo presente en la formación de la emulsión primaria a la fase acuosa externa; la adecuada selección de la concentración del emulsionante hidrófilo secundario, ya que tiende a originar una inversión de fases de la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ a una emulsión sencilla O/W , debido a que durante la segunda etapa de emulsificación, el uso de este tensoactivo en grandes concentraciones hace las gotas externas tan pequeñas que ocurre una desestabilización de las gotas acuosas internas (Sela, Magdassi, y Garti, 1995;

Jager-Lezer, Terisse, Bruneau, Tokgoz, Ferreira, Clause, Seiller y Grossiord, 1997). Un tercer factor que afecta la estabilidad de las emulsiones múltiples $W_1/O/W_2$ es la migración de agua entre la fase acuosa interna y la fase acuosa externa, que se ve afectada por las magnitudes de los gradientes de presión osmótica entre ambas fases, las que a su vez se ven influenciadas por la naturaleza y concentración de los emulsificantes, de la fase oleosa, y de todos los ingredientes que se encapsulan en la fase acuosa interna, o de aquéllos que se separan de la fase acuosa externa (Özer, Baloglu, Ertan, Muguet y Yazan, 2000). Las investigaciones en el área de este tipo de emulsiones múltiples se han encaminado a mejorar su estabilidad usando mezclas binarias de tensoactivos de bajo peso molecular en la formulación de la emulsión W_1/O , y sustituyendo el tensoactivo hidrófilo presente en W_2 por materiales biopoliméricos. Considerando que varios factores fisicoquímicos afectan la estabilidad de la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$, es necesario el uso de biopolímeros o mezclas de biopolímeros que actúen como agentes emulsificantes y estabilizantes, que presenten no sólo una actividad superficial relativamente alta (como las proteínas), sino también propiedades de solvatación de la fase acuosa (como los polisacáridos hidrófilos). Lo anterior implica el uso de mezclas conjugadas de proteínas-polisacáridos (Baeza, Carp, Pérez y Pilosof, 2002; Tolstoguzov, 2003). La naturaleza y fuerza de las interacciones entre estas moléculas contribuyen a la estabilidad, características estructurales y funcionales del sistema disperso. Dependiendo de la química del biopolímero y de las condiciones de solución (Temperatura, pH, fuerza iónica, entre otras) estas interacciones pueden ser repulsivas o atractivas, débiles o fuertes, específicas o no específicas (de Kruif y Tuinier, 2001).

Actualmente existe un creciente interés en producir emulsiones múltiples cinéticamente estables, las cuales pueden ser usadas para controlar la liberación de ciertos ingredientes, reducir el contenido total de grasa en los productos alimenticios a base de emulsiones, aislar un ingrediente de otro, o proteger a un ingrediente lábil contra la acción de agentes

deteriorativos. Recientemente se han preparado emulsiones $W_1/O/W_2$ con una mejor estabilidad y tamaño de partícula más homogéneo utilizando para su estabilización complejos biopoliméricos proteína:polisacárido (Pr:Ps) en la interfase aceite-agua externa (Benichou, Aserin y Garti, 2002). El acomplejamiento electrostático entre los biopolímeros en la interfase externa permite una mejor cobertura en la interfase y con ello se incrementa la estabilidad de las emulsiones $W_1/O/W_2$ contra mecanismos agregativos a través de efectos estéricos. En la preparación de emulsiones con mezclas de biopolímeros existe una difusión de las distintas especies a la interfase, que dependerá de su concentración relativa, su peso molecular y su conformación en solución, entre otros factores. Al difundirse a la interfase, los biopolímeros compiten por sitios interfaciales donde se adsorben y, a través de procesos lentos de reacomodo e interacciones, que dependen de la naturaleza de sus grupos funcionales, forman una estructura entrelazada alrededor de las gotas (Wilde, Mackie, Husband, Gunning y Morris, 2004; Goddard, 2002; Dickinson, 2003). Esta estructura genera una barrera interfacial que permite tener un mejor control del transporte difusivo, mejora la resistencia al corte de las gotas formadas, mejora las propiedades de encapsulación y estabilidad cinética del sistema; también disminuye el transporte micelar y limita la migración de los agentes emulsionantes o tensoactivos. El acomplejamiento Pr:Ps depende de las concentraciones y proporciones relativas entre los biopolímeros (Espinosa-Andrews, Báez-González, Cruz Sosa y Vernon-Carter, 2007), además estas variables influyen fuertemente en las propiedades estructurales y mecánicas de sistemas alimenticios multicomponentes (Tolstoguzov, 1990), dichas propiedades pueden ser caracterizadas mediante estudios reológicos. Las propiedades reológicas se basan en la respuesta en el flujo y la deformación de los sistemas alimenticios cuando son sometidos a un esfuerzo. Los sistemas alimenticios fluidos, como las emulsiones, que contienen grandes cantidades de biopolímeros o de sólidos suspendidos exhiben un comportamiento no Newtoniano, y

muchos alimentos no Newtonianos también exhiben propiedades tanto elásticas como viscosas, es decir, presentan un comportamiento viscoelástico. Es difícil predecir magnitudes precisas de viscosidad de emulsiones alimenticias, principalmente porque los alimentos son mezclas complejas de compuestos bioquímicos que muestran una amplia variación en composición. Por lo tanto el estudio de las propiedades reológicas de las emulsiones es muy útil e importante para sus aplicaciones, las cuales incluyen manejo y procesamiento, control de calidad, y evaluación sensorial de los alimentos que las contienen (Rao, 1999).

Una vez que el ingrediente de interés ha sido atrapado en la fase acuosa interna de una emulsión $W_1/O/W_2$, es importante determinar su cinética de liberación. Se han hecho estudios recientes para la cinética liberación de magnesio de emulsiones $W_1/O/W_2$ (Bonnet, Cansell, Berkaoui, Ropers, Anton y Leal-Calderon, 2009) encontrándose que la liberación se da por mecanismos de difusión y/o permeación. Pimentel-González, Revah, Campos-Montiel, Monroy-Hermosillo y Vernon-Carter (2008) emplearon emulsiones $W_1/O/W_2$ con un consorcio microbiano atrapado en la fase acuosa interna, para degradar metil terbutil éter (MTBE) contenido en la fase acuosa externa, el tensoactivo disuelto en la fase oleosa ayudó a transportar el MTBE desde la fase acuosa externa hacia la fase acuosa interna. Este tipo de difusión es conocido como transporte facilitado, y puede trabajar en sentido inverso para liberar un ingrediente contenido en la fase acuosa interna (Kralj y Brečević, 1998).

Este trabajo propone proteger al hierro biglicinado contra la oxidación atrapándolo en la fase acuosa interna de una emulsión $W_1/O/W_2$, estabilizada con una mezcla de tensoactivos en la emulsión W_1/O y con complejos biopoliméricos Pr:Ps en la fase W_2 . Para ello se determinó el efecto de las concentraciones y proporciones relativas entre los tensoactivos y entre los biopolímeros, así como el pH en el cual se maximiza el acomplejamiento electrostático entre biopolímeros para obtener emulsiones $W_1/O/W_2$ con mejor estabilidad y tamaño de partícula, mejor rendimiento de encapsulación de hierro biglicinado, mejor

protección contra la oxidación del hierro biglicinado, y una liberación más controlada del hierro biglicinado desde W_1 hacia W_2 en las emulsiones múltiples. Finalmente se llevó a cabo la caracterización reológica de las emulsiones múltiples obtenidas.

4. ANTECEDENTES

4.1. Hierro y su importancia bioquímica

El hierro que se consume con los alimentos debe estar presente en las primeras dos porciones del intestino delgado (el duodeno y la parte superior del yeyuno) en una forma soluble para poder absorberse. De las dos formas de hierro existentes en alimentos (Fe^{2+} y Fe^{3+}), sólo el ion Fe^{2+} es soluble, y el ion Fe^{3+} debe seguir un proceso biológico más largo para su absorción. La adición de secreciones intestinales aumenta el pH a 7, en cuyo punto la mayoría del Fe^{3+} se precipita. El ion Fe^{2+} es soluble a un pH de 7 y en consecuencia está disponible para la absorción. La eficacia de la absorción de hierro se determina hasta cierto grado por los alimentos en los cuales ocurre. Estos alimentos pueden contener agentes formadores de complejos como fitatos o polifenoles que inhiben la absorción. El Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán recomienda una ingesta diaria de 10 mg de hierro para los varones y las mujeres posmenopáusicas (Tabla 1). La deficiencia de hierro es la deficiencia nutricional más frecuente, así como la causa más frecuente de anemia en niños y mujeres durante los años reproductivos en México y a nivel mundial.

Tabla 1. Requerimientos dietéticos recomendados para el hierro.

Edad (años)		Ingesta diaria recomendada (IDR) (mg/día)
	Lactantes	
0.0-0.5		6
0.5-1.0		10
	Niños	
1-10		10
	Hombres	
11-18		12
19-51 +		10
	Mujeres	
11-50		15
51 +		10
Embarazo		30
Lactancia		
Primeros doce meses		15

Fuente: Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán, 1989.

La etapa final de la deficiencia de hierro se manifiesta por anemia hipocrómica microcítica, que se corrige al proporcionar suplementos de hierro. Las fuentes comunes de hierro para suplementación son: el óxido férrico, pirofosfato ferroso, tartrato ferroso, cloruro férrico, carbonato ferroso, citrato férrico de amonio, fumarato ferroso y el sulfato ferroso. Una excelente alternativa a las sales inorgánicas para la suplementación de hierro es el uso de minerales aminoquelados que tienen ventajas enormes comparados con las sustancias tradicionales. La administración de drogas y alimentos de Estados Unidos (FDA) ha definido oficialmente un mineral aminoquelado como “el producto resultante de la reacción de un ion metálico de una sal soluble con aminoácidos en una relación molar de una mol de metal y de una a tres (preferentemente dos) moles de aminoácidos para formar enlaces covalentes coordinados. El peso promedio de los aminoácidos es de aproximadamente 150 y el peso molecular resultante del aminoquelado no excede de 800” (Ashmead, 2001).

4.1.1. Hierro biglicinado

El hierro biglicinado es un mineral aminoquelado, y más importante aún, es un aminoquelado funcional y nutricionalmente probado. Una vez absorbido en las células de la mucosa y hasta cierto límite, en los tejidos, es hidrolizado en sus componentes individuales y metabolizado por el organismo (Ashmead, 2001). Las moléculas de glicina que conforman al hierro biglicinado adoptan una orientación espacial más estable con los ángulos tetraédricos (Fig. 1). Esta orientación es fundamental para la protección de la molécula contra la acción de fosfatos, fitatos, taninos y fibras los cuales son componentes normales de la dieta humana.

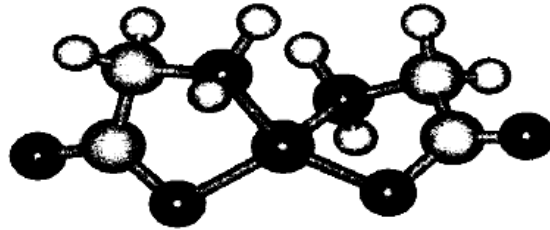


Figura 1. Dibujo del hierro biglicinado para representar correctamente la orientación de los enlaces de O, N, C y el metal y la orientación tetraédrica resultante de las dos estructuras de anillo del ligando. La figura está basada en espectrometría de difracción de rayos x de cristales puros de hierro biglicinado (Ashmead, 2001).

El resultado del proceso de quelación es una molécula neutra relativamente estable, por lo que la absorción de los minerales ingeridos en esta forma es hasta seis veces mayor que la de las fuentes inorgánicas (Bovell-Benjamin, Viteri y Allen, 2000). El hierro aminoquelado ha sido aceptado por la FDA como un suplemento nutritivo y aditivo alimenticio seguro que cumple con las buenas prácticas de manufactura y tiene ventajas enormes en comparación con las sales inorgánicas. Ha sido demostrado que el hierro biglicinado es menos tóxico que las sales inorgánicas de hierro y que puede ser administrado diariamente en dosis únicas, además, el costo del tratamiento con hierro biglicinado es menor en comparación con las sales inorgánicas debido a que es más corto (Bovell-Benjamin, Viteri y Allen, 2000). La absorción del hierro biglicinado es en el yeyuno y no es afectado por la acción de los componentes normales de la dieta. En la figura 2 se muestra la formación del hierro biglicinado, los anillos resultantes del quelado son anillos heterocíclicos de cinco miembros. Cada anillo heterocíclico contiene dos enlaces los cuales se localizan entre el ion ferroso y el ligando glicina en cada anillo. El primer enlace entre el catión y la porción aniónica o porción polar del ligando es de naturaleza covalente debido a que comparten un electrón del grupo carboxilo y un electrón del ion ferroso, esto es, el enlace entre el oxígeno del grupo COO^- , y

el Fe^{2+} . El segundo enlace es un enlace covalente coordinado, en este caso, el hierro se comporta como ácido de Lewis y la glicina como base de Lewis. La donación de ambos electrones del mismo átomo en el grupo amino del ligando al ion metálico establece el enlace covalente coordinado. Esta donación de electrones irá al orbital de menor energía del ion ferroso, el cual en este caso es el orbital p.

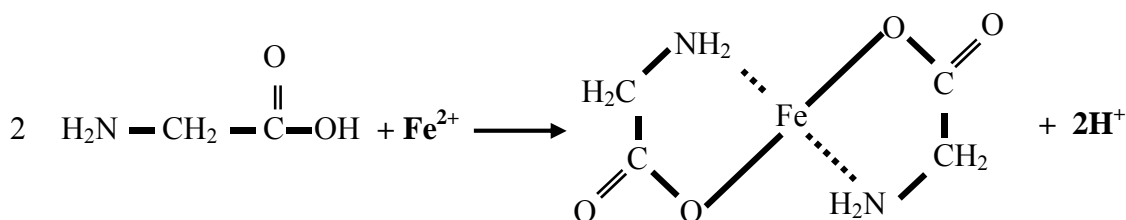


Figura 2. Formación del hierro biglicinado a partir de dos ligandos de glicina y un átomo de ión ferroso (Fe^{2+}).

Se han hecho estudios evaluando el efecto de los metales aminoquelados sobre la oxidación lipídica y se ha concluido que el hierro biglicinado incrementa marcadamente la oxidación de ácidos grasos insaturados, y lo hace mucho más fuertemente que otros fortificantes como el sulfato ferroso, hierro triglicinado y el hierro quelado con EDTA sódico (Bovell-Benjamin, Viteri y Allen, 2000). Esta oxidación impacta en el sabor de los alimentos a los cuales se adiciona, y por esa razón su utilización se ha visto limitada en la industria alimentaria, empleándose actualmente en la fortificación de muy pocos productos alimenticios comercializados. Sin embargo, la oxidación del hierro biglicinado, y su interacción con otros componentes alimenticios como los ácidos grasos insaturados podría ser prevenida mediante su encapsulación en la fase acuosa interna de una emulsión $W_1/O/W_2$ propuesta en este trabajo.

4.2. Emulsiones múltiples $W_1/O/W_2$

Las emulsiones múltiples del tipo agua en aceite en agua ($W_1/O/W_2$) consisten de gotas de agua dispersas en grandes glóbulos de aceite los cuales están dispersos a su vez en una fase acuosa continua (McClements, 2005). Aprovechando su estructura de doble compartimento (Fig. 3), ha surgido un interés creciente hacia las emulsiones múltiples, desde su primera descripción en 1925 (Seifriz, 1925), al ser consideradas como reservorios de sustancias encapsuladas para ser liberadas bajo condiciones variables. Aunque las emulsiones múltiples permanecen sin ser usadas frecuentemente en la industria, sus aplicaciones potenciales son numerosas y el estudio de estos sistemas es actualmente un campo activo de la investigación, especialmente en áreas como biorremediación (Pimentel-González, Revah, Campos-Montiel, Monroy-Hermosillo y Vernon-Carter, 2008), farmacéutica, cosméticos (Bais y Lapasin, 2003) y alimentos (Dickinson y McClements, 1996; Okochi y Nakano, 2000; Lobato-Calleros, Rodríguez, Sandoval-Castilla, Vernon-Carter y Álvarez-Ramírez, 2006). Las emulsiones $W_1/O/W_2$ permiten la encapsulación de moléculas activas en la fase acuosa interna, y esto hace posible enmascarar sabores u olores; proteger contra la oxidación, luz o degradación enzimática; o para asegurar la liberación controlada de los ingredientes activos encapsulados. Las emulsiones dobles son preparadas tradicionalmente mediante el método de dos etapas con dos tensoactivos de solubilidad opuesta. Para producir una emulsión $W_1/O/W_2$, primero un tensoactivo con un valor de balance hidrófilo-lipófilo bajo ($HLB < 5$) es disuelto en aceite. Después, se añade agua, se homogeniza y se forma una emulsión W_1/O . El sistema es entonces re-emulsionado en una solución acuosa de tensoactivo con un HLB alto (>10) para producir una emulsión doble ($W_1/O/W_2$). Ambos tensoactivos se mezclan en las interfaces

agua/aceite, y el tiempo de vida de las películas formadas en las interfaces es gobernada por la composición de la mezcla binaria de surfactantes (Pays, Giemanska-Kahn, Pouligny, Bibette y Leal-Calderón, 2001). Sin embargo las emulsiones formuladas así, no son del todo estables, particularmente cuando se usan en sistemas hidrodinámicos sujetos a altas tasas de corte.

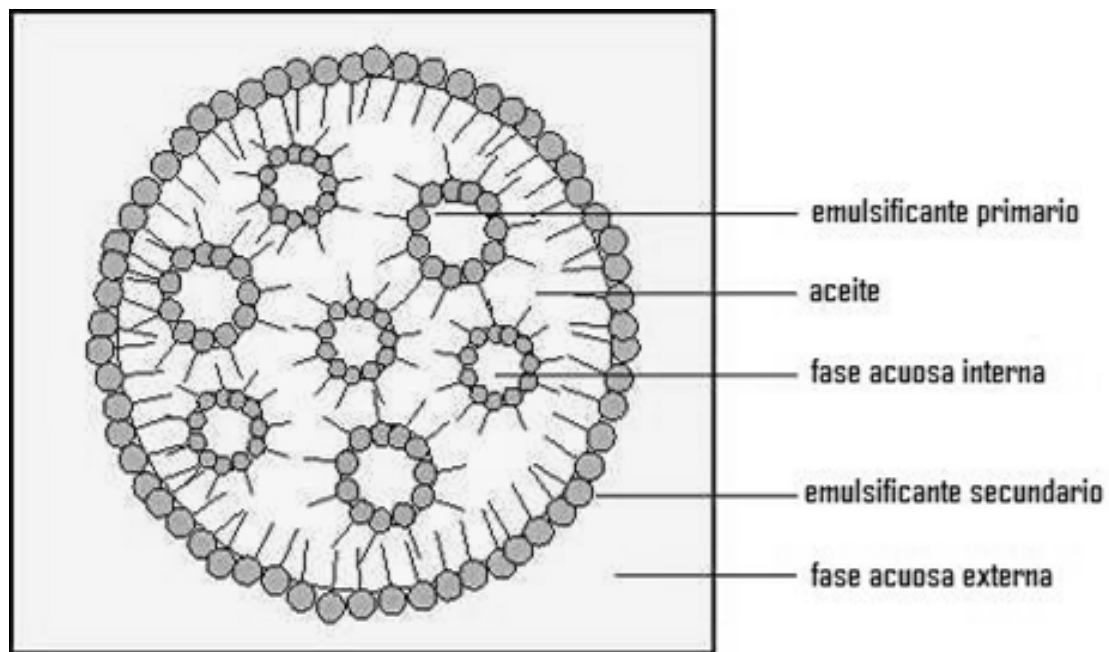


Figura 3. Esquema de una emulsión múltiple $W_1/O/W_2$.

4.2.1. Estabilidad de emulsiones múltiples

Por regla general, para las emulsiones se habla de estabilidad desde el punto de vista cinético, ya que su separación en las fases que la componen es suficientemente lenta, al cabo de un tiempo. La inestabilidad de las emulsiones dobles de tipo $W_1/O/W_2$ se representa en la figura 4, mostrando los siguientes mecanismos:

- 1) La coalescencia entre los glóbulos de aceite.

- 2) La coalescencia entre las gotas internas.
- 3) La expulsión de las gotas internas de forma individual ó múltiple.
- 4) El incremento o disminución en tamaño de las gotas de la fase interna acuosa.

La coalescencia, el mecanismo por el cual las pequeñas gotas en contacto se combinan para formar gotas más grandes, puede ocurrir en una variedad de formas, dependiendo de la formulación de la emulsión, y puede ser provocada para que ocurra en unos pocos minutos o puede ser controlada para ocurrir gradualmente durante un periodo de tiempo de semanas meses o años. Estos mecanismos de desestabilización son debido a que: (a) el tensoactivo liposoluble tiende a desorberse de la interfase interna agua-aceite y migrar a la interfase O/W₂ externa donde compite por lugares interfaciales y puede desplazar al tensoactivo hidrófilo,

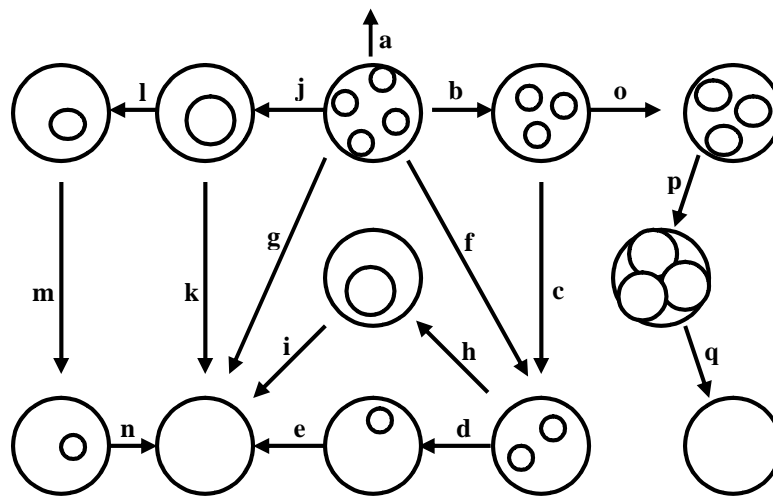


Figura 4. Representación global de la variedad de posibles vías de desestabilización para emulsiones W/O/W: (a), coalescencia de los glóbulos de aceite; (b) a (e), expulsión secuencial de gotas internas individuales; (f), (g), expulsión múltiple de gotas internas; (h) a (k), coalescencia y expulsión de las gotas internas; (l) a (n) disminución de tamaño de las gotas internas; (o) a (q), incremento de tamaño y expulsión de las gotas internas (Dickinson y McClements, 1996).

desestabilizando la emulsión múltiple, y (b) como el tensoactivo hidrófilo se usa en muy baja concentración para que el tamaño de glóbulo externo sea lo suficientemente grande, de manera que en su interior quepan un número suficientemente grande de glóbulos internos, el número de moléculas de este tensoactivo en la interfase aceite-agua externa es bajo, y la película interfacial no resiste tasas de corte altas, rompiéndose y desestabilizando la emulsión. A determinadas proporciones de surfactante, la energía de curvatura, la cual está dada por la diferencia de presiones internas entre las dos fases, favorece un cambio de la curvatura en la interfase de una gota de la fase acuosa interna en contacto con la interfase aceite-agua externa, debido a que la presión interna de la fase acuosa externa aumenta, produciendo una ruptura y una repentina liberación del contenido de la gota hacia la fase acuosa externa (González-Ochoa, Ibarra-Bracamontes y Arauz-Lara, 2003). Por lo tanto, el principal problema encontrado al formular emulsiones múltiples estabilizadas con tensoactivos es que sus membranas interfaciales están muy poco estructuradas, debido a la relativamente sencilla estructura química de los tensoactivos. Una opción para sobreponernos a este problema es buscar lograr una composición más compleja de las membranas interfaciales (interna y externa) de las emulsiones múltiples. Esto se puede lograr en la emulsión W_1/O , utilizando una mezcla de tensoactivos lipodispersables e hidrodispersables (pero con HLB global lipófilo) compatibles que interactúen a través de la interfase, formando efectivamente una membrana interfacial más gruesa y compleja. En la emulsión externa se usarían mezclas binarias de biopolímeros formando complejos electrostáticos (polisacáridos, proteínas), que permitan la adsorción de una gruesa capa interfacial en la interfase externa O/W , pero a la vez permitiendo obtener un glóbulo externo sustancialmente mayor a los glóbulos de emulsión internos. El tener una capa adsorbida externa de complejo biopolimérico gruesa presenta tres

ventajas fundamentales en emulsiones múltiples: (1) debido a efectos estéricos la energía de repulsión entre gotas de emulsión vecinas son muchísimo mayores que las proporcionadas por dobles capas eléctricas, haciendo la contribución debido estas últimas, despreciables. Los efectos de agregación de gotas son minimizados; (2) las capas adsorbidas son muy resistentes a la ruptura, por lo que se retardan efectos de coalescencia, siendo mucho más estables las emulsiones; (3) con la gran variedad de biopolímeros disponibles, se puede diseñar “a la medida” la composición de las capas adsorbidas permitiéndonos tener un mayor control sobre los efectos difusivos a través de la interfase.

4.2.1.1. Estabilidad por efectos estéricos

Uno de los papeles principales de los biopolímeros presentes en la fase acuosa externa de las emulsiones $W_1/O/W_2$ es adsorberse en la superficie de las gotas de aceite de la emulsión W_1/O . Los biopolímeros adsorbidos pueden prevenir la agregación de las gotas de aceite mediante estabilización estérica. En la figura 5 se representa esquemáticamente la manera en que las macromoléculas pueden adsorberse sobre la superficie de las gotas de aceite.

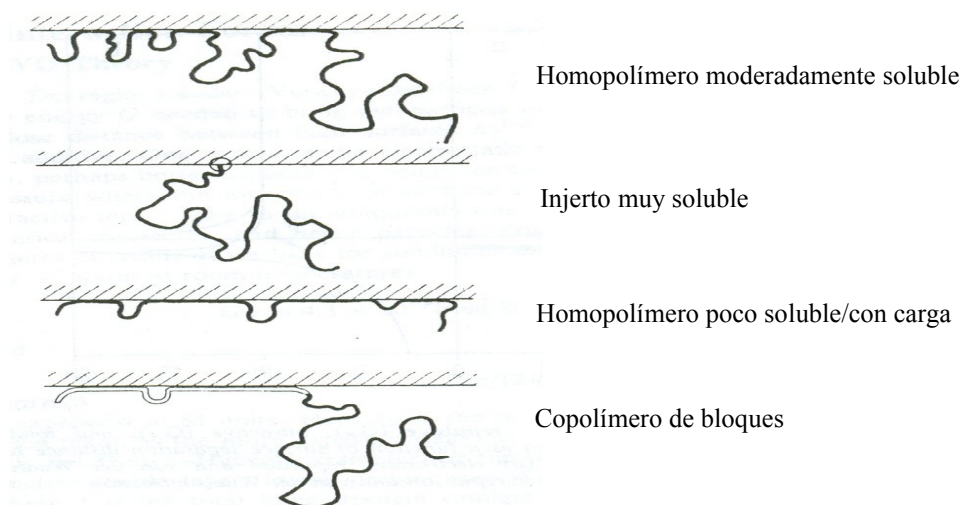


Figura 5. Representación esquemática de diferentes tipos de macromoléculas protuberantes (Walstra, 1993).

El hecho de que una macromolécula se adsorba o no depende mucho de su solubilidad. Para asegurar la adsorción en la superficie de la gota de aceite (por una parte), y un buen volumen de la macromolécula en la fase acuosa externa (por la otra), se han usado copolímeros, formados por dos bloques, uno poco soluble capaz de adsorberse fácilmente, y otro muy soluble que sale hacia la fase acuosa externa. Algunos biopolímeros como la goma arábica y la goma de mezquite poseen una estructura química formada principalmente por carbohidratos y además incluyen de forma natural en su molécula una porción proteica que es la responsable de la adsorción. Las proteínas pueden adsorberse de muchas maneras, ya sea en su forma nativa, con algunos cambios en su conformación o casi completamente desdobladas. La figura 6 muestra los dos mecanismos que tienen que ver con la estabilización estérica: 1) Cuando una superficie aproxima a otra sus macromoléculas protuberantes, éstas se ven restringidas en su movimiento libre, por lo tanto hay una disminución de la entropía del sistema, y por lo tanto hay una energía libre repulsiva. Esta energía libre de restricción de

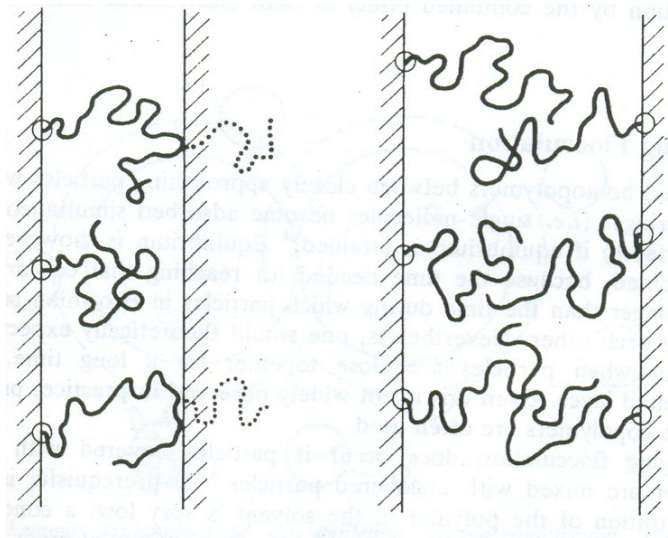


Figura 6. Representación esquemática de los mecanismos de estabilización estérica por moléculas protuberantes: restricción de volumen (izquierda) y mezclado (derecha) (Walstra, 1993).

volumen es siempre positiva y causa una fuerte repulsión entre las gotas; 2) Si la otra superficie también posee macromoléculas protuberantes, la concentración de material macromolecular entre las dos gotas se incrementará a medida que se acercan y cuando las capas de macromoléculas se traslapan habrá un aumento en la presión osmótica causando una fuerte repulsión (Walstra, 1993).

4.2.1.1.1. Biopolímeros

El término biopolímero incluye proteínas y polisacáridos. Ambas macromoléculas contribuyen a la estructura, textura y estabilidad de sistemas alimenticios. Debido a su actividad superficial, las proteínas suelen ser los agentes emulsionantes de elección, especialmente para la formación de espumas y emulsiones aceite en agua (O/W), mientras que los polisacáridos son conocidos como agentes espesantes o gelificantes que modifican y controlan las propiedades de flujo. Dentro de los polisacáridos usados en alimentos se encuentran las gomas exudadas por diversas plantas y algunos biopolímeros modificados química y/o enzimáticamente a partir de la celulosa (Dickinson, 2003). En muchos sistemas alimenticios estos dos componentes se encuentran mezclados y bajo ciertas condiciones (p. ej. pH, concentración, proporción y fuerza iónica) pueden interactuar positivamente formando complejos biopoliméricos, los cuales han demostrado ser efectivos en la estabilización de emulsiones mediante mecanismos estéricos y electrostáticos (Benichou, Aserin y Garti, 2002).

a) Goma de mezquite

La goma de mezquite (MG) es el exudado en forma de lágrima de color ámbar producida por árboles de *Prosopis spp.*, ha sido propuesta como un sustituto de la goma arábiga; se ha

reportado que es un excelente agente encapsulador de aceites esenciales dentro de un amplio intervalo de actividades acuosas y un agente emulsificante y estabilizante de colorantes naturales, proveyéndoles de una mayor protección en comparación con la goma arábiga (Pérez-Alonso, Báez-González, Beristain, Vernon-Carter y Vizcarra-Mendoza, 2003; Beristain, García y Vernon-Carter, 2001; Beristain, Azuara y Vernon-Carter, 2002; Rodríguez-Huezo, Pedroza-Islas, Prado Barragán, Beristain y Vernon-Carter, 2004). Químicamente es una sal neutra de un polisacárido ramificado de naturaleza acídica formado por un núcleo de residuos de β -D-Galactosa, constituyendo un esqueleto de uniones (1-3) y ramificaciones (1-6) y contiene L-Arabinosa (formas cíclicas de Piranosa y Furanosa), L-Ramnosa, β -D-Glucuronato y 4-o-metil- β -D-Glucuronato como azúcares simples y cadenas laterales de oligosacáridos. La MG obtenida de *Prosopis laevigata* contiene una pequeña fracción de proteína ($2.7 \pm 0.06\%$) ligada a la parte central de la estructura primaria de carbohidratos. Es una mezcla compleja de al menos cinco fracciones distintas con diferentes composiciones químicas. La parte de proteína es asociada a la fracción de masa molecular más alta, que representa menos del 11% del total de la goma (Orozco-Villafuerte, Cruz-Sosa, Ponce-Alquicira y Vernon-Carter, 2003). La MG es un agente emulsionante muy efectivo, propiedad que está relacionada con su contenido de proteína, y que le permite tener una buena actividad superficial; además la gran masa molecular del componente polisacárido le provee a los sistemas dispersos una estabilidad a largo plazo, debido a factores estéricos (Vernon-Carter, Beristain y Pedroza-Islas, 2000).

b) Goma arábica

La goma arábica (GA) es el hidrocoloide aniónico más utilizado en las industrias de los alimentos y farmacéutica. Se obtiene del exudado de la corteza del árbol *Acacia senegal*. La adsorción de la GA sobre una gota de emulsión produce una membrana interfacial gruesa y cargada negativamente que estabiliza la emulsión a través de mecanismos estéricos y electrostáticos. La GA es una mezcla compleja de carbohidratos que contienen una pequeña porción de proteína unida a través de enlaces covalentes. Se ha clasificado como un complejo arabinogalactano proteína (AGP). La GA es un heteropolisacárido ramificado que contiene cerca del 2% de proteína. La parte de los carbohidratos está compuesta por D-galactosa (~ 40%), L-arabinosa (~ 24%), L-ramnosa (~13%), y dos ácidos urónicos, responsables del carácter polianiónico de la goma, el ácido D-glucurónico (~ 21%) y el ácido 4-o-metil-D-glucurónico (~ 2%). La estructura de la goma arábica es compleja y no es conocida completamente. La estructura principal está formada por bloques de cadena β -galactopiranososa con enlaces 1,3 y unidades 1,6-galactopiranososa de cadenas colgantes unidas con β -D-glucuronopiranososa y 4-o-metil- β -D-glucuronopiranososa, también α -L-arabinofuranosa y α -L-rhamnopiranososa son enlazados a través de enlaces 1,3 y 1,4 respectivamente (Islam, Phillips, Slijivo, Snowden y Williams, 1997).

La GA puede formar películas, lleva a la formación de una capa macromolecular estable alrededor de una gota de aceite. La actividad superficial es relativamente baja comparada con las proteínas. Es necesario utilizar una relación alta de goma a aceite, por ejemplo, 1:1 comparado con 1:10 para la emulsión equivalente estabilizada con proteínas. La GA es un ingrediente caro, por lo que se ha propuesto que se reemplace por otros biopolímeros con

capacidad emulsificante como los almidones modificados (Trubiano, 1995) y la goma de mezquite (Vernon-Carter, Beristain y Pedroza-Islas, 2000).

c) Pectinas

Las sustancias pécticas son un grupo de polisacáridos estrechamente relacionados con la estructura de la pared celular y las regiones intercelulares de las plantas superiores. La característica principal de las pectinas es su cadena lineal de unidades de D-ácido galacturónico unidos mediante enlaces α -(1→4). A dicha cadena se unen proporciones variables de grupos ácidos presentes como metoxil (metil) ésteres. El término sustancia péctica se usa comúnmente para englobar el metoxil éster, la pectina, el ácido péctico desesterificado y sus sales, pectatos y ciertos polisacáridos neutros (arabinanos, arabinogalactanos, galactanos) sin el esqueleto de galacturonano encontrado frecuentemente asociado a pectinas. Pectina de alto metoxilo (HMP) y pectina de bajo metoxilo (LMP), son términos usados para pectinas comerciales que tienen alto y bajo contenido de metoxilo, respectivamente, aplicados principalmente en la industria alimentaria como agentes gelantes. Las pectinas de bajo metoxilo (grado de metoxilación < 50%) pueden formar geles en presencia de iones divalentes (Voragen, Pilnik, Thibault, Axelos y Renard, 1995).

4.2.1.1.2. Complejos biopoliméricos

La estabilidad de una emulsión doble puede ser mejorada mediante la adición en la fase acuosa externa de diferentes biopolímeros tales como proteínas y polisacáridos, de los cuales, los primeros proporcionan mayor adsorción en la interfase de emulsiones dobles y los segundos tienen propiedades espesantes y de retención de agua. Además ambos biopolímeros

contribuyen a las características texturales y estructurales de los sistemas que los contienen. Dichas propiedades no sólo dependen de la funcionalidad por separado de cada biopolímero sino también de la naturaleza y fuerza de las interacciones proteína-polisacárido. Existe una variedad de biopolímeros naturales y modificados disponibles como ingredientes en emulsiones, cada uno de los cuales tiene propiedades funcionales únicas y un intervalo óptimo de aplicaciones. Las interacciones atractivas entre proteínas y polisacáridos pueden ser fuertes o débiles, y específicas (p. ej. enlaces covalentes) o no específicas. Las interacciones atractivas no específicas pueden ser el resultado de diferentes interacciones químicas individuales entre los diferentes grupos funcionales que forman parte de las moléculas de biopolímero, y pueden ser iónicas, dipolo-dipolo, van der Waals, por puente de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, entre otras. Pueden ocurrir interacciones atractivas fuertes entre proteínas cargadas positivamente ($\text{pH} < \text{punto isoelectrico}$) y polisacáridos aniónicos en solución acuosa, causando una espontánea separación de fases, un sobrenadante rico en solvente y un precipitado rico en complejos biopoliméricos. Esto es causado por una coprecipitación de complejos biopoliméricos bajo la influencia de interacciones atractivas proteína-polisacárido (Dickinson, 1993). Dichos complejos biopoliméricos tienen la capacidad de formar y estabilizar emulsiones mediante mecanismos estéricos y electrostáticos. La adsorción de los complejos biopoliméricos en la interfase puede llevarse a cabo mediante tres mecanismos: a) adsorción competitiva, b) adsorción asociativa, y c) adsorción en capas (Bergenståhl, 1995). Se han preparado emulsiones $W_1/O/W_2$ con mayor estabilidad y mayor homogeneidad en cuanto a su distribución de tamaño de partícula usando en la interfase aceite-agua externa complejos proteína-polisacárido (Benichou, Aserin y Garti, 2002). El acomplejamiento electrostático entre los biopolímeros en la interfase externa

permitió un mejor recubrimiento de la interfase, y por lo tanto una mayor estabilización de las emulsiones $W_1/O/W_2$ contra mecanismos de agregación. El acomplejamiento entre proteína y polisacárido depende de las concentraciones relativas y proporciones entre los biopolímeros (Benichou, Aserin y Garti, 2002; Weinbreck, Nieuwenhuijse, Robjin y de Kruif, 2003; Weinbreck, Tromp y de Kruif, 2004; Espinosa-Andrews, Báez-González, Cruz Sosa y Vernon-Carter, 2007). Como una herramienta para determinar el intervalo de condiciones de pH a las cuales los biopolímeros iónicos, tales como proteínas y polisacáridos, interactúan de manera atractiva para formar complejos biopoliméricos, se hace uso del potencial zeta. El potencial zeta de una partícula es un parámetro que puede ser deducido a partir de su movilidad electroforética. El potencial zeta es el potencial eléctrico entre el volumen de solución y el plano de deformación alrededor de la partícula. El plano de deformación es una esfera imaginaria alrededor de la partícula en la cual el disolvente se mueve junto con la partícula cuando la partícula se mueve a través de la solución. Las gráficas de potencial zeta en función de pH pueden ser utilizadas para encontrar ventanas de interacción entre biopolímeros (Espinosa-Andrews, Lobato Calleros, Pérez-Alonso, Cruz-Sosa y Vernon-Carter, 2008) donde la máxima interacción coincide con la máxima diferencia estequiométrica de cargas electrostáticas entre los dos biopolímeros (Weinbreck, Tromp y de Kruif, 2004).

4.2.1.2. Estabilidad por efectos electrostáticos

La estabilidad de las emulsiones desde el punto de vista de la contribución electrostática de sus componentes puede ser descrita mediante la teoría D.L.V.O. (llamada así por las iniciales de cada uno de sus autores). El punto principal de esta teoría es el concepto de que las gotas dispersas están sujetas a dos tipos de fuerzas las cuales pueden influir en que dos de esas gotas

se unan y permanezcan en contacto o no bajo la influencia del movimiento Browniano. Tales fuerzas son: 1) Las fuerzas de atracción de London-van der Waals; y 2) La repulsión electrostática entre dobles capas eléctricas del mismo signo. Dichas fuerzas son de origen completamente diferente y se pueden evaluar por separado (Kitchener y Mussellwhite, 1969). Una forma de evaluar la repulsión electrostática entre dobles capas eléctricas es mediante la determinación de potencial zeta (ver anexo 13.2). La interacción neta entre las partículas se obtiene sumando las fuerzas para cada distancia entre ellas. Si las fuerzas de atracción son mayores que las fuerzas de repulsión a cualquier distancia entonces la emulsión será inestable y coagulará tan pronto como las partículas puedan unirse. Si por el contrario, la repulsión electrostática es mayor que las fuerzas de atracción, habrá una barrera energética que se oponga a la unión de las dos gotas. Si la barrera energética que se forme es comparable con la energía cinética de las gotas entonces la unión de las gotas será lenta, pero no evitada. Si la barrera energética es mucho más grande que dicha energía cinética entonces la tasa de unión de las gotas será prácticamente cero (Kitchener y Mussellwhite, 1969).

4.2.1.2.1. Tensoactivos

Por definición, un tensoactivo es una molécula anfífilica que tiene una “cabeza” hidrófila la cual tiene una alta afinidad por el agua y una “cola” lipófila la cual tiene afinidad por el aceite. Las emulsiones dobles $W_1/O/W_2$ requieren al menos dos tensoactivos, un tensoactivo lipófilo y un tensoactivo hidrófilo que ayuden a formar y estabilizar la emulsión. Los tensoactivos pueden ser clasificados de diferentes maneras, se clasifican por su número de regiones hidrófilas en monofuncionales y multifuncionales.

Tabla 2. Clasificación de tensoactivos usados en alimentos.

A. Naturales	
Iónicos:	No iónicos:
Sales Biliares	Colesterol
Fosfolípidos	Saponinas
Proteínas	Gomas
Gomas	
B. Sintéticos	
Iónicos:	No iónicos:
Sales de ácidos grasos	Ésteres del glicerol
Estearoil-2-lactato de sodio	Ésteres del poliglicerol
	Ésteres del propilenglicol
	Ésteres de la sacarosa
	Ésteres de ácidos grasos con sorbitan
	Ésteres polioxietilénicos de sorbitan

Fuente: Badui-Dergal, Bourges-Rodríguez y Anzaldúa-Morales, 1996.

Los surfactantes monofuncionales poseen solo una región hidrófila; los multifuncionales, en contraste, tienen varios grupos hidrófilos y también, en la mayoría de los casos más de un grupo lipófilo. Por su carga eléctrica se clasifican en aniónicos, anfotéricos, catiónicos y no iónicos. También pueden ser clasificados en poliméricos y monoméricos, tales clasificaciones no son excluyentes, por ejemplo el Grindsted (Poliglicerol polirricinoleato) puede ser clasificado como polimérico a pesar de ser multifuncional. Los tensoactivos utilizados en la industria alimentaria son principalmente no iónicos (p. ej., monoacilgliceroles, ésteres de ácidos grasos de sacarosa), aniónicos (p. ej. sales de ácidos grasos, estearoil-2-lactato de sodio), o anfotéricos (p. ej., lecitina). En la Tabla 2 se presenta una clasificación de tensoactivos utilizados en la industria alimentaria. En el mercado existe un gran número de tensoactivos pero no todos funcionan adecuadamente en cualquier alimento; de acuerdo con su composición y estado de dispersión, cada sistema requiere de un tensoactivo específico. Por esta razón, la selección del tensoactivo adecuado debe ser muy cuidadosa. Realmente no hay un método ideal para dicha selección; la mejor manera es probar algunos directamente en

el sistema y observar su comportamiento (Badui-Dergal, Bourges-Rodríguez y Anzaldúa-Morales, 1996).

4.2.1.2.2. Balance hidrófilo lipófilo

El balance hidrófilo lipófilo (HLB) es un método semiempírico que es ampliamente usado para la clasificación de tensoactivos. El número HLB de un tensoactivo nos da una indicación de su solubilidad en la fase acuosa o en la fase oleosa y puede ser usado para predecir el tipo de emulsión que será formada. Cada tensoactivo tiene asignado un HLB de acuerdo con su estructura química. Una molécula con un HLB alto tiene una mayor proporción de grupos hidrófilos que lipófilos y viceversa. Un tensoactivo con número HLB bajo (3 a 6) es predominantemente lipófilo, es soluble preferentemente en aceite, estabiliza las emulsiones agua en aceite, y forma micelas inversas en aceite. Un tensoactivo con un número HLB alto (8 a 18) es predominantemente hidrófilo, es soluble preferentemente en agua, estabiliza las emulsiones aceite en agua y forma micelas en agua. Un tensoactivo con número HLB intermedio (6 a 8) no tiene una preferencia particular entre aceite o agua, las emulsiones formadas con estos tensoactivos son inestables y coalescen rápidamente debido a que la tensión interfacial es tan baja que se requiere una energía muy baja para romper la membrana interfacial (McClements, 2005). Algunos tensoactivos utilizados en la industria alimentaria y su HLB son presentados en la Tabla 3. Los números HLB sólo han sido calculados para tensoactivos no iónicos, los números HLB tan grandes como 40 son números relativos o comparativos para indicar la solubilidad de un surfactante iónico y no proceden de un cálculo matemático. Por otra parte, las mezclas de los distintos tensoactivos ofrecen una alternativa cuando no se tiene uno con el HLB deseado para un sistema en particular.

Tabla 3. Tensoactivos empleados en la industria alimentaria.

TENSOACTIVO	HLB
Ácido oleico	1.0
Monoglicéridos acetilados (ACETEM)	1.5
Dioleato de glicerol	1.8
Triestearato de sorbitan (Span65)	2.1
Monoestearato de propilenglicol	3.4
Monoestearato de glicerol	3.8
Poliglicerol Polirricinoleato (Grindsted PGPR)	4.3
Monoestearato de sorbitan (Span 60)	4.6
Monoestearato de diglicerilo	5.5
Monopalmitato de sorbitan	6.7
Monoestearato de triglicerol	7
Ésteres del ácido acetyl tartárico (Panodan DATEM)	8
Monolaurato de sorbitan	8.6
Dioleato de hexaglicerol	9
Trioleato de sorbitan y polioxietileno (Tween 85)	10.5
Triestearato de Sorbitan y polioxietileno (Tween 65)	10.9
Dioleato de decaglicerol	12
Monoglicérido etoxilado	13
Monooleato de decaglicerol	14
Monolaurato de sorbitan y polioxietileno (Tween 20)	14.9
Monooleato de sorbitan y polioxietileno (Tween 80)	15.0
Monopalmitato de sorbitan y polioxietileno (Tween 40)	15.6
Oleato de sodio	18
Oleato de potasio	20
Estearoil-2-lactato de sodio	21

Fuente: Compilado de: Sherman, 1969; McClements, 2005; y Badui-Dergal, Bourges-Rodríguez y Anzaldúa-Morales, 1996.

4.2.2. Cinéticas de liberación en emulsiones $W_1/O/W_2$

Las emulsiones $W_1/O/W_2$ presentan varias posibilidades interesantes para la liberación controlada de ingredientes activos hidrosolubles, a los cuales protegen contra su degradación y regulan su tasa de liberación para mejorar su eficacia (Özer, Baloglu, Ertan, Muguet y Yazan, 2000). Se ha visto que esta liberación depende de varios mecanismos, entre ellos se encuentra la diferencia de concentraciones entre W_1 y W_2 , lo cual genera un gradiente de

presión osmótica que impulsa la difusión y/o permeación de materiales a través de la membrana oleosa (Bonnet, Cansell, Berkaoui, Ropers, Anton y Leal-Calderon, 2009). Se ha demostrado que los tensoactivos lipófilos juegan un papel determinante en la liberación del ingrediente activo atrapado, funcionando como transportadores de sustancias a través de la fase oleosa, dicho mecanismo de liberación es conocido como transporte facilitado (Kralj y Brečević, 1998). Existen en la bibliografía diferentes modelos matemáticos para describir la cinética de liberación de ingredientes activos, cada uno de ellos varía dependiendo del mecanismo de liberación que domine el proceso, la naturaleza de la matriz que contiene a la sustancia activa, el tamaño de las gotas y la estabilidad de la emulsión (Andretta, 2003). En la Tabla 4 se presentan algunos modelos usados para describir cinéticas de liberación.

Tabla 4. Modelos usados para describir cinéticas de liberación.

MODELOS CINÉTICOS DE LIBERACIÓN		
Orden cero	$[Fe_{w_2}] = [Fe_{w_2}]_0 - K_0 t$	Tasas de liberación constantes.
Primer orden	$\ln [Fe_{w_2}] = \ln [Fe_{w_2}]_0 - K_1 t$	Tasa de liberación dependiente de $[Fe_{w_2}]_0$
Segundo orden	$1/[Fe_{w_2}] = 1/[Fe_{w_2}]_0 + K_2 t$	Tasa de liberación dependiente de $[Fe_{w_2}]_0^2$
Hixson & Crowell	$(1 - [Fe_{w_2}]/[Fe_{w_2}]_0)^{1/3} = -K_{HC} t + 1$	Tasas de liberación relativamente altas.
Peppas-Higuchi	$[Fe_{w_2}]/[Fe_{w_2}]_0 = K_{PH} t^n$	Difusión en tiempos cortos.
Jorgensen & Christensen	$[Fe_{w_2}]/[Fe_{w_2}]_0 = 1 - [(1-n) K_J (t-t_0)]^{1/(1-n)}$	Liberación por transporte micelar.
Higuchi	$[Fe_{w_2}] = K_H t^{1/2}$	Difusión por gradiente de concentración.

Donde $[Fe_{w_2}]$ es la concentración de hierro total en W_2 al tiempo t , $[Fe]_0$ es la concentración inicial de hierro total en W_2 , n es un parámetro de ajuste y K_{HC} , K_{PH} , K_J , K_0 , K_1 , K_2 , y K_H son las constantes de liberación para cada modelo respectivamente.

El procedimiento general consiste en obtener valores experimentales y posteriormente proponer una serie de modelos matemáticos para interpretar ese mecanismo de liberación. El modelo que se ajusta más a los resultados experimentales es el que se utiliza para describir el proceso.

4.3. Reología

Reología es la ciencia que estudia las relaciones de las propiedades de deformación y flujo de la materia cuando ésta es sometida a un esfuerzo. Todo fluido se va deformar en mayor o menor medida al someterse a un sistema de fuerzas externas. Dicho sistema de fuerzas se representa matemáticamente mediante el esfuerzo cortante " τ ", mientras que la respuesta dinámica del fluido se cuantifica mediante la velocidad de deformación " $\dot{\gamma}$ " (Macosko, 1997). La elasticidad dentro de la reología, se refiere a las propiedades mecánicas de los sólidos elásticos, los cuales se rigen por *la ley de Hooke* en donde el esfuerzo es directamente proporcional a la deformación pero independiente de la rapidez de deformación. Las propiedades de los líquidos viscosos se rigen por *la ley de Newton* que establece que el esfuerzo es proporcional a la rapidez de deformación pero independiente de la deformación (Medina-Torres, 2005). Aquellos materiales que presentan propiedades intermedias a las descritas por la ley de Hooke y la ley de Newton se les denominan materiales viscoelásticos (Gallegos, Navarro y Martínez-Boza, 2001). Así pues, el término de "viscoelasticidad" hace referencia a la coexistencia de propiedades viscosas y elásticas de un material. Cuando el cuerpo es sometido a un esfuerzo o a una deformación, en su interior se generan "reacomodos" moleculares que requerirán tiempos finitos de acuerdo a la estructura del

material. Cuando el tiempo invertido en estos es menor al tiempo de observación, el comportamiento de este material se describirá como “comportamiento viscoso”. En consecuencia, cuando los reajustes en el interior del cuerpo se llevan a cabo en tiempos muy grandes, mayores al tiempo de observación, el comportamiento se describe como “comportamiento elástico” (Herrera-Alonso, 2003). En la viscoelasticidad lineal las funciones materiales: los módulos de almacenamiento, G' y de pérdida, G'' , indican la cantidad de energía que se almacena en el material en cada ciclo de deformación, y el último es un indicativo de la cantidad de energía disipada durante cada ciclo de deformación. De esta manera, para un sólido perfectamente elástico, donde toda la energía se almacena y se recupera en cada ciclo, G' tendrá un valor de cero y el esfuerzo y la deformación estarán en fase ($\delta=0$); contrariamente, para un líquido perfectamente viscoso, donde toda la energía se disipa en forma de calor, G'' tendrá un valor de cero y el esfuerzo y la deformación estarán desfasados 90° . Por lo tanto, para un material viscoelástico donde tanto la componente elástica como la viscosa están presentes, el ángulo de desfasamiento (δ) tendrá un valor intermedio entre 0° y 90° (Medina-Torres, 2005). Para la mayoría de los materiales poliméricos con pesos moleculares altos (por encima del peso molecular crítico M_C , el cual se define como el peso molecular en donde se empiezan a observar interacciones entre cadenas poliméricas) se han identificado cuatro zonas viscoelásticas: vítrea, transición, meseta o plástica, y terminal o de flujo (figura 7). Donde la zona terminal está representada a bajas frecuencias y tiene como características generales pendientes de 1 para G'' y 2 para G' en escala logarítmica: la zona de terminal sigue a la zona de meseta y empieza por un máximo en G' (ω) denominado G''_m y se presenta en una frecuencia ω_m ; luego G'' pasa por un mínimo para volver a aumentar, en

esta zona G' permanece relativamente constante y se denomina como módulo de meseta (G_n^0); en la zona de transición G'' vuelve a ser mayor que G' , y por último, en el inicio de la zona vítrea vuelven a cruzarse G' y G'' , siendo G'' menor que G' , la cual se vuelve casi constante (Medina-Torres, 2005).

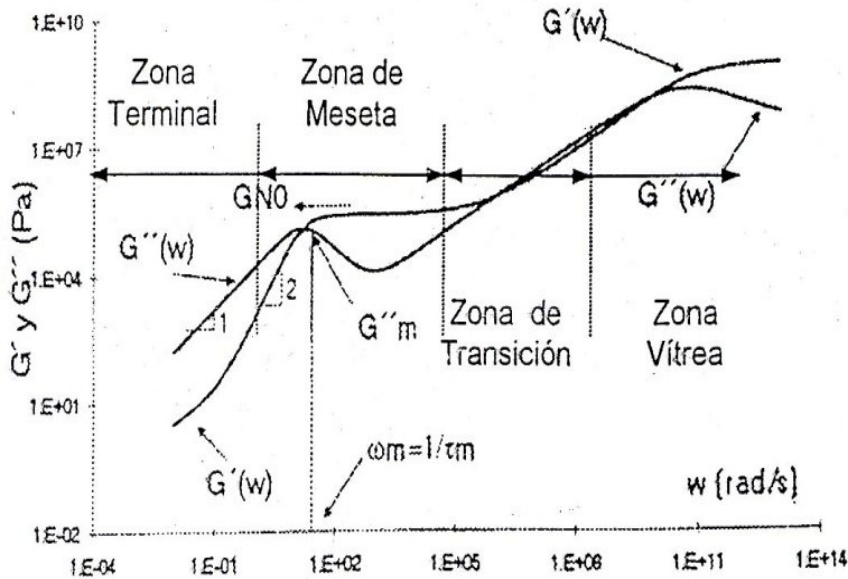


Figura 7. Curva maestra para los módulos de almacenamiento y de pérdida en el dominio de la frecuencia (Medina-Torres, 2005).

El conocimiento de las propiedades viscoelásticas y de flujo de los sistemas emulsionantes tiene gran aplicación en ingeniería, ya que nos permite diseñar e instrumentar la tecnología para su formulación, transporte y almacenamiento. Los estudios reológicos proveen de información muy valiosa para determinar la estabilidad y microestructura de los sistemas dispersos (Pal, 1996), así como de la naturaleza y fuerza de las interacciones intergotas provocadas por la adsorción de las moléculas con actividad superficial. Estudios reológicos comparativos han demostrado el incremento en estabilidad que se presenta en las emulsiones

estabilizadas con mezclas de biopolímeros comparado con emulsiones estabilizadas con biopolímeros individuales. Chen y Dickinson (1998) determinaron, midiendo como variable la viscosidad aparente interfacial en la interfase agua-aceite, que la película interfacial constituida por la mezcla de proteínas β -Lactoglobulina y gelatina presenta mejores propiedades viscosas que las películas formadas por los constituyentes puros. Cuando uno de los biopolímeros se comporta como un polielectrolito fuerte, puede interactuar con otro de carga opuesta para formar un complejo biopolimérico de comportamiento predominantemente elástico (de Kruif, Weinbreck y de Vries, 2004), sin embargo, algunos sistemas como los formados con quitosano y goma arábica muestran comportamientos reológicos donde el carácter viscoso domina sobre el componente elástico (Espinosa-Andrews, Sandoval-Castilla, Torres, Vernon-Carter y Lobato-Calleros, 2009). En ambos casos el pH juega un papel muy importante, puesto que existen intervalos bien definidos de pH en los cuales existe interacción entre biopolímeros y existe un valor de pH al cual la interacción entre los biopolímeros se maximiza. Esta variación en la interacción entre los biopolímeros en función del pH, repercute en la estructura de los complejos biopoliméricos formados, y por consecuencia en sus propiedades reológicas. Se ha demostrado que cuando existe una mayor interacción electrostática entre biopolímeros se obtienen complejos biopoliméricos más viscosos comparados con complejos biopoliméricos formados a valores de pH donde la interacción es más débil (Weinbreck, Wientjes, Nieuwenhuijse, Robjin y de Kruif, 2004).

Chen y Dickinson (1998) hacen alusión a las mejoras que proporciona el uso del suero de leche como agente emulsificante y sobre las interacciones que presenta, analizando los módulos de pérdida (relacionado al comportamiento viscoso) y de almacenamiento

(relacionado al comportamiento elástico) del sistema. Los mismos autores también llevaron a cabo un estudio sobre las interacciones al usar la β -Lactoglobulina y tensoactivos mediante el estudio de los módulos ya descritos. Hemart, Hall, Munro y Singh (2002), caracterizaron las interacciones que presenta la κ -Carragenina con las proteínas κ -Caseína, β -Lactoglobulina mediante la estimación de las propiedades reológicas de los geles (sistemas con estructura más similar a un sólido que a un líquido); los estudios indicaron que la gelación de las proteínas es acelerada por la adición del polisacárido.

Dickinson (1999) presenta un estudio completo sobre películas de proteínas adsorbidas en interfases fluidas, en donde relaciona las características de las interacciones y las características estructurales de los sistemas mediante reología superficial de corte. Otros estudios de Roth, Murray, y Dickinson (2000), presentan los efectos que tienen los tratamientos térmicos y el desplazamiento por tensoactivos iónicos de las películas interfaciales formadas con β -Lactoglobulina sobre las propiedades reológicas de los sistemas analizados. Por lo tanto, de acuerdo a estos estudios, es posible analizar la estabilidad de un sistema en emulsión mediante el monitoreo del cambio de sus propiedades reológicas en estado estacionario y en estado transiente.

5. JUSTIFICACIÓN

El hierro biglicinado representa una gran alternativa para ser usado como fortificante de alimentos, sin embargo, tiene dos inconvenientes importantes que limitan su consumo y/o sus propiedades funcionales: (1) interactúa químicamente con otros componentes alimenticios, alterando el sabor de los alimentos a los cuales es adicionado, y (2) es fácilmente oxidado a su forma férrica. En este proyecto se cree que ambos inconvenientes pueden resolverse incorporando el hierro biglicinado en la fase acuosa interna de una emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ estabilizada con complejos biopoliméricos, de manera que la difusión del hierro hacia el exterior y la difusión de agentes prooxidantes al interior sean controlados por las membranas interfaciales formadas en las interfases aceite-agua internas y externas.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General

- Entrampar hierro biglicinado en la fase acuosa interna de emulsiones múltiples agua en aceite en agua ($W_1/O/W_2$) estabilizadas con complejos biopoliméricos proteína:polisacárido en la interfase aceite-agua externa, y determinar el efecto de las concentraciones, las proporciones relativas entre los biopolímeros y el pH de mayor acomplejamiento electrostático sobre: (a) el tamaño de gota y estabilidad de las emulsiones $W_1/O/W_2$; (b) el rendimiento de encapsulación de hierro biglicinado; (c) la protección que brindan las emulsiones contra la oxidación del hierro biglicinado; (d) las cinéticas de liberación de hierro biglicinado desde la fase acuosa interna hacia la fase acuosa externa de las emulsiones múltiples; y (e) el comportamiento reológico de las emulsiones múltiples.

6.2. Objetivos particulares

- Establecer la concentración, relación y tipo de tensoactivos adecuados para diseñar una emulsión primaria W_1/O con tamaño de partícula, fracción volumétrica de fase dispersa (ϕ) y estabilidad deseadas.
- Determinar intervalos de pH donde exista la mayor interacción entre biopolímeros que permitan la formación de complejos electrostáticos adecuados para la estabilización de las emulsiones $W_1/O/W_2$.
- Establecer la concentración, relación, y tipo de biopolímeros termodinámicamente compatibles para producir una emulsión $W_1/O/W_2$ estable que contenga Fe^{2+} biglicinado en la fase acuosa interna.
- Evaluar la eficiencia de entrampamiento de la emulsión y el efecto protector de la emulsión contra la oxidación del hierro biglicinado en el tiempo.
- Determinar la cinética de liberación del hierro biglicinado entrampado en las emulsiones $W_1/O/W_2$.
- Estimar la respuesta mecánica al flujo y viscoelástica de las emulsiones múltiples.

7. HIPÓTESIS

Es posible formar membranas interfaciales con mezclas de agentes tensoactivos en la emulsión primaria y con complejos biopoliméricos en la interfase aceite-agua externa de la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ que permitan estabilizarla cinéticamente contra mecanismos agregativos y controlar la difusión de materia hacia dentro y fuera de la emulsión múltiple, protegiendo al hierro biglicinado contra la oxidación.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Materiales

La fase acuosa interna (W_1) de las emulsiones fue formada por una solución de hierro biglicinado al 30% de sólidos. El hierro biglicinado en polvo fue proporcionado por UNIPHARM de México, S.A. de C.V. (Veracruz, México), conteniendo 18-20% de hierro elemental. La fase oleosa (O) estuvo formada por aceite mineral (NF-85 grado alimenticio) adquirido de Materiales y Abastos Especializados, S.A. de C.V. (México, D.F., México). Para la estabilización de la emulsión primaria (W_1/O) se empleó una mezcla de tensoactivos de diferente solubilidad. El tensoactivo preferentemente hidrosoluble (WS) Panodan SDK (ésteres de mono y diglicéridos del ácido diacetil tartárico) y el tensoactivo preferentemente liposoluble (OS) Grindsted PGPR 90 (ésteres de ácidos grasos de poliglicerol y polirricinoleato) fueron adquiridos de Danisco México, S.A. de C.V. (Jalisco, México). Los complejos biopoliméricos formados para estabilizar a la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ en su interfase aceite-agua externa, consistieron de concentrado de proteína de suero de leche (WPC; Hilmar 8000) conteniendo 80% proteína en base seca que fue adquirido de Hilmar Ingredients (Hilmar, CA, USA), y tres fuentes de polisacáridos, goma de mezquite (MG), que fue recolectada en forma de lágrima en el estado de San Luis Potosí, México, pulverizada en un molino Bicolor y, para detener la actividad enzimática, se disolvió en agua a 70°C por una hora en un recipiente enchaquetado marca Polinox utilizando un agitador de propela, posteriormente fue filtrada la solución y secada por aspersión con una temperatura de entrada de 175°C (Vernon-Carter, Gómez, Beristain, Mosqueira, Pedroza-Islas y Moreno-Terrazas, 1996), pectina de bajo metoxilo (LMP) proporcionada por Dannova Química, S.A. de C.V.

(México, D.F., México), y goma arábiga (GA) adquirida de Sigma-Aldrich Química S.A. de C.V. (Toluca, Estado de México, México). Para la determinación de hierro se utilizaron los siguientes reactivos analíticos: α, α' -bipiridilo adquirido de Sigma-Aldrich Química S.A. de C.V. (Toluca, Estado de México, México), ácido ascórbico adquirido de Tecsiquim S.A. de C.V. (Toluca, Estado de México, México), estándar de hierro en polvo (99.99%), acetato de sodio anhidro adquirido de Productos Químicos Monterrey, S.A. (Monterrey, Nuevo León, México), y ácido acético glacial adquirido de J.T. Baker, S.A. de C.V. (Xalostoc, Estado de México, México). En todos los experimentos se utilizó agua desionizada, y se utilizó azida de sodio (Hycel de México, S.A. de C.V., México, D.F., México) al 0.02% como conservador de las soluciones de biopolímeros.

8.2. Preparación de las emulsiones

Las emulsiones múltiples $W_1/O/W_2$ se prepararon a 25°C usando un procedimiento de emulsión de dos etapas (Rodríguez-Huezo, Pedroza-Islas, Prado Barragán, Beristain y Vernon-Carter, 2004). Dicho procedimiento fue modificado usando sonicación (Sonics Vibra Cell VCX 130 PB, Sonics & Materials, Inc., Newton, CT, USA) en vez de usar un instrumento de rotor-estator para la homogenización de las emulsiones, con objeto de disminuir la incorporación de oxígeno al sistema en emulsión.

8.2.1 Formulación de la emulsión primaria (W_1/O)

La primera etapa en la preparación de emulsiones múltiples consiste en preparar la emulsión primaria (W_1/O). Se prepararon emulsiones primarias conteniendo una fracción másica de fase dispersa ($\phi_{W_1/O}$) de 0.5, con diferentes concentraciones totales de tensoactivo (6, 8, 10, 12

y 14% w/w), y diferentes proporciones entre tensoactivos OS:WS (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, y 5:5). Las emulsiones primarias así obtenidas fueron codificadas como $(W_1/O)_{x,y}$, donde el subíndice x denota la concentración total de tensoactivos, y el subíndice y denota la proporción entre tensoactivos OS:WS. En todos los casos, una solución de hierro biglicinado (W_1) al 30% de sólidos fue agregada gota a gota a la fase oleosa (O) homogenizando por medio de sonicación (Sonics Vibra Cell VCX 130 PB, Sonics & Materials, Inc., Newton, CT, USA) a una amplitud de 70% y una frecuencia de 20 kHz por 15 minutos.

8.2.1.1. Tasa de coalescencia de emulsiones $(W_1/O)_{x,y}$

Los tamaños de gota de las emulsiones $(W_1/O)_{x,y}$ fueron determinadas con un Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, U.K.), usando aceite de soya comercial (Índice de refracción de 1.475) como dispersante. El diámetro volumétrico medio ($d_{3,0}$) de las emulsiones fue determinado en el tiempo. La tasa de coalescencia de las emulsiones primarias ($K_{C(W_1/O)_{x,y}}$) fue determinada de acuerdo a lo reportado por Ruiz-Ramos, Pérez-Orozco, Báez-González, Bósquez-Molina, Pérez-Alonso, y Vernon-Carter (2006). La emulsión primaria que presentó la menor tasa de coalescencia fue seleccionada para formular las emulsiones múltiples.

8.2.2. Condiciones para la formulación de las emulsiones múltiples $W_1/O/W_2$

Previo a la formulación de las emulsiones múltiples $W_1/O/W_2$, se determinó el potencial zeta en función del pH, de las soluciones acuosas de los biopolímeros por separado, así como el rendimiento y la composición de los complejos biopoliméricos proteína:polisacárido (Pr:Ps)

formados, y esta información se usó para establecer las condiciones de la fase acuosa externa (W_2).

8.2.2.1. Determinación de potencial zeta

Se prepararon soluciones acuosas al 5% (p/p) de WPC, GA, MG, y al 2% (p/p) de LMP, y se almacenaron a 4°C durante 24 h para permitir su completa hidratación. El potencial zeta de las soluciones acuosas de los biopolímeros se determinó a diferentes valores de pH usando un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK). El pH de las soluciones acuosas de los biopolímeros fue ajustado mediante la adición de ácido clorhídrico (HCl) 0.1N y/o hidróxido de sodio (NaOH) 0.1N. Se construyeron gráficas de potencial zeta contra pH y a partir de éstas se determinó el valor de pH donde existe la máxima diferencia estequiométrica de cargas electrostáticas entre proteína y polisacárido (pH_E).

8.2.2.2. Acomplejamiento proteína:polisacárido, rendimiento de coacervado y diámetro z-promedio

Se prepararon soluciones de mezclas binarias de biopolímeros (Pr:Ps) usando diferentes concentraciones totales de biopolímeros, de 1 a 10% (p/p) para los sistemas binarios WPC:GA y WPC:MG, y de 0.4 a 1.6% (p/p) para el sistema binario WPC:LMP, y a diferentes proporciones (0.5:1, a 4:1), y almacenados por 24 h a 4°C para permitir su completa hidratación. El pH de estas mezclas binarias se ajustó en un intervalo de 1.5 a 5 usando ácido clorhídrico 0.1N, y monitoreados para determinar si se formaba el complejo a través de su precipitación (complejos coacervados). Estas mezclas fueron almacenadas a 4°C durante 48 horas para permitir la completa precipitación de los complejos formados. Los complejos

precipitados fueron separados del sobrenadante por decantación y el precipitado fue deshidratado a 45°C hasta llegar a tener un peso constante. El rendimiento de coacervado fue determinado a partir de la siguiente ecuación:

$$\%RC = \frac{m_C}{m_{BP}} \times 100 \quad (1)$$

donde $\%RC$ es el rendimiento de coacervado, m_{BP} es la masa total de biopolímeros usados en la preparación de la mezcla binaria, y m_C es la masa del complejo coacervado deshidratado.

Adicionalmente, se midió el diámetro z-promedio de los complejos Pr:Ps antes de su deshidratación, por medio de dispersión de rayo láser usando un Malvern Zetasizer Nano ZS, como un medio indirecto de obtener información acerca del grosor de la capa de biopolímeros que sería adsorbida alrededor de las gotas de aceite de las emulsiones múltiples.

8.2.2.3. Composición de los complejos proteína:polisacárido

La composición elemental de los complejos biopoliméricos fue determinada usando un equipo de análisis elemental PE2400 serie II CHNS/O (Perkin-Elmer, USA), calculando las concentraciones totales de carbono, hidrógeno y nitrógeno presentes en los complejos, y usando el nitrógeno como elemento diferencial entre la proteína y el polisacárido utilizado. La cantidad de polisacárido presente en el complejo biopolimérico fue calculado a partir de la siguiente ecuación:

$$\%POLISACÁRIDO = \frac{\%N_C - \%N_{WPC}}{\%N_{PS} - \%N_{WPC}} \times 100 \quad (2)$$

donde $\%N_C$, $\%N_{WPC}$, y $\%N_{PS}$, son las concentraciones de nitrógeno encontradas en los complejos Pr:Ps, en WPC, y en los polisacáridos usados respectivamente.

8.2.2.4. Formulación de emulsiones múltiples $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$

La emulsión primaria $(W_1/O)_{x,y}$ con el menor valor de $K_{C(W_1/O)_{x,y}}$ fue reemulsificada en una mezcla binaria de biopolímeros (WPC:GA, WPC:MG, y WPC:LMP) en solución acuosa, produciendo emulsiones múltiples $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$, donde el subíndice a denota la concentración total de biopolímeros, el subíndice b denota la proporción Pr:Ps, y el subíndice c denota la mezcla binaria de biopolímeros usada. La concentración total y proporción entre los biopolímeros usados para la formulación de las emulsiones múltiples $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ fue establecida en base a los resultados de rendimiento de coacervado. Por lo tanto, se obtuvieron las siguientes emulsiones $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:GA}$, $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:MG}$, y $(W_1/O/W_2)_{0.7\%,2:1,WPC:LMP}$. La reemulsificación de la emulsión primaria se hizo mediante sonicación (Sonics Vibra Cell VCX 130 PB, Sonics & Materials, Inc., Newton CT, USA) con una amplitud de sonicación del 50% y una frecuencia de 20kHz por 15 minutos. La fracción másica de fase dispersa en la emulsión múltiple $(\phi_{W_1/O/W_2})$ fue de 0.2 en todos los casos. Inmediatamente después de haber formado las emulsiones múltiples, se les ajustó el pH al valor en el cual se encontró la máxima formación de complejo Pr:Ps (pH_C), usando HCl 0.1N para permitir la formación de un complejo biopolimérico en la interfase aceite-agua externa.

8.2.2.5. Tasa de coalescencia de las emulsiones múltiples $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$

La tasa de coalescencia de las emulsiones múltiples ($K_{C(W_1/O/W_2)_{a,b,c}}$), fue determinada de acuerdo con la metodología descrita en la sección 8.2.1.1, usando agua en sustitución de aceite de soya como dispersante. Adicionalmente se determinó el parámetro “span”, un parámetro

adimensional que puede proporcionar una medida relativa acerca de la polidispersidad del tamaño de las gotas de las emulsiones, calculado a partir de su distribución de tamaño. Dicho parámetro es obtenido en los resultados dados por el software del analizador de tamaño de partícula Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, U.K.).

8.2.3. Efecto protector de las emulsiones $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ contra la oxidación del hierro biglicinado

El contenido de hierro en estado ferroso (Fe^{2+}), hierro total, y hierro en estado férrico (Fe^{3+}) se determinó espectrofotométricamente (AOAC, 1995, Cap. 18). Se disolvieron 10 mL de la emulsión $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ en HCl (0.2% v/v) y se diluyó con agua para lograr una concentración de ~ 3 mg de hierro total por cada 100 mL. El contenido de Fe^{2+} se determinó por medio de su acomplejamiento con α, α' -bipiridilo a un pH de 4.5 y midiendo la absorbancia a 523 nm usando un espectrofotómetro (Spectronic Genesys 2, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA., USA). El contenido de hierro total se determinó mediante la reducción del Fe^{3+} a Fe^{2+} con ácido ascórbico, y acomplejándolo con α, α' -bipiridilo. El contenido de Fe^{3+} se determinó a partir de la diferencia entre el contenido de hierro total menos el contenido de Fe^{2+} . Estas determinaciones fueron hechas en el tiempo por 480 h.

8.2.3.1. Rendimiento de encapsulación y cinéticas de liberación

La fase acuosa externa (W_2) fue separada de las emulsiones múltiples $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ mediante centrifugación a 1500 rpm por 15 minutos usando una centrífuga de alta velocidad HERMLE Z323K (Hermle, Labortechnik, Germany). Posteriormente se determinó la concentración de hierro total contenido en W_2 durante el tiempo de almacenamiento como una medida de la

cinética de liberación de hierro biglicinado. El rendimiento de encapsulación se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$EY = \frac{Fe_{(W_1/O/W_2)} - Fe_{W_2}}{Fe_{(W_1/O/W_2)}} \times 100 \quad (3)$$

donde EY es el rendimiento porcentual de encapsulación de hierro biglicinado, $Fe_{(W_1/O/W_2)}$ es la cantidad de hierro total presente en la emulsión múltiple $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$, y Fe_{W_2} es la cantidad de hierro total presente en la fase acuosa externa (W_2). EY se determinó para las emulsiones recién preparadas y para las emulsiones después de 20 días de almacenamiento.

Las cinéticas de liberación de hierro biglicinado desde la fase acuosa interna (W_1) hacia la fase acuosa externa (W_2) de las emulsiones múltiples, fueron ajustadas a los modelos cinéticos presentados en la tabla 4.

8.2.4. Reología de las emulsiones múltiples $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$.

Se evaluaron las propiedades viscoelásticas de las emulsiones $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$, aplicando un barrido de deformación a 1 rad s^{-1} para determinar la región viscoelástica lineal de los sistemas; una vez establecida dicha región se realizó un barrido de frecuencia de $0.1\text{-}600 \text{ rad s}^{-1}$ y se determinaron los módulos de pérdida (G'') y almacenamiento (G'). Para obtener las curvas de flujo se realizó un barrido de velocidad de cizallamiento de $1\text{-}600 \text{ s}^{-1}$. Con los datos obtenidos de las propiedades viscoelásticas y las curvas de flujo se construyeron gráficas para probar la regla de Cox-Merz. Todas las determinaciones se realizaron en un reómetro TA AR2000 (Waters-TA Instruments, México) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y utilizando una geometría de cilindros concéntricos.

8.2.5. Análisis estadístico

Los datos experimentales fueron analizados usando un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y una prueba de Tuckey como estadístico de prueba para una significancia estadística $p \leq 0.05$, usando el software NCSS 2000 (Kaysville, Utah, USA). Se construyeron diseños factoriales completamente al azar, siendo de $5^2 \times 2$ para la formulación de la emulsión primaria, y de $5^2 \times 8 \times 3 \times 2$ para la determinación de las condiciones para la formulación de las emulsiones múltiples. Todos los experimentos fueron hechos por duplicado.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1. Caracterización de la emulsión primaria $(W_1/O)_{x,y}$

El efecto de la proporción entre tensoactivos (OS:WS) sobre el tamaño de gota $d_{3,0}$ de las emulsiones primarias $(W_1/O)_{x,y}$ preparadas con una concentración total de biopolímeros de 10% ($x=10\%$) en función del tiempo se muestra en la figura 7. Un efecto similar se

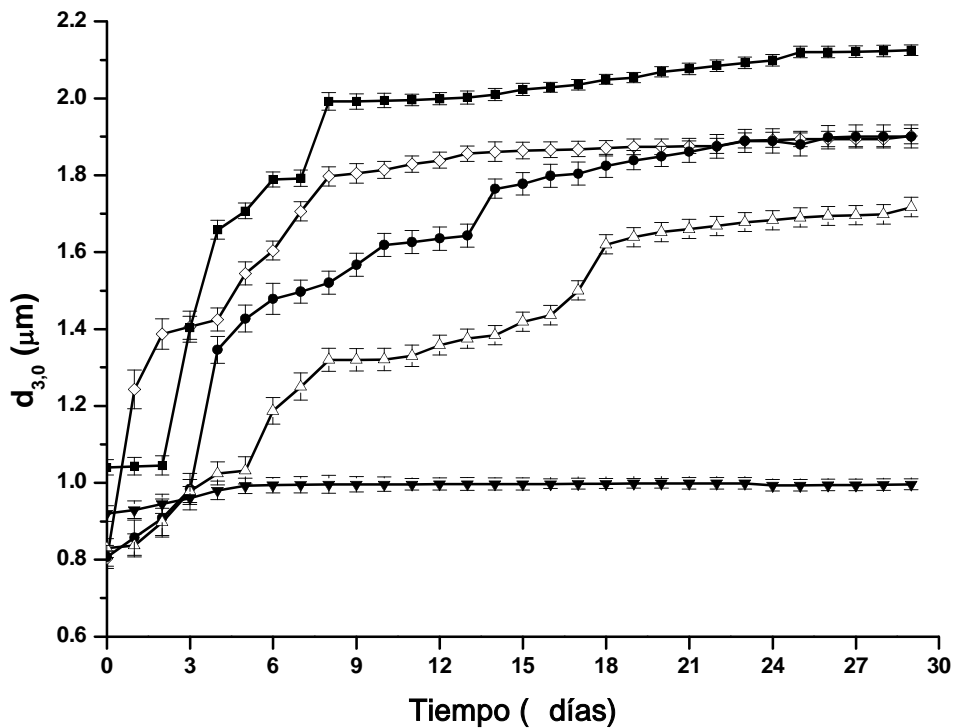


Figura 8. Cambio en el diámetro volumétrico medio ($d_{3,0}$) de las emulsiones primarias: $(W_1/O)_{10\%,9:1}$ (◇); $(W_1/O)_{10\%,8:2}$ (●); $(W_1/O)_{10\%,7:3}$ (Δ); $(W_1/O)_{10\%,6:4}$ (▼); y $(W_1/O)_{10\%,5:5}$ (■) en el tiempo.

observó para las concentraciones totales de tensoactivo de 6, 8, 12 y 14% (Anexo 13.3). El $d_{3,0}$ de las emulsiones primarias recién preparadas varió en un intervalo de 0.8 a 2 μm , incrementándose en proporción inversa a la concentración de OS (Fig. 8). Después de 30 días de almacenamiento a temperatura ambiente, el $d_{3,0}$ de las emulsiones primarias se incrementó significativamente cuando fueron preparadas con una concentración total de tensoactivos

menor que 9% (p/p). La $K_{C(W1/O)x,y}$ no varió significativamente cuando la concentración total de tensoactivo fue mayor que 10% (p/p), indicando que las emulsiones tuvieron una buena estabilidad contra la coalescencia de las gotas de acuerdo a los criterios establecidos por Kitchener y Mussellwhite (1969). El valor de $K_{C(W1/O)x,y}$ de las emulsiones primarias más estables se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Tasas de coalescencia ($K_{C(W1/O)x,y}$) de las emulsiones primarias $(W1/O)_{x,y}$. El subíndice x denota la concentración total de tensoactivos y el subíndice y denota la proporción entre tensoactivos (OS:WS).

$(W1/O)_{x,y}$		$K_{C(W1/O)x,y}$
x	y	(s^{-1})
6	9:1	1.15×10^{-5} b
	8:2	1.23×10^{-5} a
	7:3	1.45×10^{-5} a
	6:4	1.91×10^{-6} d
	5:5	1.82×10^{-6} c
8	9:1	1.81×10^{-6} c
	8:2	1.87×10^{-6} c
	7:3	1.85×10^{-6} c
	6:4	1.47×10^{-6} d
	5:5	1.84×10^{-6} c
10	9:1	6.51×10^{-7} f
	8:2	9.52×10^{-7} e
	7:3	9.16×10^{-7} e
	6:4	2.52×10^{-7} g
	5:5	8.99×10^{-7} e
12	9:1	6.72×10^{-7} f
	8:2	9.48×10^{-7} e
	7:3	9.20×10^{-7} e
	6:4	2.53×10^{-7} g
	5:5	9.12×10^{-7} e
14	9:1	9.45×10^{-7} e
	8:2	5.52×10^{-7} f
	7:3	4.16×10^{-7} f
	6:4	2.52×10^{-7} g
	5:5	3.95×10^{-7} f

Los valores en la misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

El menor valor de $K_{C(W_1/O)_{x,y}}$ se logró con una proporción OS:WS de 6:4 y una concentración total de tensoactivos a partir del 10% (p/p). El incremento de la concentración total de tensoactivos por arriba del 10% (p/p) no produjo una disminución significativa del valor de $K_{C(W_1/O)_{x,y}}$, de tal manera que la emulsión primaria $(W_1/O)_{10\%,6:4}$ fue usada como fase dispersa en la elaboración de las emulsiones múltiples $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$.

9.2. Efecto del pH, concentración, y proporción de biopolímeros sobre el rendimiento de coacervado

Como se puede apreciar en la figura 9, el punto isoeléctrico (pI) del WPC es 4.3 (fuerza iónica ~ 0.02), mientras que el pH al cual los polisacáridos (GA, MG, LMP) pierden la capacidad de ionización de sus grupos carboxilos fue cercano a 1.5 (fuerza iónica ~ 0.04). Se han reportado valores similares para GA y proteína de suero (WP) por Weinbreck, Wientjes, Nieuwenhuijse, Robjin y de Kruif (2004).

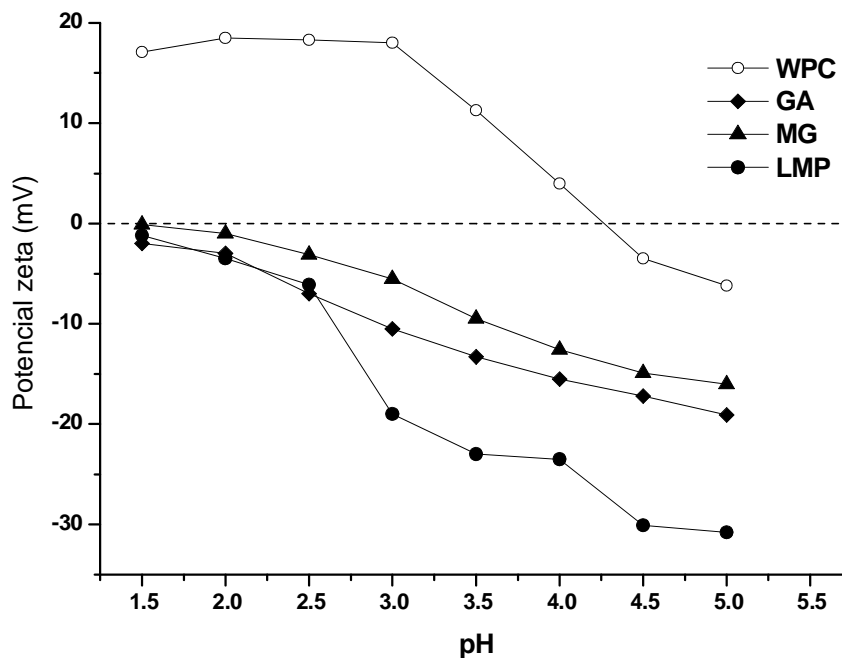


Figura 9. Potencial zeta en función del pH para las soluciones de biopolímeros: (○) WPC; (◆) GA; (▲) MG; y (●) LMP.

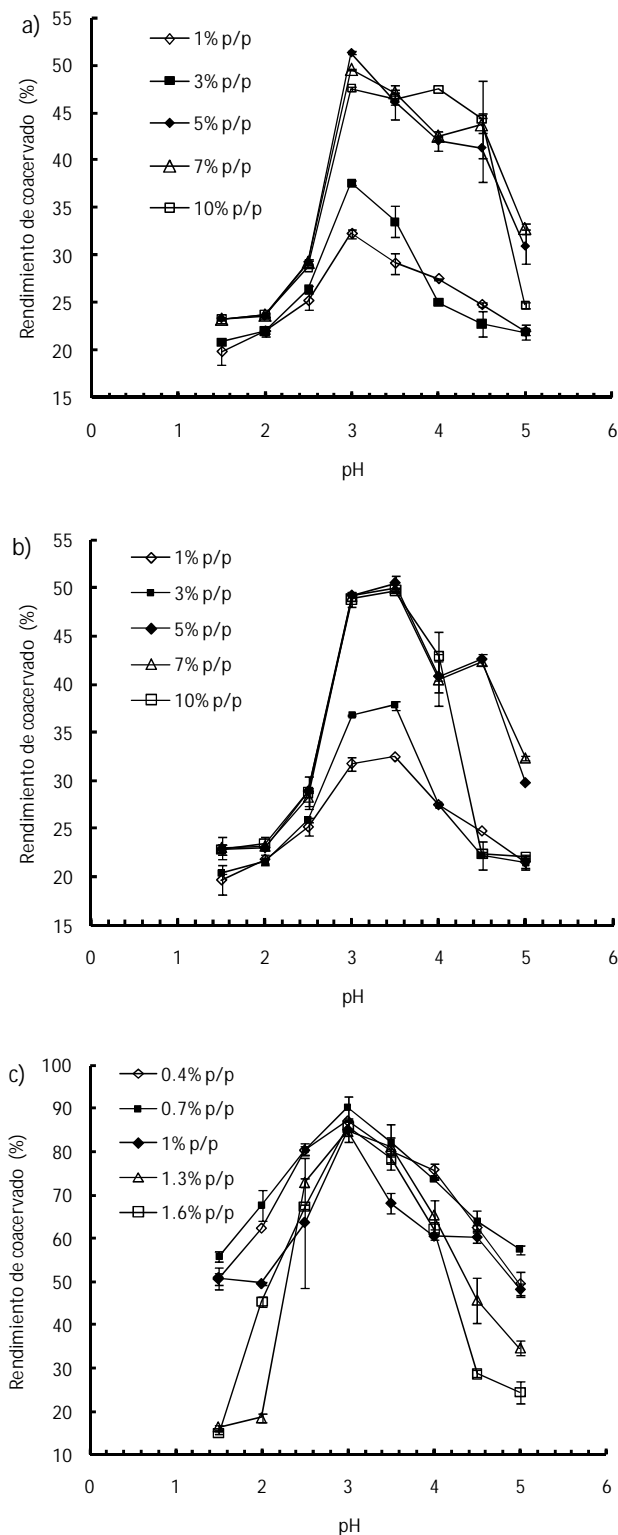


Figura 10. Rendimiento de coacervado en función del pH y la concentración total de biopolímeros para los sistemas binarios: a) WPC:GA; b) WPC:MG; y c) WPC:LMP.

Las interacciones entre WPC y los polisacáridos fueron establecidas a través de barridos de potencial zeta de soluciones acuosas de biopolímeros en un intervalo de pH de 1.5 a 5. El valor de pH_E varió dependiendo del polisacárido usado, resultando un pH_E igual a 3 para el sistema binario WPC:GA, 3.5 para el sistema WPC:MG, y 3.0 para el sistema WPC:LMP (Fig. 9). De la figura 9 también se puede observar que el máximo rendimiento de coacervado para las mezclas binarias WPC:GA (51.35%) y WPC:MG (50.59%) ocurrió a una concentración total de biopolímeros de 5% (p/p). Cuando la concentración total de biopolímeros disminuyó a 3% y 1% (p/p), el rendimiento total de coacervado disminuyó significativamente, pero permaneció prácticamente constante cuando la concentración total de biopolímeros se incrementó a 7 y 10% (p/p) (Fig. 9a, b). Este efecto de la concentración total de biopolímeros sobre el rendimiento de coacervado puede ser quizá mejor explicado en términos del comportamiento polielectrolítico de las macromoléculas (Pasika, 1977). La ionización de los grupos funcionales unidos al polielectrolito contribuyen a su solubilidad, de manera que cuando un polielectrolito se disuelve, actúa como un poli-ion, el cual atrae una gran cantidad de iones individuales de carga opuesta (contra-iones), los cuales se unen fuertemente a los grupos ionizables presentes en la estructura macromolecular del poli-ion, y aunque el poli-ion tiene movilidad, los contra-iones no tienen esa misma posibilidad. No todos los contraiones son libres de moverse. Los iones libres forman una nube de contra iones sobre el poli-ion, mientras que los iones sin movilidad se unen a sitios o puntos específicos de la estructura macromolecular. Conforme la solución de polielectrolitos se diluye, la molécula se va expandiendo y los sitios específicos de unión de contraiones en la macromolécula se van exponiendo, construyendo la carga del macro-ion. La expansión de la estructura macromolecular no puede ocurrir indefinidamente debido a las limitaciones de flexibilidad

que presentan las estructuras moleculares. Entre más se expande un poli-ion, mas “rígida” es su estructura y los sitios expuestos tienen menos libertad para interactuar con los contra-iones. Este fenómeno, además del hecho de que el número de poli-iones disponibles en sistemas diluidos es menor, explican la disminución del rendimiento de coacervado a bajas concentraciones de biopolímeros. A concentraciones relativamente altas de biopolímeros, el grado de ionización de la macromolécula es menor y la flexibilidad de la estructura macromolecular es mucho mayor conforme está menos expandido, de tal manera que sus sitios de interacción están más fácilmente disponibles para interactuar con los contra-iones, resultando en valores más altos de rendimiento de coacervado. Estos resultados son importantes porque ellos indican que para tener un eficiente rendimiento de coacervado no son adecuadas ni muy altas ni muy bajas concentraciones de biopolímeros (Espinosa-Andrews, Báez-González, Cruz Sosa y Vernon-Carter, 2007). El máximo rendimiento de coacervado para la mezcla binaria WPC:LMP (90.21%) ocurrió al 0.7% (p/p) (Fig. 9c), lo cual fue casi dos veces mejor rendimiento que los obtenidos para las mejores concentraciones de las mezclas WPC:MG y WPC:GA (5-10%) (Fig. 9a, b). Estas diferencias de rendimiento de coacervado pueden atribuirse a la diferencia en las estructuras moleculares de los polisacáridos. Mientras que MG y GA consisten de una mezcla de heteropolímeros de arabinogalactano altamente ramificados (Fenyo y Vandeveld, 1990; Vernon-Carter, Beristain y Pedroza-Islas, 2000), La característica predominante en la estructura molecular de LMP es una cadena lineal de unidades de ácido D-galacturónico unidas con enlaces α -(1→4)- con proporciones variables de los grupos ácidos presentes como metoxil (metil) ésteres (Voragen, Pilnik, Thibault, Axelos y Renard, 1995). Un macro-ion lineal (LMP) continuaría expandiéndose más en ausencia de una limitación estructural, comparado con un macro-ion

ramificado (MG y GA) el cual alcanza un límite de expansión antes que el macro-ion lineal (Pasika, 1977). Por lo tanto, LMP tiene una mayor capacidad de interacción.

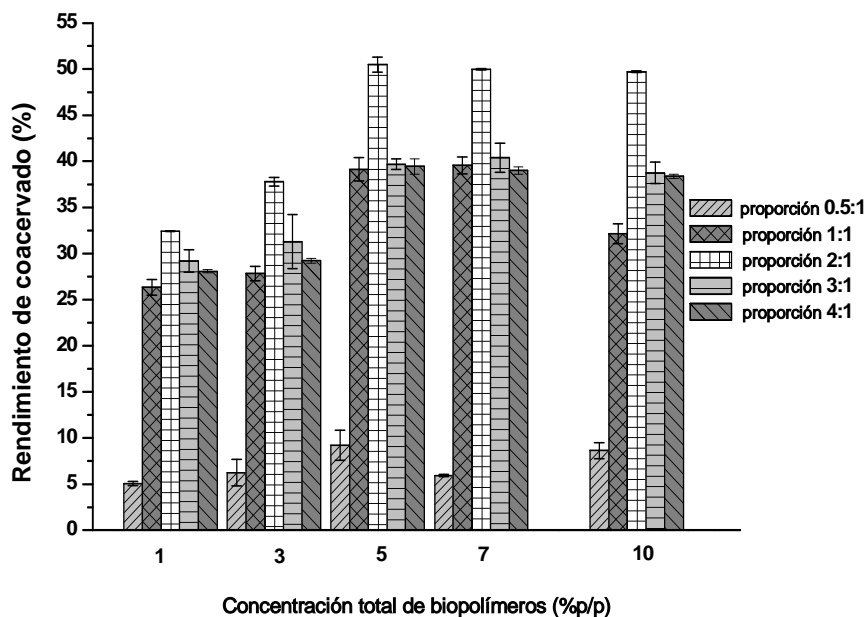


Figura 11. Rendimiento de coacervado basado en la proporción entre biopolímeros y la concentración total de WPC:MG a pH 3.5 en la fase acuosa externa de las emulsiones múltiples.

El rendimiento de coacervado no sólo fue afectado por la concentración total de biopolímeros usada, sino también por la proporción entre los biopolímeros. En la Figura 11, se observa que el máximo rendimiento de coacervado fue obtenido al pH_E usando una proporción Pr:Ps igual a 2:1 para la mezcla binaria WPC:MG. Para las mezclas binarias WPC:GA y WPC:LMP se obtuvieron resultados similares (datos no mostrados). Esta proporción fue confirmada experimentalmente mediante la determinación del número de equivalentes químicos de cada biopolímero por titulación con NaOH 0.1N, siendo 0.7 mEq/g para GA, 1.35 mEq/g para MG, y 1.3 mEq/g para LMP. La concentración de GA, MG, y LMP en los coacervados fue determinada mediante análisis elemental, y fue usada como indicativo del rendimiento de

coacervado. La concentración máxima de polisacáridos en los coacervados coincidió con el pH_C , usando una concentración total de biopolímeros de 5% para WPC:GA y WPC:MG, y 0.7% para WPC:LMP, y una proporción entre biopolímeros de 2:1, lo cual estuvo de acuerdo con los resultados expresados anteriormente.

9.3. Caracterización de las emulsiones múltiples $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$

Todas las emulsiones múltiples formadas fueron de tipo C (Fig. 12) donde la mayoría de las gotas de la emulsión múltiple contienen un número sustancial de gotas internas; las gotas internas en una emulsión tipo C se encuentran usualmente floculadas y compactas (Dickinson y McClements, 1996). Las mezclas binarias de biopolímeros afectaron significativamente el $d_{3,0}$ y el parámetro “span” (medida relativa de la polidispersidad) de las emulsiones múltiples $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ recién preparadas, y en consecuencia el valor de $K_{C(W_1/O/W_2)_{a,b,c}}$ (Tabla 6). La emulsión $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:MG}$ mostró los valores más bajos de $d_{3,0}$ inicial, parámetro “span” y $K_{C(W_1/O/W_2)_{a,b,c}}$, seguido por la emulsión $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:GA}$, y por $(W_1/O/W_2)_{0.7\%,2:1,WPC:LMP}$ respectivamente. Por lo tanto, un menor valor del parámetro “span” inicial combinado con un tamaño de gota más pequeño en las emulsiones recién preparadas, dio como resultado emulsiones con mayor estabilidad, es decir, un menor cambio en su tamaño de partícula por unidad de volumen en el tiempo (Fig. 13). Las emulsiones alimenticias normalmente contienen un intervalo de diferentes tamaños de gota y las gotas más grandes tienden a cremar más rápidamente que las gotas pequeñas, de tal manera que existe una distribución de tasas de cremado en una emulsión, con la resultante neta de que existen tanto un perfil de concentraciones de gotas como un perfil de tamaños de gotas, en dirección vertical, en una emulsión. Como las gotas más grandes se mueven hacia arriba más

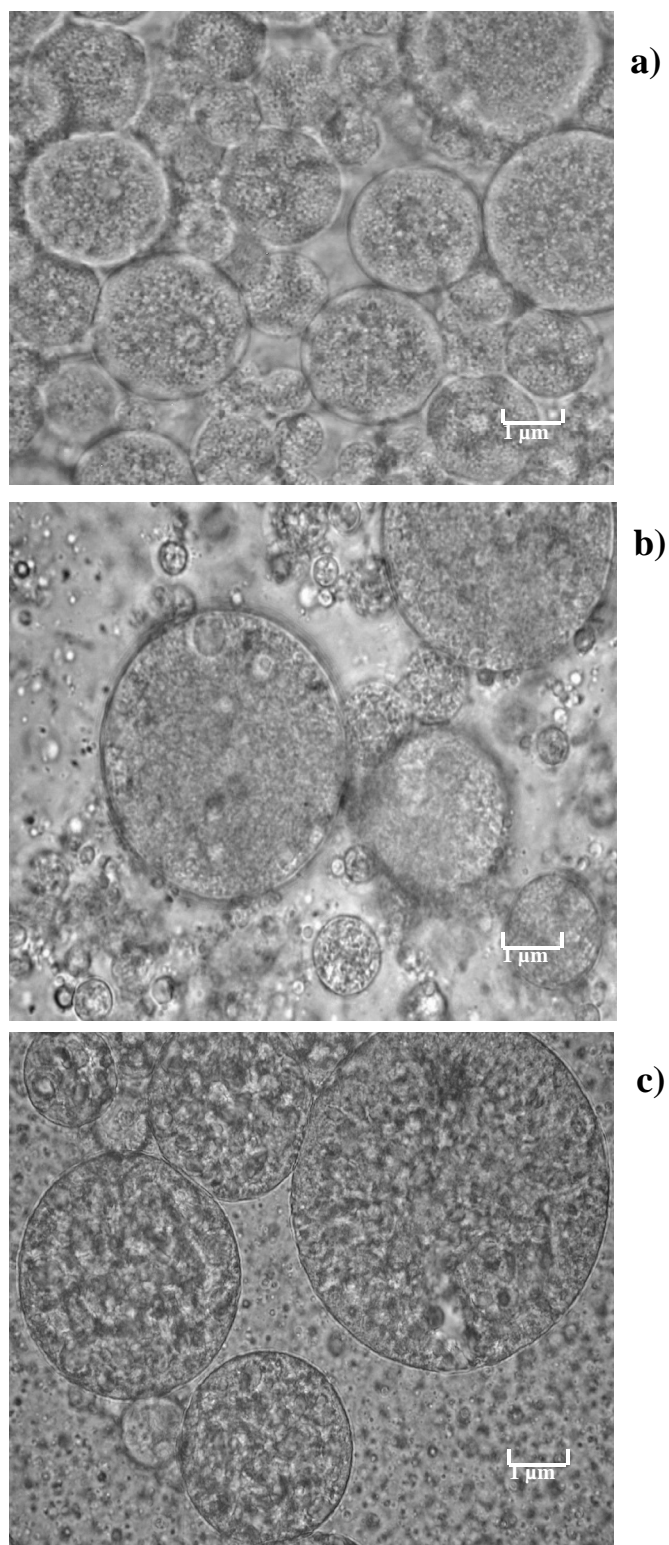


Figura 12. Micrografías de la emulsión múltiple $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:MG}$ conteniendo hierro biglicinado: a) inmediatamente después de haber sido preparada, b) después de 2 días de almacenamiento, y c) después de 20 días de almacenamiento.

Tabla 6. Tamaño de gota a tiempo cero y $K_{C(W_1/O/W_2)_{a,b,c}}$ de las emulsiones múltiples $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ después de 20 días de almacenamiento.

Emulsiones múltiples $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$			Tamaño $d_{3,0}$ de emulsiones múltiples $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ (μm)	Parámetro Span (adimensional)	K_C $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ después de 20 días de almacenamiento (s^{-1})
a	b	c			
5.0%	2:1	WPC:GA	$3.24 \pm 0.08_b$	$3.85 \pm 0.04_b$	$8.16 \times 10^{-7}_b$
5.0%	2:1	WPC:MG	$2.05 \pm 0.07_a$	$1.70 \pm 0.03_a$	$7.09 \times 10^{-7}_a$
0.7%	2:1	WPC:LMP	$7.97 \pm 0.39_c$	$8.79 \pm 0.18_c$	$1.25 \times 10^{-6}_c$

Los valores en la misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

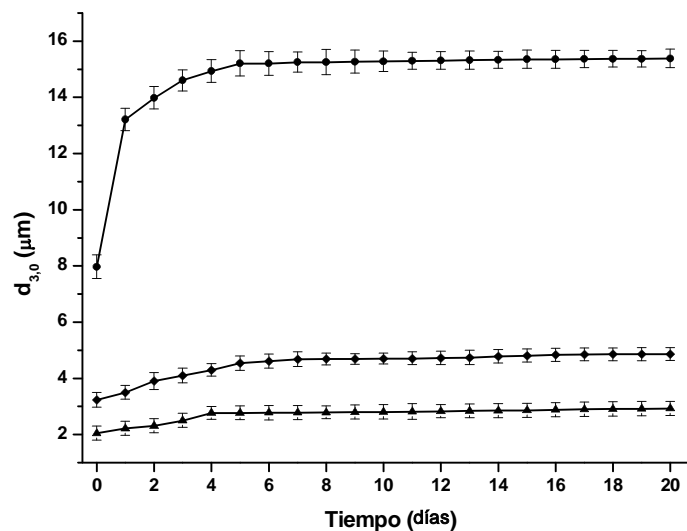


Figura 13. Cambio en el diámetro volumétrico medio ($d_{3,0}$) de las emulsiones múltiples: $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:GA}$ (◆), $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:MG}$ (▲), y $(W_1/O/W_2)_{0.7\%,2:1,WPC:LMP}$ (●) en el tiempo.

rápido, ellas colisionan con gotas más pequeñas en su trayecto (McClements, 2005), formando agregados tridimensionales de gotas que eventualmente coalescen y desestabilizan las emulsiones.

9.4. Efecto protector de las emulsiones múltiples $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ contra la oxidación del hierro biglicinado

Todas las emulsiones $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ mostraron una disminución significativa en su contenido de Fe^{2+} durante el tiempo de almacenamiento, lo cual se ilustra con los subíndices estadísticos

en minúscula para cada columna de concentración de Fe^{2+} en la tabla 7. Dado que las concentraciones de Fe^{2+} no son comparables con los valores de la concentración de Fe^{3+} , los subíndices estadísticos se agruparon en dos, A, B, y C para comparar las concentraciones de Fe^{2+} y J, K, y L para comparar las concentraciones de Fe^{3+} entre las tres distintas formulaciones de emulsiones múltiples a un tiempo determinado de almacenamiento. La emulsión $(\text{W}_1/\text{O}/\text{W}_2)_{5\%,2:1,\text{WPC:MG}}$ presentó la menor diferencia entre el contenido de Fe^{2+} inicial (emulsión fresca) y final (después de 480 h de almacenamiento), seguido por la emulsión $(\text{W}_1/\text{O}/\text{W}_2)_{5\%,2:1,\text{WPC:GA}}$ y $(\text{W}_1/\text{O}/\text{W}_2)_{0.7\%,2:1,\text{WPC:LMP}}$ respectivamente. La emulsión $(\text{W}_1/\text{O}/\text{W}_2)_{0.7\%,2:1,\text{WPC:LMP}}$ no mostró una diferencia significativa en el contenido inicial de Fe^{2+} con respecto a la emulsión $(\text{W}_1/\text{O}/\text{W}_2)_{5\%,2:1,\text{WPC:MG}}$, pero fue la que sufrió la pérdida más drástica del contenido de Fe^{2+} con el tiempo (de 92.0% a 39.78%). Por otro lado, la emulsión $(\text{W}_1/\text{O}/\text{W}_2)_{5\%,2:1,\text{WPC:GA}}$ recién preparada entrampó una cantidad inicial de Fe^{2+} significativamente menor, pero su contenido de Fe^{2+} no fue significativamente menor que el de la emulsión $(\text{W}_1/\text{O}/\text{W}_2)_{0.7\%,2:1,\text{WPC:LMP}}$ al final del tiempo de almacenamiento (Tabla 7). Estos resultados sugieren que tanto la capacidad de entrampamiento de Fe^{2+} como la protección contra la oxidación de hierro biglicinado fueron dependientes del tipo de polisacárido utilizado en el complejo Pr:Ps presente en la membrana interfacial externa de las emulsiones múltiples. La emulsión $(\text{W}_1/\text{O}/\text{W}_2)_{5\%,2:1,\text{WPC:MG}}$ proporcionó una protección significativamente mayor contra la oxidación de hierro biglicinado comparado con la emulsión $(\text{W}_1/\text{O}/\text{W}_2)_{5\%,2:1,\text{WPC:GA}}$ a pesar de que GA y MG poseen una composición química y características fisicoquímicas similares (Vernon-Carter, Beristain y Pedroza-Islas, 2000). Se ha reportado que MG tiene un peso molecular ($\sim 2, 120, 000$ Da) (Vernon-Carter, Pedroza-Islas y Beristain, 1998) considerablemente mayor que GA ($\leq 1, 000, 000$ Da) (Fenyo y

Vandavelde, 1990), lo cual coincide con los resultados de diámetro z-promedio de los complejos Pr:Ps presentados en la Tabla 8, de tal manera que es probable que la capa adsorbida en la interfase externa de la emulsión múltiple conteniendo MG sea más gruesa que la que contiene GA, y que la resistencia que se oponga a la difusión de agentes prooxidantes sea directamente proporcional al grosor de la membrana biopolimérica adsorbida.

Tabla 7. Variación de la cantidad de Fe^{2+} y Fe^{3+} en el tiempo, rendimiento de encapsulación (EY) para las emulsiones múltiples $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$, y pérdida de hierro total en W_1 después de 480 h de almacenamiento.

Tiempo (h)	$(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:GA}$		$(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:MG}$		$(W_1/O/W_2)_{0.7\%,2:1,WPC:LMP}$	
	Fe^{2+} (%)	Fe^{3+} (%)	Fe^{2+} (%)	Fe^{3+} (%)	Fe^{2+} (%)	Fe^{3+} (%)
0	60.38±0.51 _{f,A}	39.62±0.51 _{a,K}	89.88±0.65 _{h,B}	10.12±0.65 _{a,J}	92.01±1.60 _{g,B}	7.99±1.60 _{a,J}
48	59.12±0.70 _{f,B}	40.88±0.70 _{a,K}	87.85±0.52 _{g,C}	12.15±0.52 _{b,J}	57.08±0.45 _{f,A}	42.92±0.45 _{b,L}
72	53.85±0.42 _{e,B}	46.15±0.42 _{b,c,K}	85.72±0.21 _{f,C}	14.28±0.21 _{c,J}	51.24±0.42 _{e,A}	48.76±0.42 _{c,L}
96	53.28±0.31 _{e,B}	46.72±0.31 _{c,K}	85.72±0.15 _{f,C}	14.28±0.15 _{c,J}	47.12±0.49 _{c,d,A}	52.88±0.49 _{d,e,L}
144	50.73±0.25 _{d,B}	49.27±0.25 _{d,K}	84.06±0.38 _{e,C}	15.94±0.38 _{d,J}	47.89±0.30 _{d,A}	52.11±0.30 _{d,L}
168	49.22±0.29 _{d,B}	50.78±0.29 _{d,K}	81.37±0.27 _{d,C}	18.63±0.27 _{e,J}	45.22±0.15 _{c,A}	54.78±0.15 _{e,L}
192	46.80±0.53 _{c,A}	53.20±0.53 _{e,K}	81.97±0.19 _{d,B}	18.03±0.19 _{e,J}	46.30±0.35 _{cd,A}	53.70±0.35 _{d,e,K}
240	55.34±1.65 _{a,B}	44.66±1.65 _{b,K}	77.52±0.54 _{c,C}	22.48±0.54 _{f,J}	42.49±0.61 _{b,A}	57.51±0.61 _{f,L}
336	42.99±0.57 _{b,B}	57.01±0.57 _{f,K}	69.77±0.75 _{a,C}	30.23±0.75 _{h,J}	39.12±0.67 _{a,A}	60.88±0.67 _{g,L}
480	40.58±0.26 _{a,A}	59.42±0.26 _{g,K}	71.25±0.58 _{b,B}	29.75±0.58 _{h,J}	39.78±0.45 _{a,A}	60.22±0.45 _{g,K}
EY (%)	73.84±1.51 _A		88.14±1.64 _B		91.02±1.48 _B	
Pérdida de hierro total en W_1 (%)	36.0±0.53 _B		22.2±0.35 _A		66.3±0.42 _C	

Los valores en la misma columna con diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Los valores de en la misma fila con diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

La emulsión $(W_1/O/W_2)_{0.7\%,2:1,WPC:LMP}$ fue la que menos protegió al hierro biglicinado contra la oxidación, y estos resultados tienden a confirmar que el grosor de la

Tabla 8. Diámetro Z-promedio de los complejos Pr:Ps.

Complejos Pr:Ps	Diámetro z-promedio (nm)
WPC:GA	484.90±0.45 b
WPC:GM	529.40±0.49 c
WPC:LMP	398.10±0.36 a

Los valores con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

capa de biopolímeros adsorbida podría ser en gran medida la responsable del grado de protección brindada contra la oxidación del hierro, debido a que LMP fue el biopolímero con menor peso molecular (~150, 000 Da) y el diámetro z-promedio del complejo WPC:LMP fue el más pequeño de los tres complejos biopoliméricos usados en este trabajo.

Tabla 9. Parámetros cinéticos de liberación para hierro biglicinado desde W_1 hacia W_2 en las emulsiones múltiples ($W_1/O/W_2$)_{a,b,c} durante las primeras 24 h y después de 24 h de almacenamiento para cada modelo cinético probado.

Parámetros cinéticos de liberación en las emulsiones múltiples (primeras 24 h)						
	($W_1/O/W_2$) _{5%, 2:1, WPC:GA}	R ²	($W_1/O/W_2$) _{5%, 2:1, WPC:MG}	R ²	($W_1/O/W_2$) _{0.7%, 2:1, WPC:LMP}	R ²
K_{HC} (min ⁻¹)	2.00 x10 ⁻⁴	0.18	2.00 x10 ⁻⁴	0.11	3.00 x10 ⁻⁴	0.16
K_{PH} (min ⁻²)	4.40 x10 ⁻²	0.66	5.20 x10 ⁻²	0.46	8.00 x10 ⁻²	0.60
K_J (min ⁻¹)	4.60 x10 ⁻¹	0.68	9.00 x10 ⁻¹	0.74	1.60 x10 ¹	0.70
K_0 (mg·mL ⁻¹ ·min ⁻¹)	1.68 x10 ⁻²	0.85	1.64 x10 ⁻²	0.88	2.14 x10 ⁻²	0.84
K_1 (min ⁻¹)	1.10 x10 ⁻³	0.82	1.10 x10 ⁻³	0.84	1.00 x10 ⁻³	0.78
K_2 (mL·mg ⁻¹ ·min ⁻¹)	-9.00 x10 ⁻⁵	0.69	-9.00 x10 ⁻⁵	0.67	-6.00 x10 ⁻⁵	0.56
K_H (mg·mL ⁻¹ ·min ^{-0.5})	7.02 x10 ⁻¹	0.97	6.88 x10 ⁻¹	0.98	8.99 x10 ⁻¹	0.96
Parámetros cinéticos de liberación en las emulsiones múltiples (después de 24 h)						
K_{HC} (min ⁻¹)	7.00 x10 ⁻⁶	0.39	9.00 x10 ⁻⁶	0.86	3.00 x10 ⁻⁵	0.78
K_{PH} (min ⁻²)	1.40 x10 ⁻¹	0.69	1.70 x10 ⁻¹	0.83	5.00 x10 ⁻¹	0.90
K_J (min ⁻¹)	2.40 x10 ⁻³	0.49	2.60 x10 ⁻³	0.82	2.40 x10 ⁻³	0.89
K_0 (mg·mL ⁻¹ ·min ⁻¹)	4.00 x10 ⁻⁴	0.90	3.00 x10 ⁻⁴	0.82	1.90 x10 ⁻³	0.85
K_1 (min ⁻¹)	1.00 x10 ⁻⁵	0.87	8.00 x10 ⁻⁶	0.80	3.00 x10 ⁻⁵	0.85
K_2 (mL·mg ⁻¹ ·min ⁻¹)	-3.00 x10 ⁻⁷	0.85	-2.00 x10 ⁻⁷	0.78	-6.00 x10 ⁻⁷	0.79
K_H (mg·mL ⁻¹ ·min ^{-0.5})	9.43 x10 ⁻²	0.96	7.46 x10 ⁻²	0.92	4.46 x10 ⁻¹	0.93

K_{HC} , K_{PH} , K_J , K_0 , K_1 , K_2 , y K_H son las constantes cinéticas de liberación para los modelos de: Hixson & Crowell, Peppas-Higuchi, Jorgensen & Christensen, orden cero, primer orden, segundo-orden, e Higuchi respectivamente.

El grosor de la capa de biopolímeros adsorbida también parece ser un factor clave que afecta la estabilidad de las emulsiones múltiples contra la coalescencia. Entre mayor fue el peso molecular del polisacárido que formó el complejo biopolimérico Pr:Ps, mayor fue el grosor de la capa adsorbida, mayores fueron las fuerzas de repulsión por efectos estéricos (McClements, 2005), menores fueron los valores de $K_{C(W_1/O/W_2)_{a,b,c}}$, y mayor la estabilidad de las emulsiones múltiples (Tabla 9).

9.5. Rendimiento de encapsulación y cinéticas de liberación

El rendimiento de encapsulación (EY) de las emulsiones múltiples $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ se muestra en la Tabla 7. Los resultados para EY fueron muy similares y siguieron la misma tendencia que los resultados obtenidos para la concentración de Fe^{2+} en las emulsiones múltiples $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$, es decir que las emulsiones $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:MG}$ y $(W_1/O/W_2)_{0.7\%,2:1,WPC:LMP}$ no mostraron diferencia significativa entre sus valores de EY, pero fueron significativamente mayores que para la emulsión múltiple $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:GA}$. La concentración de hierro total en la fase W_1 de las emulsiones múltiples disminuyó significativamente durante el tiempo de almacenamiento, la disminución fue de 22.2% para la emulsión $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:MG}$, 36.0% para la emulsión $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:GA}$, y 63.3% para la emulsión $(W_1/O/W_2)_{0.7\%,2:1,WPC:LMP}$, debido probablemente a que la porción de hierro que fue liberada hacia W_2 se oxidó. En la figura 14 se presentan las curvas experimentales de liberación de hierro biglicinado de las emulsiones múltiples $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$. El ajuste de los datos experimentales a los modelos cinéticos de Hixson & Crowell, Peppas-Higuchi, Jorgensen & Christensen, orden cero, primer orden y segundo orden, resultó en valores de coeficientes de correlación relativamente bajos (R^2 entre 0.11 y 0.9), probablemente debido a

que los datos experimentales mostraron una tendencia a seguir un proceso de liberación global que ocurría en dos etapas consecutivas con diferentes constantes cinéticas de liberación: (1) una etapa de liberación inicial que se caracterizaba por un gradiente inducido por la relativamente alta concentración inicial de hierro total en W_1 comparado con su concentración inicial en W_2 , esta etapa tuvo lugar a periodos de tiempo de almacenamiento relativamente cortos (~ 24 h), y (2) una segunda etapa que ocurrió a periodos de tiempo mayores a 24 h, donde el gradiente disminuyó drásticamente, probablemente debido a que las concentraciones de hierro total entre W_1 y W_2 tienden al equilibrio.

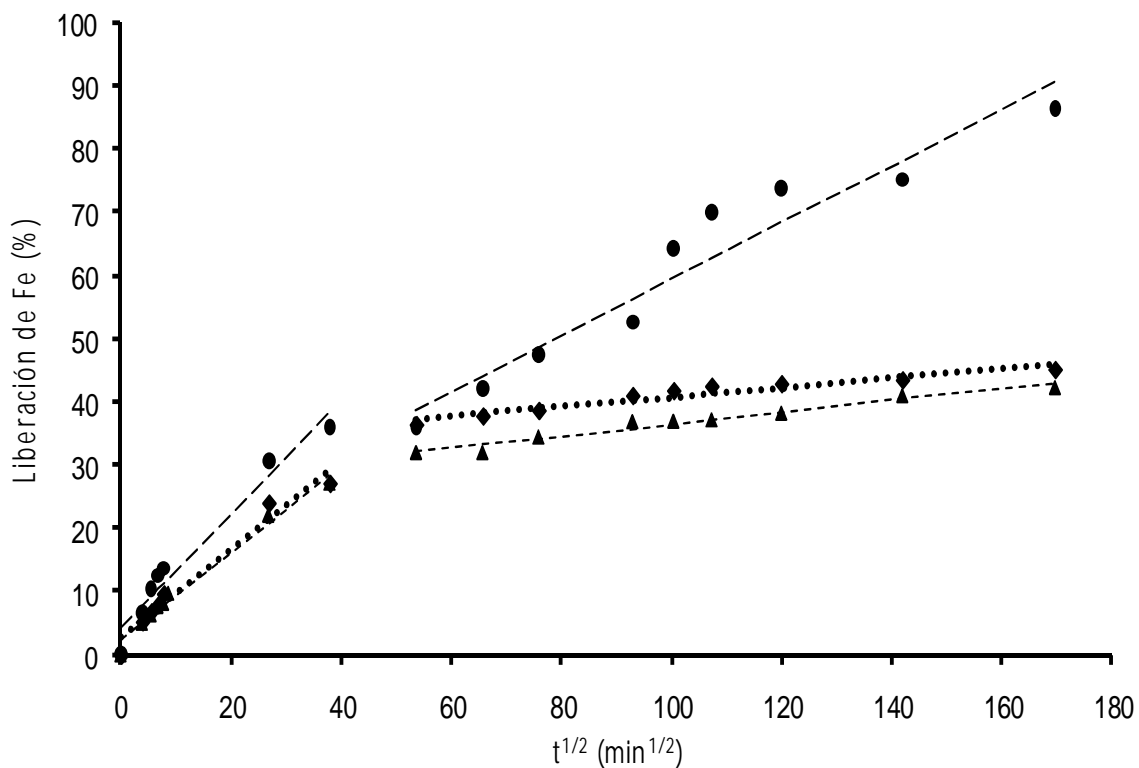


Figura 14. Datos experimentales y predichos teóricamente, usando el modelo de Higuchi (líneas discontinuas), de la liberación de hierro biglicinado de W_1 a W_2 en las emulsiones múltiples: $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:GA}$ (.....; \blacktriangledown), $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:MG}$ (---; \blacktriangle), y $(W_1/O/W_2)_{0.7\%,2:1,WPC:LMP}$ (—; \bullet) en el tiempo.

Los datos experimentales de ambas etapas fueron ajustados al modelo de Higuchi (Higuchi, 1961), obteniendo altos coeficientes de correlación (R^2 de 0.92 a 0.98) (Tabla 9). Las constantes cinéticas de liberación para el modelo de Higuchi (K_H) para ambas etapas tuvieron los siguientes valores en orden ascendente: $0.69 \text{ mg mL}^{-1} \text{ min}^{-0.5}$ para la emulsión $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:MG}$, $0.70 \text{ mg mL}^{-1} \text{ min}^{-0.5}$ para la emulsión $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:GA}$, y $0.90 \text{ mg mL}^{-1} \text{ min}^{-0.5}$ para la emulsión $(W_1/O/W_2)_{0.7\%,2:1,WPC:LMP}$ en la primera etapa o etapa de liberación rápida, y $0.07 \text{ mg mL}^{-1} \text{ min}^{-0.5}$ para la emulsión $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:MG}$, $0.09 \text{ mg mL}^{-1} \text{ min}^{-0.5}$ para la emulsión $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:GA}$, y $0.45 \text{ mg mL}^{-1} \text{ min}^{-0.5}$ para la emulsión $(W_1/O/W_2)_{0.7\%,2:1,WPC:LMP}$ en la segunda etapa, o etapa de liberación lenta. Estos resultados parecen indicar y confirmar que las cinéticas de liberación de hierro biglicinado desde la fase acuosa interna hacia la fase acuosa externa de las emulsiones múltiples son altamente dependientes de la longitud de sus vías de difusión, es decir, entre mayor sea el grosor del complejo interfacial Pr:Ps en las emulsiones múltiples $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$, más lenta será la cinética de liberación.

9.6. Reología de las emulsiones múltiples $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$.

Las curvas de flujo de las emulsiones múltiples $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ recién formadas y después de siete días de almacenamiento se muestran en la Figura 14. Todas las emulsiones múltiples $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ exhibieron un comportamiento reoadelgazante como consecuencia de la rapidez de deformación aplicada. Las gotas de la emulsión son afectadas por la acción de dos fuerzas opuestas cuando son sometidas a un flujo de corte estacionario macroscópico (Pal, 1996), las cuales están dadas por: (1) el esfuerzo viscoso de magnitud $\eta_c \dot{\gamma}$, el cual tiende a deformar en forma longitudinal las gotas (η_c es viscosidad de la fase continua, $\dot{\gamma}$ es la

velocidad de cizallamiento) y (2) el esfuerzo de magnitud σ/R que tiende a minimizar la energía superficial y, por lo tanto, tiende a mantener las gotas en forma esférica (σ es la tensión interfacial y R es el radio de las gotas). Cuando se incrementa la magnitud de la velocidad de cizallamiento, las gotas de las emulsiones empiezan a elongarse en un mayor grado en la dirección del flujo, dando como resultado una disminución en la viscosidad del sistema (carácter pseudoplástico o reoadelgazante).

Las propiedades fisicoquímicas en las interfases tienen un papel importante en la estabilidad de la emulsión múltiple. La elasticidad de la interfase y la repulsión estérica de las gotas son las razones que se antepone para explicar el incremento en la estabilidad de una emulsión (Michaut, Perrin y Hébraud, 2004). Para nuestro caso, estas propiedades son afectadas por el tipo de polisacárido presente en el complejo biopolimérico usado durante la segunda etapa de emulsificación.

La emulsión $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:MG}$ mostró un menor cambio en el comportamiento de flujo después de siete días de almacenamiento (Fig. 15 a), comparado con las emulsiones $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:GA}$, (Fig. 15 b) y $(W_1/O/W_2)_{0.7\%,2:1,WPC:LMP}$ (Fig. 15 c), lo cual es indicativo de que las gotas de la emulsión $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:MG}$ presentan una mayor estabilidad como consecuencia de la adsorción de una película biopolimérica más gruesa en la interfase aceite-agua externa, la cual incrementa la barrera energética interfacial, aumentando la resistencia contra los mecanismos de desestabilización. La Figura 16 muestra los módulos G' y G'' de las emulsiones múltiples $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$. Para las emulsiones $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:MG}$ y $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:GA}$, el módulo viscoso predominó sobre el módulo elástico ($G'' > G'$). La presencia de LMP en la emulsión múltiple $(W_1/O/W_2)_{0.7\%,2:1,WPC:LMP}$ produjo un aumento en el carácter elástico (mayor valor de G').

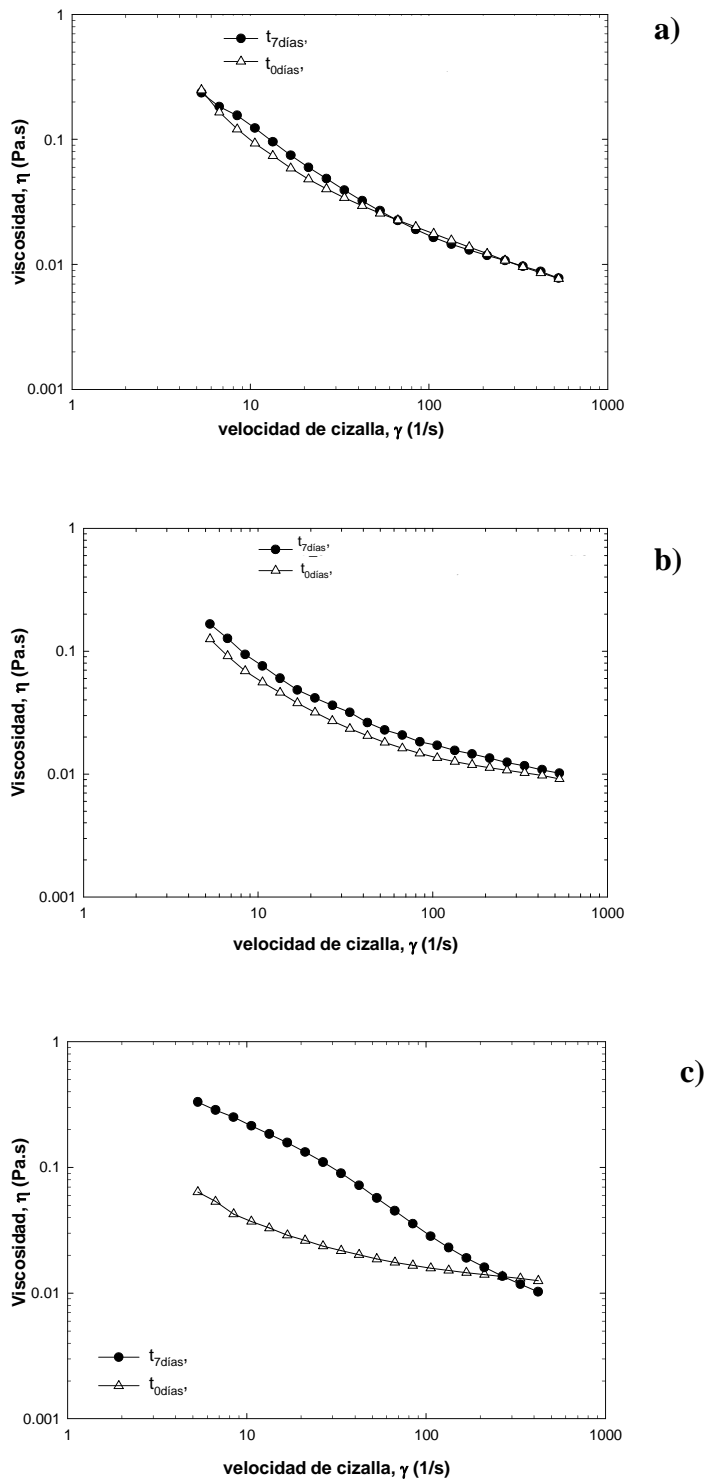


Figura 15. Viscosidad en función de la velocidad de cizalla de las emulsiones múltiples frescas y después de 7 días de almacenamiento: a) $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:MG}$; b) $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:GA}$, y c) $(W_1/O/W_2)_{0.7\%,2:1,WPC:LMP}$.

Dicho carácter se ve maximizado por la interacción del complejo formado por la mezcla WPC:LMP en la interfase aceite-agua externa de la emulsión múltiple, dando como resultado que en la emulsión $(W_1/O/W_2)_{0.7\%,2:1,WPC:LMP}$ el módulo elástico haya predominado sobre el módulo viscoso ($G' > G''$).

La menor estabilidad presentada por la emulsión múltiple $(W_1/O/W_2)_{0.7\%,2:1,WPC:LMP}$ está en estrecha relación con sus características reológicas, puesto que un mayor módulo elástico proporciona mayor dificultad para redispersar la emulsión primaria en la fase acuosa externa que contiene al sistema WPC:LMP, resultando en una emulsión múltiple con mayor tamaño de partícula, mayor polidispersidad (mayor valor del parámetro “span”) y menor estabilidad (mayor valor de $K_{C(W1/O/W2)_{a,b,c}}$) (Tabla 6).

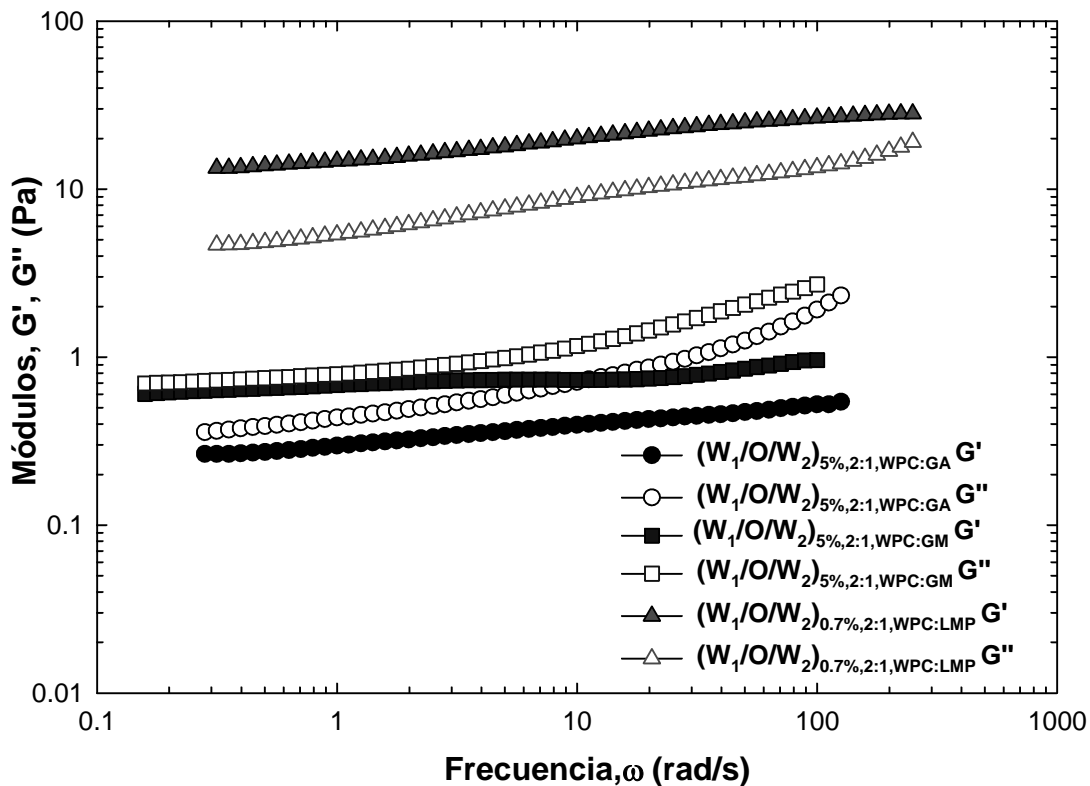


Figura 16. Comportamiento reológico de la emulsión múltiple en función del tipo de polisacárido usado en la formación del complejo biopolimérico.

La regla de Cox-Merz establece que para un material bien estructurado, la viscosidad (obtenida mediante pruebas de flujo) y la viscosidad compleja (obtenida mediante pruebas oscilatorias) son idénticas funciones de la velocidad de corte y de la frecuencia de la oscilación. Aunque carece de una base teórica, este hecho es extrapolado satisfactoriamente en un gran número de sistemas. (Barnes, Hutton y Walters, 1989). De esta forma es posible construir gráficas en las que la viscosidad y la viscosidad compleja se superponen, con lo cual se comprueba la regla de Cox-Merz. En las figuras 17-19 se muestran gráficas para verificar que la regla de Cox-Merz se cumpla en las emulsiones múltiples obtenidas. En la emulsión $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:GA}$, la regla de Cox-Merz se cumple sólo en la emulsión recién hecha (Fig. 17a), lo cual indica que hubo una pérdida de estructura de la emulsión preparada con goma arábica en el tiempo (Fig. 17b). La regla de Cox-Merz se cumple para la emulsión $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:MG}$ tanto a tiempo cero (Fig. 18a) como después de 7 días de almacenamiento (Fig. 18b), aunque éste último en menor grado. Para el caso de la emulsión $(W_1/O/W_2)_{0.7\%,2:1,WPC:LMP}$ la regla de Cox-Merz no se cumple (Fig. 19 a y b). Estos resultados también concuerdan con los resultados de estabilidad de las emulsiones y de protección contra la oxidación del hierro biglicinado anteriormente discutidos puesto que la emulsión más estructurada es $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:MG}$, aquella que presentó mayor estabilidad y mejor protección contra la oxidación del hierro biglicinado.

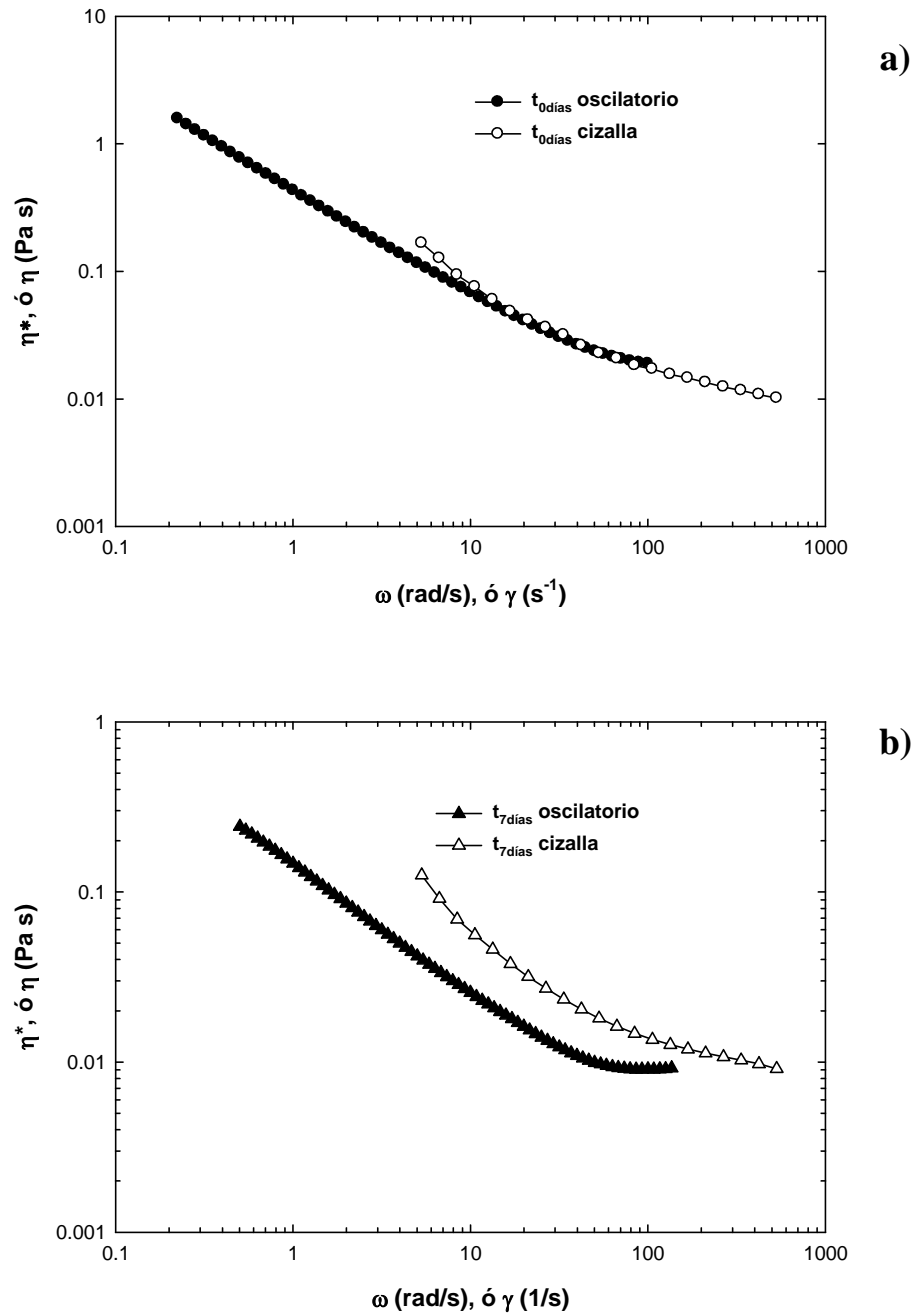


Figura 17. Aplicación de la regla de Cox-Merz para la emulsión $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:GA}$ recién preparada (a); y después de 7 días de almacenamiento (b).

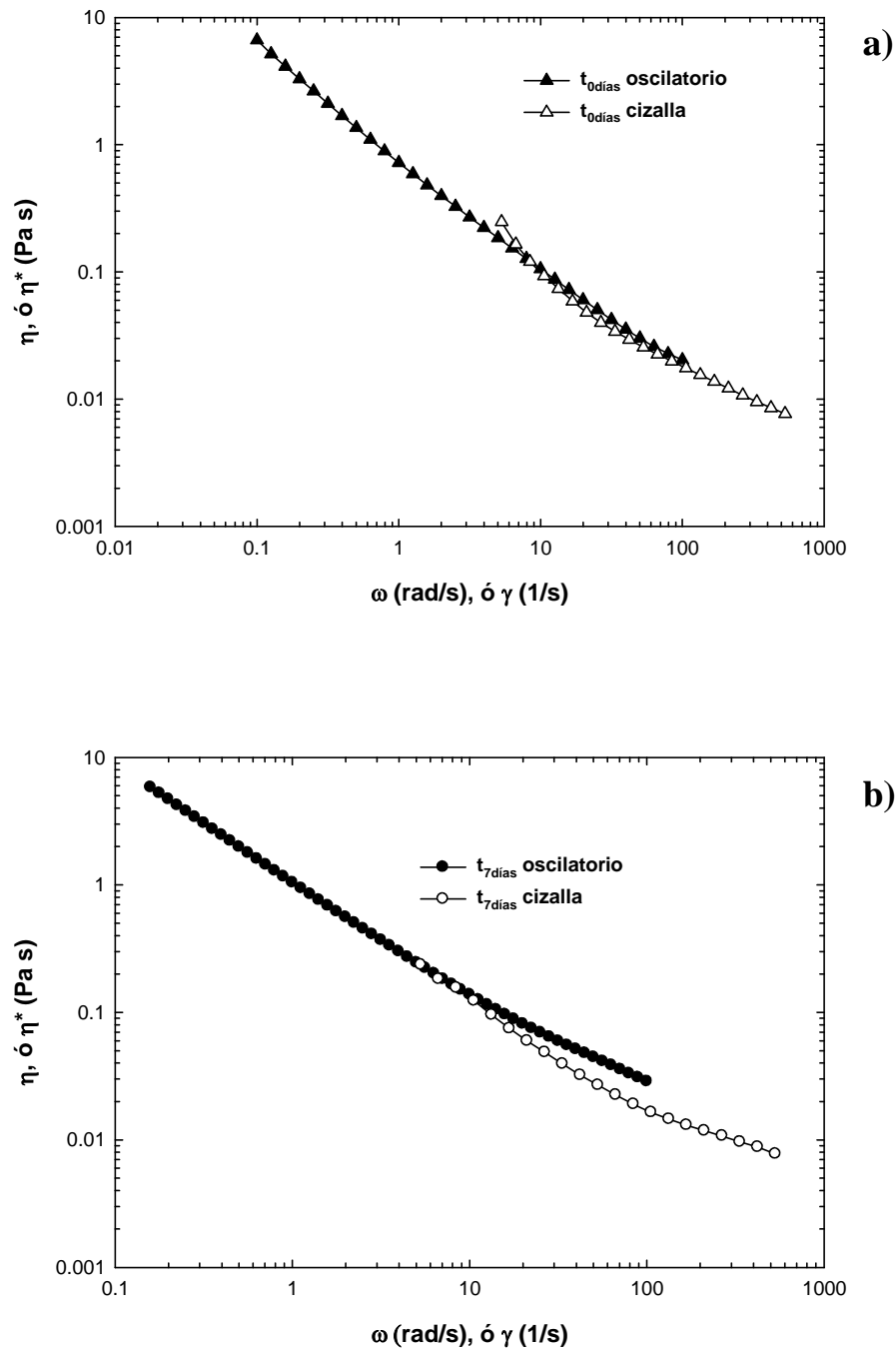


Figura 18. Aplicación de la regla de Cox-Merz para la emulsión $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:GM}$ recién preparada (a); y después de 7 días de almacenamiento (b).

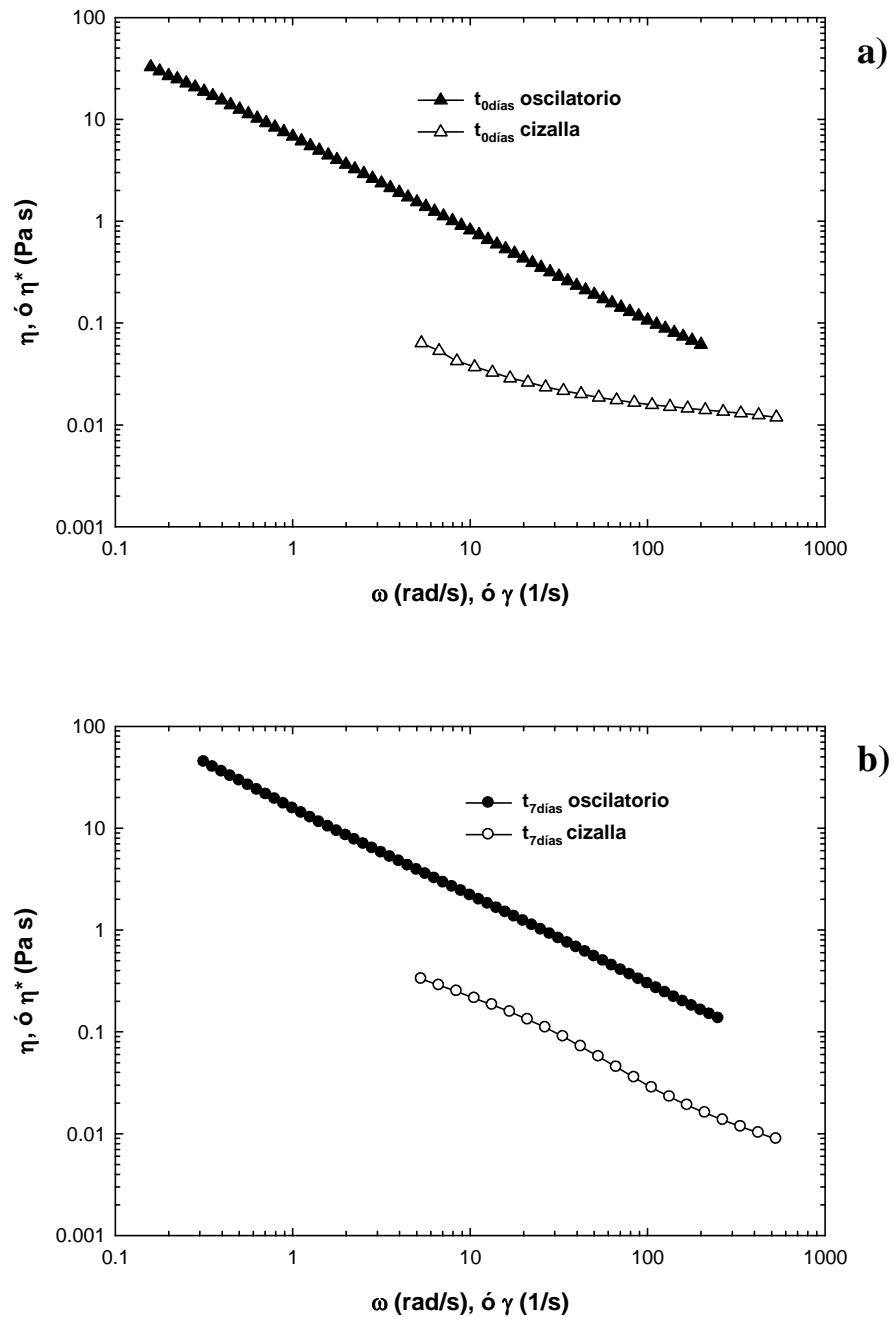


Figura 19. Aplicación de la regla de Cox-Merz para la emulsión $(W_1/O/W_2)_{0.7\%,2:1,WPC:LMP}$ recién preparada (a); y después de 7 días de almacenamiento (b).

10. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos concluir los siguientes puntos principales:

- El grosor de la membrana interfacial formada por los complejos biopoliméricos adsorbidos en la interfase aceite-agua externa de las emulsiones agua en aceite en agua, está directamente relacionado con la estabilidad cinética y química de las emulsiones múltiples, y dicho grosor es dependiente del tipo de polisacárido empleado en la formación de los complejos biopoliméricos.
- A mayor peso molecular del polisacárido se obtiene un mayor grosor de la capa adsorbida, tamaños de gota más pequeños, menor tasa de coalescencia, mejor protección contra la oxidación del hierro biglicinado, y se logra controlar más adecuadamente la liberación de hierro biglicinado.
- Las emulsiones múltiples exhibieron un comportamiento reoadelgazante, siendo la estabilizada con el complejo WPC:MG la que presenta menor cambio en las propiedades reológicas de flujo en el tiempo, lo cual implica mayor estabilidad.
- En este trabajo se estableció la metodología y procedimientos generales para lograr una eficiente encapsulación del hierro biglicinado, incrementando la protección contra su oxidación y controlando la tasa de liberación del hierro biglicinado de emulsiones múltiples tipo agua en aceite en agua estabilizadas con complejos biopoliméricos proteína:polisacárido.
- Dado que la deficiencia de hierro es la deficiencia nutricional más común en países desarrollados y en vías de desarrollo, afectando principalmente a lactantes, niños y

mujeres en edad reproductiva, se espera que este trabajo contribuya a mitigar este problema.

11. PERSPECTIVAS

A la luz de los resultados obtenidos en el presente trabajo, surgen nuevas preguntas e ideas las cuales podrían perseguirse en futuras investigaciones, ya sea con el objetivo de fortificar productos alimenticios empleando las emulsiones múltiples producidas mediante la metodología descrita en este estudio, o de profundizar más sobre estudios fisicoquímicos de dichas emulsiones. A continuación se sugieren algunos estudios que podrían derivarse a partir del presente trabajo de investigación:

- Aunque la alta biodisponibilidad del hierro biglicinado es bien reconocida, sería conveniente llevar a cabo estudios de biodisponibilidad del hierro biglicinado encapsulado en las emulsiones múltiples ya sea *in vivo* o *in vitro* simulando condiciones gastrointestinales.
- Una vez que los productos alimenticios sean fortificados con el hierro biglicinado encapsulado en las emulsiones múltiples, será posible realizar un estudio de evaluación sensorial de los alimentos fortificados, y podrán estudiarse las posibles interacciones que ocurran entre los demás componentes alimenticios y el hierro biglicinado, que causen alguna alteración en el sabor de los alimentos, por ejemplo con ácidos grasos insaturados.
- El estudio de la estabilidad térmica de las emulsiones múltiples conteniendo hierro biglicinado sería de gran importancia para cuando se pretendan agregar a alimentos que sean sometidos a procesos térmicos durante su proceso de elaboración.

- Una parte importante de este trabajo fue la formación de complejos proteína-polisacárido, y a partir de este tema se pueden derivar estudios relacionados con la caracterización fisicoquímica de dichos complejos, los cuales incluyan su caracterización reológica y el estudio de su capacidad de adsorción en interfases agua-aceite mediante estudios de reología y tensión interfacial, así como corroborar que el grosor de los complejos formados esté directamente relacionado con la estabilidad de la emulsión.
- El secado por aspersión es una alternativa para la aplicación en alimentos sólidos del hierro biglicinado microencapsulado, y a partir de aquí pueden derivarse estudios sobre las condiciones que minimicen la degradación del hierro biglicinado durante el proceso de secado por aspersión de las emulsiones múltiples, y una vez que se obtengan las microcápsulas secadas por aspersión, estudiar su estabilidad en el almacenamiento a diferentes condiciones de humedad, temperatura y actividad de agua para determinar sus condiciones de máxima estabilidad termodinámica.

12. REFERENCIAS

Andreetta, H. A. (2003). Fármacos de acción prolongada: Mecanismos de liberación. Usos de distintos modelos. *Latin American Journal of Pharmacy*, 22, 355-364.

AOAC Official Methods of Analysis. (1995). AOAC official method 977.30. Iron in drugs, spectrophotometric method. Drugs part I, (pp. 11-12). Arlington: AOAC International.

Ashmead, S. D. (2001). The chemistry of ferrous bis-glycinate chelate. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 51, 7-12.

Badui Dergal, S., Bourges Rodríguez, H., Anzaldúa Morales, A. (1996). *Química de los alimentos*. México: Editorial Alhambra Mexicana.

Baeza, R.I., Carp, D.J., Pérez, O.E., y Pilosof, A.M.R. (2002). κ -Carrageenan-protein interactions: effect of proteins on polysaccharide gelling and textural properties. *LWT – Food Science and Technology*, 35, 741-747.

Bais, D. y Lapasin, R. (2003). Studio di matrici polysaccharide per emulsioni: interazioni polimero tensioattivo e proprietà reologiche. *Revista Italiana delle Sostanze Grasse*, 80, 129-139.

Barnes, H.A., Hutton, J.E., y Walters F.R.S.K. (1989). *An introduction to rheology*. UK: Editorial Elsevier.

Benichou, A., Aserin, A., y Garti, N. (2002). Double emulsions stabilized by new molecular recognition hybrids of natural polymers. *Polymers for Advanced Technologies*, 13, 1019-1031.

Bergenståhl, B. (1995). Emulsions. En S. T. Becket, & G. Talbot (Eds.), *Physico-Chemical Aspects of Food Processing*, (pp. 49-64). London: Chapman & Hall.

Beristain, C. I., Azuara, E., y Vernon-Carter, E. J. (2002). Effect of water activity on the stability to oxidation of spray-dried encapsulated orange peel oil using mesquite gum (*Prosopis juliflora*) as wall material. *Journal of Food Science*, 67, 206-211.

Beristain, C.I., García, H.S., y Vernon-Carter, E.J. (2001). Spray-dried cardamom essential oil mesquite (*Prosopis juliflora*) gum. *LWT – Food Science and Technology*, 34, 398-401.

Bonnet, M., Cansell, M., Berkaoui, A., Ropers, M. H., Anton, M., y Leal-Calderon, F. (2009). Release rate profiles of magnesium from multiple W/O/W emulsions. *Food Hydrocolloids*, 23, 92-101.

Bovell-Benjamin, A. C., Viteri, F. E., y Allen, L. H. (2000). Iron absorption from ferrous bisglycinate and ferrous trisglycinate in whole maize is regulated by iron status. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 1563-1569.

Chen, J., Dickinson, E. (1998). Viscoelastic properties of protein-stabilized emulsion: effect of protein-surfactant interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 91-97.

de Kruif, C. G., y Tuinier, R. (2001). Polysaccharide protein interactions. *Food Hydrocolloids*, 15, 555-563.

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

Dickinson, E. (1993). Protein-polysaccharide interactions in food colloids. En E. Dickinson, P. Walstra (Eds.), *Food Colloids and Polymers: Stability and Mechanical Properties*, (pp. 77-93). Cambridge: Royal Society of Chemistry.

Dickinson, E. (1999). Adsorbed protein layers at fluid interfaces: interactions, structure and surface rheology. *Colloids and Surfaces*, 15, 161-176.

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

Dickinson, E., y McClements D. J. (1996). *Advances in Food Colloids*. London: Blackie Academic & Professional.

Espinosa-Andrews, H., Báez-González, J. G., Cruz Sosa, F., y Vernon-Carter, E. J. (2007). Gum arabic-chitosan complex coacervation. *Biomacromolecules*, 8, 1313-1318.

Espinosa-Andrews, H., Lobato-Calleros, C., Pérez-Alonso, C., Cruz-Sosa, F., y Vernon-Carter, J. (2008). Complex coacervation of whey protein concentrate and chitosan. En O. Soto-Cruz, P. Angel, A. Gallegos-Infante, R. Rodríguez-Herrera (Eds.). *Advances in Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries*, (pp. 296-302). México: Asociación Mexicana de Ciencia de los Alimentos, A.C.

Espinosa-Andrews, H., Sandoval-Castilla, O., Torres, H.V., Vernon-Carter, E.J., Lobato-Calleros, C. (2009). Determination of the gum arabic-chitosan interactions by Fourier transform infrared spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates. *Carbohydrate Polymers*, In Press, doi:10.1016/j.carbpol.2009.08.040.

Fenyo, J. C., y Vandavelde, M. C. (1990). Physico-chemical properties of gum arabic in relation to structure. En: G.O. Phillips, D.J. Wedlock y P.A. Williams (Eds.), *Gums and Stabilizers for the Food Industry*, (Vol. 5, pp. 17-23). Oxford: IRL Press.

Gallegos, C., Navarro, F., y Martínez-Boza, F. (2001) Rheology and microstructure of asphalt binders. *Rheological Acta*, 40, 135-141.

Goddard, E.D. Polymer/Surfactant Interaction. (2002). Interfacial Aspects. *Journal of Colloid and Interface Science*, 256, 228-235.

González-Ochoa, H., Ibarra-Bracamontes, L., y Arauz-Lara, J. L. (2003). Two-stage coalescence in double emulsions. *Langmuir*, 19, 7837-7840.

Hemart, Y., Hall, C.E., Munro, P.A., y Singh, H. (2002). Small and large deformation rheology and microstructure of κ -carrageenan gels containing commercial milk protein products. *International Dairy Journal*, 12, 371-381.

Herrera-Alonso R. (2003). Estudio reológico de mezclas maltenos-copolímeros estireno-butadieno. México, tesis de maestría UNAM, Facultad de Química.

Higuchi, T. (1961). Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50, 874-879.

Islam, A. M., Phillips, G. O., Slijivo, A., Snowden M. J., y Williams, P. A. (1997). A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of gum arabic. *Food Hydrocolloids*, 11, 493-505.

Jager-Lezer, N., Terisse, I., Bruneau, F., Tokgoz, S., Ferreira, L., Clause, D., Seiller, M., y Grossiord, J.L. (1997). Influence of lipophilic surfactant on the release kinetics of water-soluble molecules entrapped in a W/O/W multiple emulsion. *Journal of Controlled Release*, 45, 1-13.

Kitchener, J. A., y Mussellwhite, P. R. (1969). The theory of stability of emulsions. En Sherman. (Eds.), *Emulsion science* (pp. 77–130). London: Academic Press Inc.

Kralj D., y Brečević L. (1998). Precipitation of some slightly soluble salts using emulsion liquid membranes. *Croatica Chemical Acta*, 71, 1049-1060.

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

Macosko, C. W. (1997). *Rheology: principles, measurements and applications*. Chapter 3 (pp. 109 – 121). New York:VCH.

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

Medina-Torres, L., (2005). *Estudio reológico del mucilago de nopal y su efecto sinérgico con otros hidrocoloides de uso alimenticio*, México, tesis de Doctorado UNAM, Facultad de química.

Michaut, F., Perrin, P., y Hébraud, P. (2004). Interface composition of multiple emulsions : rheology as a Probe. *Langmuir*, 20, 8576-8581.

Okochi, H., y Nakano, M. (2000). Preparation and evaluation of W/O/W type emulsions containing vancomycin. *Advanced Drug Delivery Review*, 45, 5-26.

Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F., Ponce-Alquicira, E., y Vernon-Carter, E. J. (2003). Mesquite gum: fractionation and characterization of the gum exuded from *Prosopis laevigata* obtained from plant tissue culture and wild trees. *Carbohydrate Polymers*, 54, 323-327.

Özer, Ö., Baloglu, E., Ertan, G., Muguet, V., y Yazan, Y. (2000). The effect of the type and the concentration of lipophilic surfactant on the stability and release kinetics of the W/O/W multiple emulsions. *International Journal of Cosmetic Science*, 22, 459-470.

Pal, R. (1996). Multiple O/W/O emulsion rheology. *Langmuir*, 12, 2220-2225.

Pasika, W. M. (1977). Polysaccharide polyelectrolites. En: P.A. Sanford y A.I. Laskin (Eds.), *Extracellular Microbial Polysaccharides*, (Vol. 45, pp. 128-159). Washington, DC: ACS Symposium Series.

Pays, K., Giemanska-Kahn, J., Pouligny, B., Bibette, J., y Leal-Calderón, F. (2001). Coalescence in surfactant-stabilized double emulsions. *Langmuir*, 17, 7758-7769.

Pérez-Alonso, C., Báez-González, J. G., Beristain, C. I., Vernon-Carter, E. J., y Vizcarra-Mendoza, M. G. (2003). Estimation of the activation energy of carbohydrate polymers blends as selection criteria for their use as wall material for spray-dried microcapsules. *Food Carbohydrates*, 53, 197-203.

Pimentel-González, D., Revah, S., Campos-Montiel, R., Monroy-Hermosillo, O., y Vernon-Carter, E. J. (2008). A laboratory study of the biodegradation of MTBE solubilised in water by a microbial consortium entrapped in a water-in-oil-in-water double emulsion. *Process Biochemistry*, 43, 1239-1243.

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

Rodríguez-Huezo, M. E., Pedroza-Islas, R., Prado Barragán, L. A., Beristain, C. I., y Vernon-Carter, E. J. (2004). Microencapsulation by spray drying of multiple emulsions containing carotenoids. *Journal of Food Science*, 69, E351-E359.

- Roth S., Murray, B. S., y Dickinson, E. (2000). Interfacial shear rheology of aged and heat-treated β -lactoglobulin films: displacement by nonionic surfactant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1491-1497.
- Ruiz-Ramos, J. O., Pérez-Orozco, J. P., Báez-González, J. G., Bósquez-Molina, E., Pérez-Alonso, C., y Vernon-Carter, E. J. (2006). Interrelationship between the viscoelastic properties and effective moisture diffusivity of emulsions with the water vapor permeability of edible films established by mesquite gum-chitosan complexes. *Carbohydrate Polymers*, 64, 355-363.
- Seifriz, W. (1925). Studies in emulsions IV. Multiple systems. *Journal of Physical Chemistry*, 29, 744-746.
- Sela, Y., Magdassi, S., y Garti, N. (1995). Release of markers from the inner water phase of W/O/W emulsions stabilized by silicone based polymeric surfactants. *Journal of Controlled Release*, 33, 1-12.
- Sherman, P. (1969). General properties of emulsions and their constituents. En Sherman. (Eds.), *Emulsion science* (pp. 131–216). London: Academic Press Inc.
- Tolstoguzov, V. (2003). Some thermodynamic considerations in food formulation. *Food Hydrocolloids*, 17, 1-23.
- Tolstoguzov, Y. B. (1990). Interactions of gelatin with polysaccharides. En G.O. Phillips, D. J. Wedlock, y P. A. Williams (Eds.), *Gums and Stabilisers for the Food Industry*, (Vol. 5, pp. 157-175). Oxford: IRL Press.
- Trubiano, P. C. (1995). The role of specialty food starches in flavors emulsions. En H. Chi-Tang, T. Chee-Teck, y T. Chao-Hsiang (Eds.), *Flavor Technology. Physical Chemistry, Modification, and Process: ACS Symposium Series*, (pp. 199-209). Washington: American Chemical Society.
- Vernon-Carter, E. J., Beristain, C. I., y Pedroza-Islas, R. (2000). Mesquite gum (*Prosopis gum*). En G. Doxastasis and V. Kiosseoglou (Eds.), *Novel Macromolecules in Food Systems*, (pp. 217-235). Amsterdam: Elsevier.
- Vernon-Carter, E. J., Gómez, S. A., Beristain, C. I., Mosqueira, G., Pedroza-Islas, R., y Moreno-Terrazas, R. C. (1996). Color degradation and coalescence kinetics of Aztec marigold oleoresin-in-water emulsions stabilized by mesquite or Arabic gums and their blends. *Journal of Texture Studies*, 27, 625–641.
- Vernon-Carter, E. J., Pedroza-Islas, R., y Beristain, C. I. (1998). Stability of *Capsicum annum* oleoresin-in water emulsions containing *Prosopis* and *Acacia* gums. *Journal of Texture Studies*, 29, 553-567.

Voragen, A. G. J., Pilnik, W., Thibault, J. F., Axelos, M. A. V., y Renard, C.M.G.C. (1995). Pectins. En A.M. Stephen (Ed.), *Food Polysaccharides and Their Applications*, (pp. 287-339). New York: Marcel Dekker, Inc.

Walstra, P. (1993). Introduction to aggregation phenomena in food colloids. En E. Dickinson, P. Walstra (Eds.), *Food Colloids and Polymers: Stability and Mechanical Properties*, (pp. 3-15). Cambridge: Royal Society of Chemistry.

Weinbreck, F., Nieuwenhuijse, H., Robjin, G. W. y de Kruif, C. G. (2003). Complex formation of whey proteins: exocellular polysaccharide EPS B40. *Langmuir*, 19, 9404-9410.

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

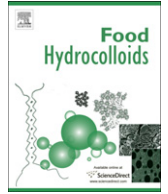
Weinbreck, F., Wientjes, R. H. W., Nieuwenhuijse, H., Robjin, G. W., y de Kruif, C. G. (2004). Rheological properties of whey protein/gum arabic coacervates. *Journal of Rheology*, 48, 1215-1228.

Wilde, P., Mackie, A., Husband, F., Gunning, P., y Morris, V. (2004). Proteins and emulsifiers at liquid interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108-109, 63-71.

13. ANEXOS

13.1. Artículo

Rubén Jiménez-Alvarado, C. Ignacio Beristain, Luis Medina-Torres, Angélica Román-Guerrero, E. Jaime Vernon-Carter (2009) Ferrous bisglycinate content and release in $W_1/O/W_2$ multiple emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes. *Food Hydrocolloids*. 23: 2425-2433.



Ferrous bisglycinate content and release in $W_1/O/W_2$ multiple emulsions stabilized by protein–polysaccharide complexes

R. Jiménez-Alvarado^a, C.I. Beristain^b, L. Medina-Torres^c, A. Román-Guerrero^a, E.J. Vernon-Carter^{d,*}

^a Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, CP 09340 México, DF, Mexico

^b Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Veracruzana, Av. Dr. Rafael Sánchez el Altamirano s/n Km. 3.5 carreteras Xalapa-Las Trancas, Coronel Industrial Las Animas, CP 91192, Xalapa, Veracruz, Mexico

^c Facultad de Química, Conjunto E, L213, Ingeniería Química, Universidad Nacional Autónoma de México, CP 04510 Ciudad de México, DF, Mexico

^d Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Edificio T-247, CP 09340 México, DF, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 March 2009

Accepted 29 June 2009

Keywords:

Multiple emulsions

Ferrous bisglycinate

Protein:polysaccharide complexes

Release kinetics

Protection against oxidation

ABSTRACT

Ferrous bisglycinate aqueous solution was entrapped in the inner phase (W_1) of water-in-oil-in-water ($W_1/O/W_2$) multiple emulsions. The primary ferrous bisglycinate aqueous solution-in-mineral oil (W_1/O) emulsion contained 15% (w/w) ferrous bisglycinate, had a dispersed phase mass fraction of 0.5, and was stabilized with a mixture of Grindsted PGPR 90:Panodan SDK (6:4 ratio) with a total emulsifiers concentration of 5% (w/w). This primary emulsion was re-emulsified in order to prepare $W_1/O/W_2$ multiple emulsions, with a dispersed mass fraction of 0.2, and stabilized using protein (whey protein concentrate (WPC)):polysaccharide (gum arabic (GA) or mesquite gum (MG) or low methoxyl pectin (LMP)) complexes (2:1 ratio) in the W_2 aqueous phase. The $W_1/O/W_2$ multiple emulsion stabilized with WPC:MG (5% w/w total biopolymers concentration) provided smaller droplet sizes (2.05 μm), lower rate of droplet coalescence ($7.09 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$), better protection against ferrous bisglycinate oxidation (29.75% Fe^{3+}) and slower rate of ferrous bisglycinate release from W_1 to W_2 ($K_H = 0.69 \text{ mg mL}^{-1} \text{ min}^{-0.5}$ in the first 24 h and $0.07 \text{ mg mL}^{-1} \text{ min}^{-0.5}$ for the next 19 days of storage time). Better encapsulation efficiencies, enhanced protection against oxidation and slower release rates of ferrous bisglycinate were achieved as the molecular weight of the polysaccharide making up protein:polysaccharide complex was higher. Thus, the factor that probably affected most the overall functionality of multiple emulsions was the thickness of the complex adsorbed around the multiple emulsion oil droplets. These thicknesses determined indirectly by measuring the z-average diameter of the complexes, and that of the WPC:MG (529.4 nm) was the largest.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Ferrous bisglycinate has a great potential as food fortificant because its absorption in humans is not limited by action of phytates or polyphenols. The supplementation of ferrous bisglycinate is usually made by incorporating it directly as a solution in food systems, but two inconveniences occur: (1) ferrous bisglycinate interacts with other food components changing the taste of foods, which is detected by consumers, and (2) it is oxidized easily (Bovell-Benjamin, Viteri, & Allen, 2000). Thus, an actual research challenge is how to incorporate ferrous bisglycinate in food systems in order to diminish or delete these negative effects. One possibility is to entrap ferrous bisglycinate in the inner aqueous phase of

a water-in-oil-in-water ($W_1/O/W_2$) multiple emulsion. $W_1/O/W_2$ emulsions consist of water droplets dispersed within larger oil droplets, which are on turn dispersed in an aqueous continuous phase (McClements, 2005). A boost in their use has occurred recently in diverse fields such as water treatment (Pimentel-González, Revah, Campos-Montiel, Monroy-Hermosillo, & Vernon-Carter, 2008), foods (Dickinson & McClements, 1996; Lobato-Calleros, Rodríguez, Sandoval-Castilla, Vernon-Carter, & Alvarez-Ramirez, 2006; Lobato-Calleros et al., 2008; Muschiolik, 2007), natural colorants protection (Rodríguez-Huezo, Pedroza-Islas, Prado-Barragán, Beristain, & Vernon-Carter, 2004), and cosmetics (Bais & Lapasin, 2003), due to improvements in their stability, primarily through the use of biopolymers as stabilizing agents in the outer aqueous phase. Protein–hydrocolloid interactions play a significant role in the structure and stability of many processed foods, and the control of these macromolecular interactions is a key factor in the development of novel food processes and products (Lutz, Aserin, Portnoy, Gottlieb,

* Corresponding author. Tel.: +52 55 5804 4648; fax: +52 55 5804 4900.
E-mail address: jvc@xanum.uam.mx (E.J. Vernon-Carter).

& Garti, 2009), including multiple emulsions. These biopolymers can chemically interact through covalent bonds or physically through electrostatic interactions (Dickinson, 2008; Ettelaie, Akinshina, & Dickinson, 2008). These interactions can be attractive or repulsive, weak or strong, and specific or non specific (Tolstoguzov, 1998). In systems as $W_1/O/W_2$ multiple emulsions, containing several surface-active components, three types of adsorption mechanisms at the interface have been described: a) competitive adsorption, b) associative adsorption, and c) layered adsorption (Bergenhöhl, 1995).

$W_1/O/W_2$ emulsions with improved stability and homogeneity in droplet size distribution were prepared by using protein:polysaccharide (Pr:Ps) complexes at the external oil–water interface (Benichou, Aserin, & Garti, 2002). Electrostatic complexation between biopolymers at the external interface led to a better coverage of the interface, and to an enhanced stabilization of the $W_1/O/W_2$ emulsions against aggregative mechanisms through steric effects. Pr:Ps complexation depends on the relative concentrations and ratios between the biopolymers (Benichou et al., 2002; Espinosa-Andrews, Báez-González, Cruz Sosa, & Vernon-Carter, 2007; Weinbreck, Nieuwenhuijse, Robjin, & de Kruijff, 2003; Weinbreck, Tromp, & de Kruijff, 2004). Furthermore, these variables influence, to a large extent, the structural and mechanical properties of multicomponent food systems (Tolstoguzov, 1990).

Studies on the release kinetics of $W_1/O/W_2$ emulsions have been done for magnesium (Bonnet et al., 2009) showing that the release kinetics seemed to be determined by diffusion and/or permeation mechanisms. Pimentel-González et al. (2008) used double emulsions with a microbial consortium entrapped in the inner aqueous phase for degrading methyl *tert*-butyl ether (MTBE) contained in the outer aqueous phase. The emulsifier dissolved in the oil phase helped to transport the MTBE from the outer to the inner aqueous phase. This type of diffusion is known as facilitated transport, and can work in the reverse direction for leaching out a material contained in the inner aqueous phase (Kralj & Brečević, 1998).

The aim of this work was to entrap ferrous bisglycinate in the inner aqueous phase (W_1) of $W_1/O/W_2$ emulsions stabilized by protein:polysaccharide complexes in the outer aqueous phase (W_2) and to determine the effect of the relative concentrations and ratios between the biopolymers, and the pH where electrostatic complexation is maximized on: (a) $W_1/O/W_2$ emulsions droplet size and stability; (b) ferrous bisglycinate encapsulation yield; (c) ferrous bisglycinate protection against oxidation; and (d) release kinetics of ferrous bisglycinate from the inner aqueous phase to the outer aqueous phase of the multiple emulsions.

2. Materials and methods

Ferrous bisglycinate powder was provided by UNIPHARM de Mexico, S.A. de C.V. (State of Veracruz, Mexico), containing 18–20% of elemental iron. Mineral oil (NF-85 food grade from Materiales y Abastos Especializados, S.A. de C.V., Mexico, D.F., Mexico) was used as the oil phase (O) of the $W_1/O/W_2$ multiple emulsions. The water-soluble surfactant (WS) (Panodan SDK, esters of monoglycerides and diglycerides of diacetyl tartaric acid) and the oil-soluble surfactant (OS) (Grindsted PGPR 90, esters of polyglycerol and polyricinoleate fatty acids) were purchased from Danisco Mexico, S.A. de C.V. Mesquite gum (MG) tears were hand collected in the Mexican State of San Luis Potosí, Mexico, were pulverized in a Bicom mill and, in order to stop enzymatic activity, dissolved in water at 77 °C for 1 h in a Polinox jacketed vessel with a propeller type agitator, filtered with high-flow supercel in a Shriver filter press and dried in a Bowen BLSA spray-drier with an inlet temperature of 175 °C (Vernon-Carter et al., 1996). Low methoxyl pectin (LMP) (Grindsted LC-950) was provided by Dannova Quimica, S.A. de C.V. (Mexico, D.F., Mexico). Gum arabic (GA) was purchased from

Sigma–Aldrich Quimica S.A. de C.V. (Toluca, State of Mexico, Mexico). Whey protein concentrate (WPC; Hilmar 8000) containing 80% protein in dry basis was acquired from Hilmar Ingredients (Hilmar, CA, USA). Analytical reagents used for the determination of iron were: α, α' -bipyridyl purchased from Sigma–Aldrich Quimica S.A. de C.V. (Toluca, State of Mexico, Mexico), ascorbic acid purchased from Tecsiquim S.A. de C.V. (Toluca, State of Mexico, Mexico), standard iron powder (99.99%), anhydrous sodium acetate purchased from Productos Quimicos Monterrey, S.A. (Monterrey, State of Nuevo Leon, Mexico), and glacial acetic acid purchased from J.T. Baker, S.A. de C.V. (Xalostoc, State of Mexico, Mexico). Deionized water was used in all the experiments, and sodium azide (Hycel de Mexico, S.A. de C.V., Mexico, D.F., Mexico) was used as preservative.

2.1. Preparation of emulsions

$W_1/O/W_2$ multiple emulsions were prepared at 25 °C using a two-stage emulsification procedure (Rodríguez-Huezo et al., 2004).

2.1.1. Formulation of W_1/O emulsions

In the first stage, 0.5 dispersed phase mass fraction ($\phi_{W_1/O}$) water-in-oil (W_1/O) primary emulsions were prepared, with different total surfactant concentrations (6, 8, 10, 12 and 14% w/w), and OS:WS ratios (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, and 5:5). The primary emulsions were coded as $(W_1/O)_{x,y}$, where the subscript x denotes the total surfactants concentration, and subscript y denotes the OS:WS ratio. In all the cases a 30% (w/w) ferrous bisglycinate aqueous solution (W_1) was dripped into the oil phase (O) homogenizing by means of sonication (Sonics Vibra Cell VCX 130 PB, Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, USA) at 70% amplitude and frequency of 20 kHz for 15 min.

2.1.1.1. *Rate of coalescence of $(W_1/O)_{x,y}$ emulsions.* The droplet sizes of the $(W_1/O)_{x,y}$ emulsions were determined with a Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, U.K.), using commercial soy oil (refractive index 1.475) as dispersant. The number volume mean diameter ($d_{3,0}$) of the $(W_1/O)_{x,y}$ emulsions was determined over time. The rate of coalescence (K_C) of the primary emulsions was determined as reported by Ruíz-Ramos et al. (2006). The primary emulsion that had the lowest rate of coalescence was selected for formulating the multiple emulsions.

2.2. Conditions leading to the formulation of $W_1/O/W_2$ multiple emulsions

Prior to formulating the $W_1/O/W_2$ multiple emulsions, the zeta potential of the individual biopolymers solutions, the yield and composition of the Pr:Ps complexes were determined, and this information was used for establishing the usage conditions to be used in W_2 .

2.2.1. Zeta potential

Aqueous solutions 5% (w/w) of WPC, GA, MG, and 2% (w/w) LMP were prepared and stored at 4 °C during 24 h in order to allow their complete hydration. The zeta potential of the biopolymers aqueous solutions was determined at different pH values using a Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK). pH of aqueous solutions of biopolymers was adjusted by the addition of 0.1N HCl and/or 0.1N NaOH. The pH where the maximum stoichiometric difference of the electrostatic charges between protein and polysaccharide occurred (pH_E) was determined.

2.2.2. Protein:polysaccharide complexation, coacervate yield and z-average diameter

Solutions of binary mixtures of biopolymers (Pr:Ps) were prepared at different total biopolymers concentrations (from 1 to 10% (w/w) for the WPC:GA and WPC:MG mixtures, and from 0.4 to 1.6% (w/w) for the WPC:LMP mixture and at different ratios (0.5:1 to 4:1), and stored for 24 h at 4 °C in order to allow their complete hydration. The pH of these solutions was adjusted in a range from 1.5 to 5 using 0.1N HCl, and monitored to determine if Pr:Ps complexes were formed through their precipitation (complex coacervates). These biopolymers solutions were stored during 48 h at 4 °C. The complex coacervates were dehydrated at 45 °C in an oven until constant weight was achieved. The coacervate yield was calculated with the following equation:

$$\%RC = \frac{m_C}{m_{BP}} \times 100 \quad (1)$$

where %RC is the coacervate yield, m_{BP} is the total mass of the biopolymers used in the preparation of the binary mixtures, and m_C is the mass of the dehydrated complex coacervate.

Additionally, the z-average diameter of the Pr:Ps complexes, previous to their dehydration, was determined by means of laser light scattering using Malvern Zetasizer Nano ZS, as indirect method for providing information regarding the thickness of the adsorbed biopolymer layers around the oil droplets of the multiple emulsions.

2.2.3. Composition of the protein:polysaccharide complexes

Elemental composition of the complex coacervates was determined using an elemental analysis equipment PE2400 series II CHNS/O (Perkin–Elmer, USA), calculating the total carbon, hydrogen, and nitrogen concentrations in the Pr:Ps complexes samples, using the nitrogen concentration as differential element between the protein and the polysaccharides used. The quantity of polysaccharide in the coacervate was calculated from the following equation:

$$\%POLYSACCHARIDE = \frac{\%N_C - \%N_{WPC}}{\%N_{PS} - \%N_{WPC}} \times 100 \quad (2)$$

where $\%N_C$, $\%N_{WPC}$, and $\%N_{PS}$, are the nitrogen concentrations found in the Pr:Ps complexes, in WPC, and in the polysaccharides used respectively.

2.2.4. Formulation of $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ multiple emulsions

The $(W_1/O)_{x,y}$ primary emulsion with the lowest $K_{C(W_1/O)_{x,y}}$ was re-emulsified in aqueous binary mixtures of biopolymers (WPC:GA, WPC:GM, and WPC:LMP) producing $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ multiple emulsions, where the subscript *a* denotes the total biopolymers concentration, the subscript *b* denotes the Pr:Ps ratio, and the subscript *c* denotes the mixture of biopolymers. Total concentration and ratio of biopolymers used for formulating the $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ multiple emulsions was established from the results of coacervate yield. Thus, the three following emulsions $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:GA}$, $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:MG}$, and $(W_1/O/W_2)_{0.7\%,2:1,WPC:LMP}$ were produced. The re-emulsification of the primary emulsion was made by dripping it into the mixture of biopolymers, homogenizing by means of sonication (Sonics Vibra Cell VCX 130 PB, Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, USA) at 50% amplitude and frequency of 20 kHz for 15 min. The dispersed phase mass fraction in the $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ emulsion ($\phi_{W_1/O/W_2}$) was 0.2 in all the cases. Immediately after the emulsion was formed, the pH of multiple emulsions was adjusted to the pH where the formation of Pr:Ps complexes was maximized (pH_C), using 0.1N HCl in order to allow the formation of a biopolymeric complex at the outer oil–water interface.

2.2.5. Rate of coalescence of $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ multiple emulsions

The rate of coalescence of $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ multiple emulsions ($K_{C(W_1/O/W_2)_{a,b,c}}$), was determined using the methodology described in Section 2.1.1.1, but using water instead of oil as dispersant. Additionally the span of the $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ multiple emulsions, a dimensionless width parameter that can provide a relative measure the polydispersity of the emulsions droplet size was determined.

2.3. Protective effect of the $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ multiple emulsions against ferrous bisglycinate oxidation

The ferrous iron (Fe^{2+}), total iron, and ferric iron (Fe^{3+}) contents were determined spectrophotometrically (AOAC, 1995, chap. 18). 10 mL of the $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ multiple emulsion were dissolved in HCl (0.2% v/v) and diluted with water in order to achieve a concentration of ~3 mg of total iron per 100 mL. Fe^{2+} content was determined by its complexation with α,α' -bipyridyl at pH 4.5 and measuring the absorbance at 523 nm using a spectrophotometer (Spectronic Genesys2, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Total iron content was determined by reducing Fe^{3+} with ascorbic acid to Fe^{2+} , and complexing it with α,α' -dipyridyl. Fe^{3+} content was determined by the difference between total iron minus Fe^{2+} along 480 h.

2.3.1. Encapsulation yield and release kinetics

W_2 was separated from $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ emulsion by centrifugation at 1500 rpm for 15 min at 4 °C using a HERMLE Z323K high-speed centrifuge (Hermle, Labortechnik, Germany). Total iron in W_2 was quantified during storage time, as a measure of the release kinetics of ferrous bisglycinate.

Encapsulation yield was determined with the following equation:

$$EY = \frac{Fe_{(W_1/O/W_2)} - Fe_{W_2}}{Fe_{(W_1/O/W_2)}} \times 100 \quad (3)$$

where EY is the ferrous bisglycinate encapsulation yield percentage, $Fe_{(W_1/O/W_2)}$ is the total iron present in the whole $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ emulsion, and Fe_{W_2} is the total iron present in W_2 . EY was determined for fresh samples and for samples after 20 days of storage.

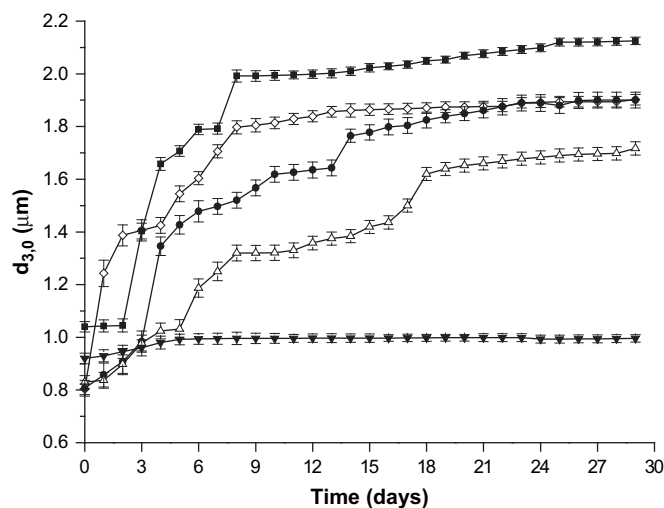


Fig. 1. Change in the number volume mean diameter ($d_{3,0}$) of $(W_1/O)_{x,y}$ primary emulsions: $(W_1/O)_{10\%,9:1}$ (\diamond); $(W_1/O)_{10\%,8:2}$ (\bullet); $(W_1/O)_{10\%,7:3}$ (Δ); $(W_1/O)_{10\%,6:4}$ (\blacktriangledown); and $(W_1/O)_{10\%,5:5}$ (\blacksquare) primary emulsions over time.

Table 1
Coalescence rates ($K_{C(W_1/O)_{x,y}}$) of the $(W_1/O)_{x,y}$ primary emulsions, subscript x denotes total surfactant concentration and subscript y denotes OS:WS ratio.

$(W_1/O)_{x,y}$		$K_{C(W_1/O)_{x,y}}$ (s^{-1})
x	y	
6	9:1	1.15×10^{-5} b
	8:2	1.23×10^{-5} a
	7:3	1.45×10^{-5} a
	6:4	1.91×10^{-6} d
	5:5	1.82×10^{-6} c
8	9:1	1.81×10^{-6} c
	8:2	1.87×10^{-6} c
	7:3	1.85×10^{-6} c
	6:4	1.47×10^{-6} d
	5:5	1.84×10^{-6} c
10	9:1	6.51×10^{-7} f
	8:2	9.52×10^{-7} e
	7:3	9.16×10^{-7} e
	6:4	2.52×10^{-7} g
	5:5	8.99×10^{-7} e
12	9:1	6.72×10^{-7} f
	8:2	9.48×10^{-7} e
	7:3	9.20×10^{-7} e
	6:4	2.53×10^{-7} g
	5:5	9.12×10^{-7} e
14	9:1	9.45×10^{-7} e
	8:2	5.52×10^{-7} f
	7:3	4.16×10^{-7} f
	6:4	2.52×10^{-7} g
	5:5	3.95×10^{-7} f

Values in the same column bearing different letters are significantly different ($P < 0.05$).

The release kinetic of ferrous bisglycinate from W_1 to W_2 phase of the multiple emulsions was fitted to the following models:

$$\text{Hixson \& Crowell model : } (1 - [Fe_{W_2}]/[Fe_{W_2}]_0)^{1/3} = -K_{HCT}t + 1 \quad (4)$$

$$\text{Peppas-Higuchi model : } [1 - Fe_{W_2}]/[Fe_{W_2}]_0 = K_{PH}t^n \quad (5)$$

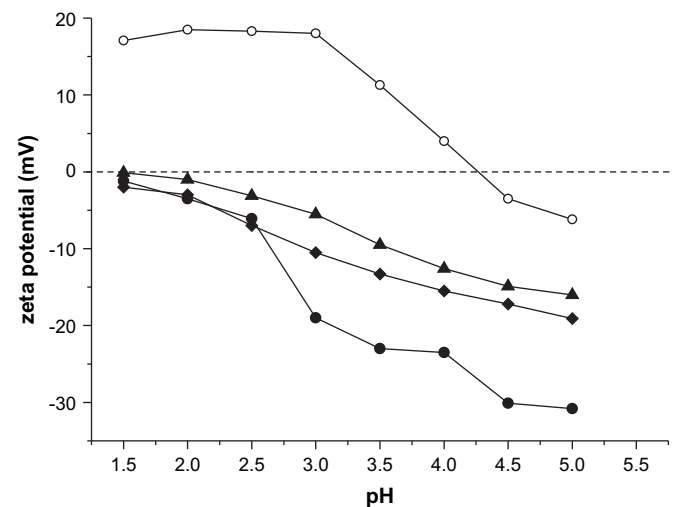


Fig. 2. Zeta potential in function of pH for biopolymers solutions: (○) WPC; (◆) GA; (▲) MG; (●) LMP.

$$\text{Jorgensen \& Christensen model : } [Fe_{W_2}]/[Fe_{W_2}]_0 = 1 - [(1 - n)K_J(t - t_0)]^{1/(1-n)} \quad (6)$$

$$\text{Zero-order model : } [Fe_{W_2}] = [Fe_{W_2}]_0 - K_0t \quad (7)$$

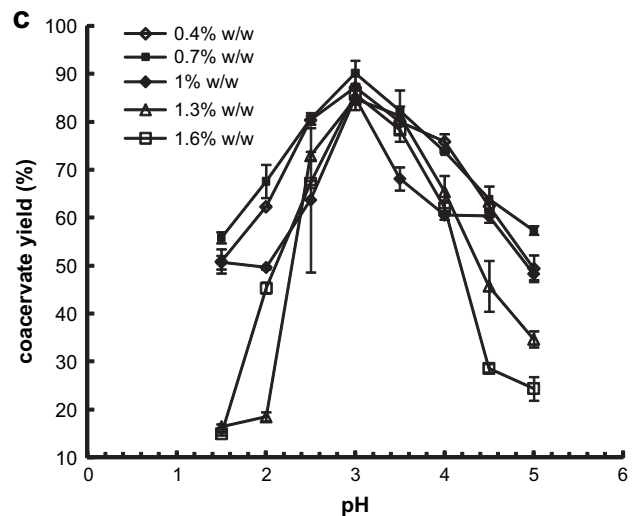
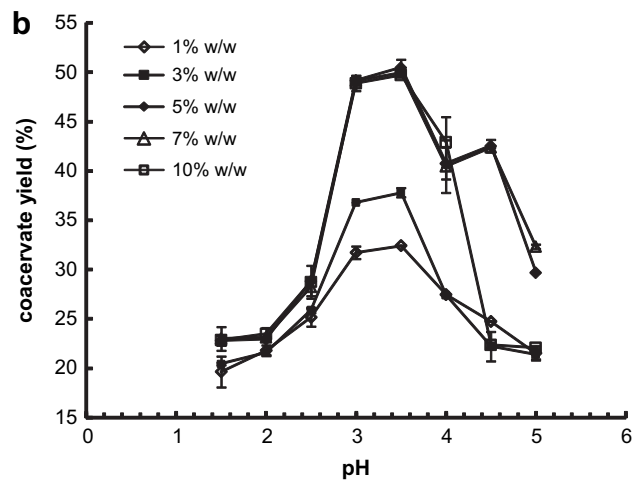
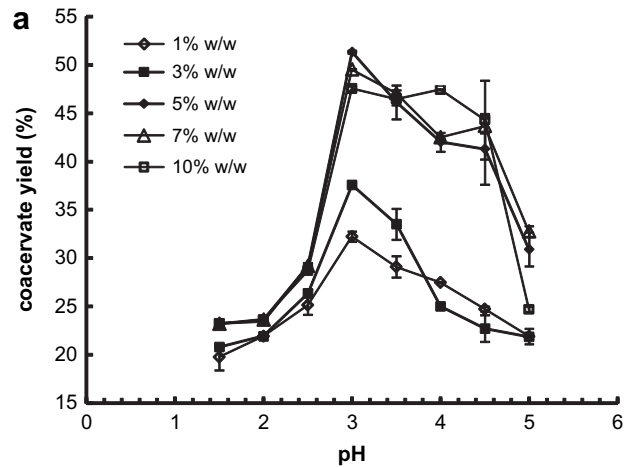


Fig. 3. Coacervate yield based on the pH value and total biopolymers concentration for the binary systems: a) WPC:GA, b) WPC:MG, and c) WPC:LMP in a 2:1 ratio, respectively.

$$\text{First-order model : } \ln [\text{Fe}_{W_2}] = \ln [\text{Fe}_{W_2}]_0 - K_1 t \quad (8)$$

$$\text{Second-order model : } 1/[\text{Fe}_{W_2}] = 1/[\text{Fe}_{W_2}]_0 + K_2 t \quad (9)$$

$$\text{Higuchi's model : } [\text{Fe}_{W_2}] = K_H t^{1/2} \quad (10)$$

where $[\text{Fe}_{W_2}]$ is the concentration of total iron in W_2 at time t , $[\text{Fe}]_0$ is the initial concentration of total iron in W_2 , n is a fitting parameter and K_{HC} , K_{PH} , K_j , K_0 , K_1 , K_2 , and K_H are release rate constants.

2.4. Statistical analysis

Data were analyzed using a one way analysis of variance (ANOVA) and a Tukey test for a statistical significance $p \leq 0.05$, using the software NCSS 2000 (Kaysville, Utah, USA). All experiments were done in duplicate.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of the $(W_1/O)_{x,y}$ primary emulsion

The effect of OS:WS ratio on $d_{3,0}$ of the $(W_1/O)_{x,y}$ primary emulsions manufactured with a total biopolymer concentration of 10% ($x = 10\%$) with time is shown in Fig. 1. Similar behavior was observed for total surfactant concentrations of 6, 8, 12 and 14% (data not shown). The $d_{3,0}$ of fresh primary emulsions varied from 0.8 to 2 μm , increasing as the OS concentration decreased (Fig. 1). After 30 days of storage at room temperature, $d_{3,0}$ of the primary emulsions increased significantly when prepared with a total surfactant concentration lower than 9% (w/w). The $K_{C(W_1/O)_{x,y}}$ did not vary significantly when total surfactant concentration was higher than 10% (w/w), indicating that the emulsions had a good stability against droplet coalescence in accordance to the criteria established by Kitchener and Mussellwhite (1969). The $K_{C(W_1/O)_{x,y}}$ of the most stable $(W_1/O)_{x,y}$ primary emulsions are shown in Table 1. Lowest $K_{C(W_1/O)_{x,y}}$ was achieved with a 6:4 OS:WS ratio and 10% total surfactant concentration. Increasing the surfactants concentration above 10% did not produce significantly lower $K_{C(W_1/O)_{x,y}}$ so

that the $(W_1/O)_{10\%,6:4}$ primary emulsion was used as the dispersed phase in the elaboration of the $W_1/O/W_2$ multiple emulsions.

3.2. Effect of pH, concentration, and ratio of biopolymers on the coacervate yield

As can be seen in Fig. 2, the isoelectric point (pI) of the WPC was 4.3 (ionic strength ~ 0.02), whereas the pH value at which the polysaccharides (GA, MG, LMP) lost the capacity to ionize their carboxyl groups was near to 1.5 (ionic strength ~ 0.04). Similar values have been reported for GA and whey protein (WP) by Weinbreck, Wientjes, Nieuwenhuijse, Robjin, and de Kruif (2004). Interactions between WPC and the polysaccharides were established through zeta potential sweeps of the biopolymeric solutions in a pH range from 1.5 to 5. The pH_E varied depending on the type of polysaccharide used, resulting a pH_E of 3.0 for WPC:GA, 3.5 for WPC:MG, and 3.0 for WPC:LMP (Fig. 2). Independently of the total biopolymer concentrations used, the pH of maximum coacervate yield (pH_C) for each Pr:Ps binary mixture occurred at the same values at which pH_E occurred, i.e., 3.0 for WPC:GA, 3.5 for WPC:MG, and 3.0 for WPC:LMP (Fig. 3). From Fig. 3 we can also observe that the maximum coacervate yield for the binary mixtures WPC:GA (51.35%) and WPC:GM (50.59%) occurred at a total biopolymer concentration of 5% (w/w). When the total biopolymer concentration decreased to 3% and 1% (w/w), the total coacervate yield decreased significantly, but remained practically constant as it increased to 7% and 10% (w/w) (Fig. 3a, b). The effect of total biopolymer concentration on coacervate yield can probably be best explained in terms of the polyelectrolyte behavior of macromolecules (Pasika, 1977). Ionization of the attached function aids in the solubilization of the polyelectrolyte, which dissolves to yield a polyion and counterions. The polyion holds a large number of charges in close proximity because they are attached to the macromolecular backbone, and although the polyion has mobility, the individual charges attached to the chain do not. Not all of the counterions are free to move about. The free ions form a counterion cloud about the polyion, whereas the immobilized ions are bound to a specific site or point of the macromolecular backbone. As the polyelectrolyte solution is diluted, more and more of the site-bound counterions are released, building the charge of the macro ion,

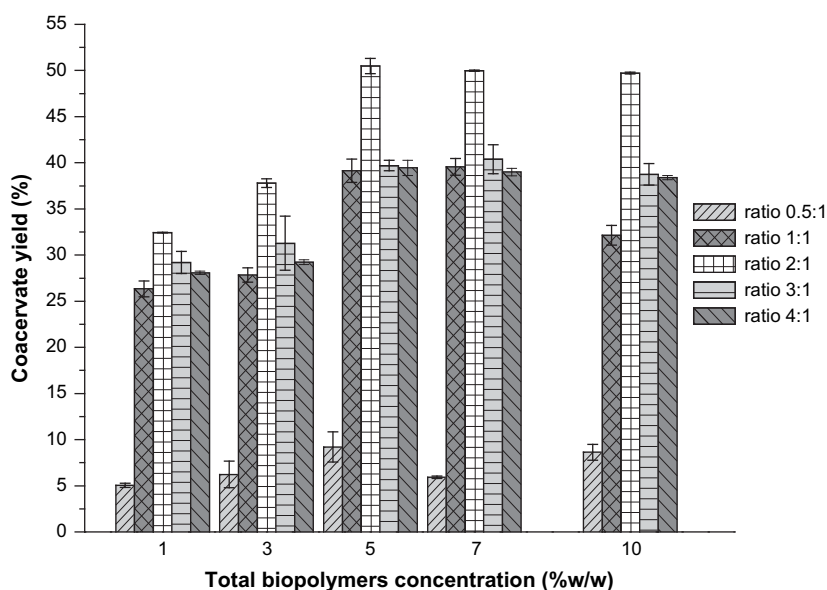


Fig. 4. Coacervate yield based on the ratio between biopolymers and total biopolymers concentration of WPC:MG at pH = 3.5 in the outer aqueous phase of the multiple emulsions.

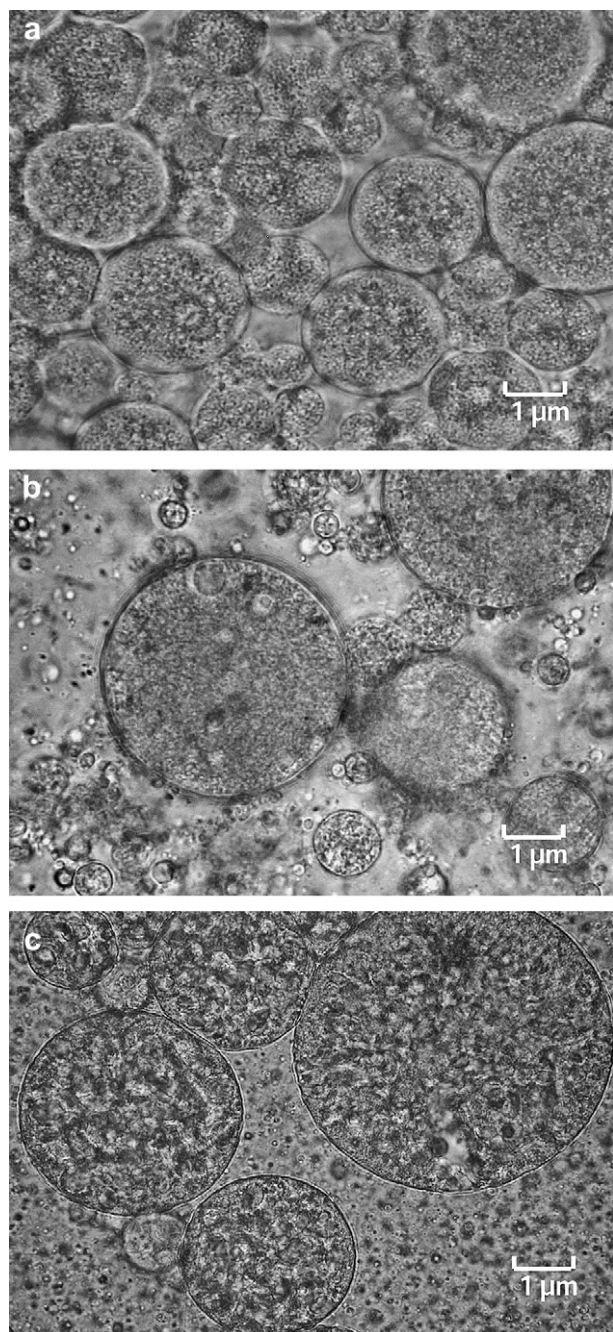


Fig. 5. Micrographs of $(W_1/O/W_2)$ multiple emulsions containing ferrous bisglycinate, stabilized with whey protein concentrate (WPC):mesquite gum(GM) (2:1 ratio; 5% w/w) complex: a) immediately after to be prepared, b) after 2 days, and c) after 20 days of storage time.

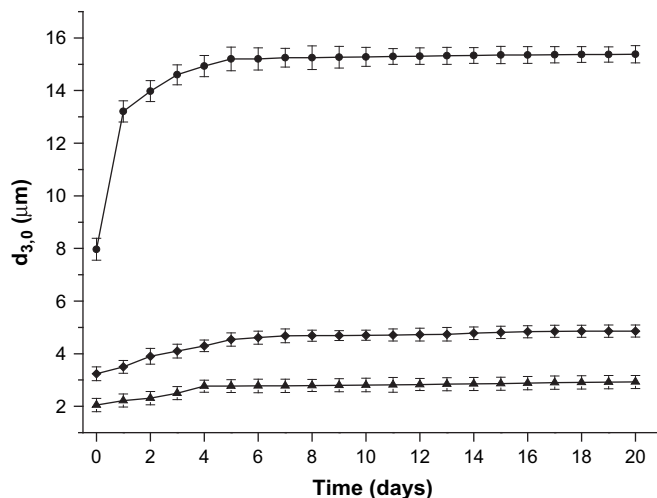


Fig. 6. Change in the number volume mean diameter ($d_{3,0}$) of: $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:GA}$ (◆); $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:MG}$ (▲); and $(W_1/O/W_2)_{0.7\%,2:1,WPC:LMP}$ (●) multiple emulsions over time.

which expands. Expansion on dilution cannot occur indefinitely, due to flexibility constraints in the macromolecular backbone. The more expanded is the polyion, the higher is the “stiffness” of the macromolecular backbone and the exposed charged sites possess less freedom for interaction. This phenomenon, in addition to the fact that the numbers of polyions available in diluted systems are lower explain the sharp decrease in coacervate yield at low biopolymers concentrations. At relatively high biopolymers concentrations, the degree of ionization of the macromolecule is lower, and the flexibility of the macromolecular backbone is much higher as it is less expanded, so that the charged sites are more readily available for interaction, thus resulting in higher coacervate yields. These results are important in that they pinpoint that neither too low nor high total biopolymers concentrations allow for an efficient coacervate formation (Espinosa-Andrews et al., 2007).

The maximum coacervate yield for the binary mixture WPC:LMP (90.21%) happened at 0.7% (w/w) (Fig. 3c), which was almost as twice better as the best concentrations (5–10%) for the WPC:MG and WPC:GA mixtures (Fig. 3a, b). These coacervate yield differences can be attributed to the differing macromolecular structures of the polysaccharides. While MG and GA consist of a mixture of highly branched arabinogalactan heteropolymers (Fenyo & Vandeveld, 1990; Vernon-Carter, Beristain, & Pedroza-Islas, 2000), LMP dominant's feature is a linear chain of α -(1 → 4)-linked D-galacturonic acid units with varying proportions of the acid groups present as methoxyl (methyl) esters (Voragen, Pilnik, Thibault, Axelos, & Renard, 1995). The linear macro ion (LMP) continues to expand in the absence of structural limitation, compared to the branched species (MG and GA) which reach a limit of expansion earlier because of their structural makeup (Pasika, 1977). Thus, LMP has a greater capability for interaction.

Table 2
Droplet size at zero time and $K_{C(W_1/O/W_2)_{a,b,c}}$ of the $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ multiple emulsions.

Multiple emulsions $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$			$d_{3,0}$ Fresh $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ multiple emulsions (μm)	Span (dimensionless)	$K_{C(W_1/O/W_2)_{a,b,c}}$ after 20 days of storage (s^{-1})
a	b	c			
5.0%	2:1	WPC:GA	$3.24 \pm 0.08_b$	$3.85 \pm 0.04_b$	$8.16 \times 10^{-7}_b$
5.0%	2:1	WPC:MG	$2.05 \pm 0.07_a$	$1.70 \pm 0.03_a$	$7.09 \times 10^{-7}_a$
0.7%	2:1	WPC:LMP	$7.97 \pm 0.39_c$	$8.79 \pm 0.18_c$	$1.25 \times 10^{-6}_c$

Values in the same column bearing different letters are significantly different ($P < 0.05$).

Table 3

Change in the amount of Fe^{2+} and Fe^{3+} across the time and encapsulation yield for the whole $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ multiple emulsions, and loss of total iron in W_1 after 480 h of storage time.

Time (h)	$(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:GA}$		$(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:MG}$		$(W_1/O/W_2)_{0.7\%,2:1,WPC:LMP}$	
	Fe^{2+} from total iron (%)	Fe^{3+} from total iron (%)	Fe^{2+} from total iron (%)	Fe^{3+} from total iron (%)	Fe^{2+} from total iron (%)	Fe^{3+} from total iron (%)
0	60.38 ± 0.51 _{f,A}	39.62 ± 0.51 _{a,B}	89.88 ± 0.65 _{h,B}	10.12 ± 0.65 _{a,A}	92.01 ± 1.60 _{g,B}	7.99 ± 1.60 _{a,A}
48	59.12 ± 0.70 _{f,B}	40.88 ± 0.70 _{a,B}	87.85 ± 0.52 _{g,C}	12.15 ± 0.52 _{b,A}	57.08 ± 0.45 _{f,A}	42.92 ± 0.45 _{b,C}
72	53.85 ± 0.42 _{e,B}	46.15 ± 0.42 _{b,C,B}	85.72 ± 0.21 _{f,C}	14.28 ± 0.21 _{c,A}	51.24 ± 0.42 _{e,A}	48.76 ± 0.42 _{c,C}
96	53.28 ± 0.31 _{e,B}	46.72 ± 0.31 _{c,B}	85.72 ± 0.15 _{f,C}	14.28 ± 0.15 _{c,A}	47.12 ± 0.49 _{c,d,A}	52.88 ± 0.49 _{d,e,C}
144	50.73 ± 0.25 _{d,B}	49.27 ± 0.25 _{d,B}	84.06 ± 0.38 _{e,C}	15.94 ± 0.38 _{d,A}	47.89 ± 0.30 _{d,A}	52.11 ± 0.30 _{d,C}
168	49.22 ± 0.29 _{d,B}	50.78 ± 0.29 _{d,B}	81.37 ± 0.27 _{d,C}	18.63 ± 0.27 _{e,A}	45.22 ± 0.15 _{c,A}	54.78 ± 0.15 _{e,C}
192	46.80 ± 0.53 _{c,A}	53.20 ± 0.53 _{e,B}	81.97 ± 0.19 _{d,B}	18.03 ± 0.19 _{e,A}	46.30 ± 0.35 _{cd,A}	53.70 ± 0.35 _{d,e,B}
240	55.34 ± 1.65 _{a,B}	44.66 ± 1.65 _{b,B}	77.52 ± 0.54 _{c,C}	22.48 ± 0.54 _{f,A}	42.49 ± 0.61 _{b,A}	57.51 ± 0.61 _{f,C}
336	42.99 ± 0.57 _{b,B}	57.01 ± 0.57 _{f,B}	69.77 ± 0.75 _{a,C}	30.23 ± 0.75 _{h,A}	39.12 ± 0.67 _{a,A}	60.88 ± 0.67 _{g,C}
480	40.58 ± 0.26 _{a,A}	59.42 ± 0.26 _{g,B}	71.25 ± 0.58 _{b,B}	29.75 ± 0.58 _{h,A}	39.78 ± 0.45 _{a,A}	60.22 ± 0.45 _{g,B}
EY (%)	73.84 ± 1.51 _A		88.14 ± 1.64 _B		91.02 ± 1.48 _B	
Loss of total iron in W_1 (%)	36.0 ± 0.53 _B		22.2 ± 0.35 _A		66.3 ± 0.42 _C	

Values in the same column bearing different small case letters are significantly different ($P < 0.05$). Values in the same row bearing different capital letters are significantly different ($P < 0.05$).

Coacervate yield was not only affected by the total concentration of the biopolymers used, but also by the ratio between the biopolymers. In Fig. 4, it is observed that the maximum coacervate yield was obtained using a Pr:Ps ratio equal to 2:1 for WPC:MG at pH_E , similar results were found for WPC:GA and WPC:LMP binary mixtures (data not shown). This ratio was confirmed experimentally by determining the chemical equivalents of each biopolymer by titration with 0.1N NaOH, being 0.7 mEq/g for WPC, 1.4 mEq/g for GA, 1.35 mEq/g for GM, and 1.3 mEq/g for LMP.

The GA, MG and LMP concentration in the coacervates was determined by elemental analysis and used as an indicative of coacervates yield. Maximum polysaccharides concentration in the coacervates (data not shown) was obtained at pH_C , total biopolymers concentrations of 5% for WPC–GA and WPC–MG, and 0.7% for WPC–LMP, and a biopolymer ratio of 2:1, agreeing with the results given above.

3.3. Characterization of the $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ multiple emulsions

All the multiple emulsions formed were type C systems (Fig. 5) where most of the multiple emulsion droplets contain a substantial number of inner droplets; the inner droplets in a type C emulsion are usually flocculated and rather close-packed (Dickinson & McClements, 1996). The binary biopolymer mixtures affected significantly the $d_{3,0}$, and the span of the freshly prepared $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ multiple emulsions, and in consequence in the $K_{C(W_1/O/W_2)_{a,b,c}}$ (Table 2). The $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:MG}$ multiple emulsion exhibited significantly lower initial $d_{3,0}$, span and $K_{C(W_1/O/W_2)}$ followed by the $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:GA}$, and by the $(W_1/O/W_2)_{0.7\%,2:1,WPC:LMP}$ multiple emulsions, respectively. Thus, an initial lower span value combined with a smaller droplet size in the fresh emulsions, resulted in emulsions that showed a greater stability, i.e., a lesser change in their droplet size per unit volume with aging time (Fig. 6). Food emulsions normally contain a range of different droplet sizes and the larger droplets tend to cream more rapidly

than the smaller droplets, so that there is a distribution of creaming rates within the emulsion, with the net result that there is both a droplet concentration profile and a droplet size profile in the vertical direction within an emulsion. As the larger droplets move upward more rapidly they collide with smaller droplets (McClements, 2005), forming three-dimensional droplets aggregates that eventually coalesce and destabilize the emulsions.

3.4. Protective effect of the $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ multiple emulsions against ferrous bisglycinate oxidation

All the $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ multiple emulsions showed a significant decrease in their Fe^{2+} content with storage time (Table 3). $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:MG}$ emulsion presented the smallest difference between the initial and final Fe^{2+} content, followed by the $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:GA}$ and $(W_1/O/W_2)_{0.7\%,2:1,WPC:LMP}$ multiple emulsions, respectively. The $(W_1/O/W_2)_{0.7\%,2:1,WPC:LMP}$ showed a non-significant different initial Fe^{2+} content from the $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:MG}$ multiple emulsion, but it was the one that suffered the most drastic Fe^{2+} content decrease with storage time (92.0%–39.78%). On the other hand, the $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:GA}$ multiple emulsion entrapped a significantly initial lower amount of Fe^{2+} , but its Fe^{2+}

Table 4

Z-average diameter of Pr:Ps complexes.

Pr:Ps complex	Z-average diameter (nm)
WPC:GA	484.90 ± 0.45 b
WPC:GM	529.40 ± 0.49 c
WPC:LMP	398.10 ± 0.36 a

Values bearing different letters are significantly different ($P < 0.05$).

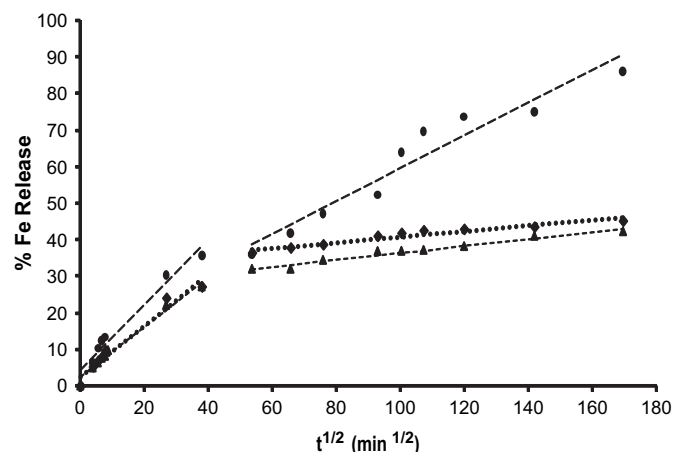


Fig. 7. Theoretically predicted (using Higuchi's model; discontinuous lines) and experimental data of ferrous bisglycinate release from W_1 to W_2 in: a) $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:GA}$ (.....; ◆), b) $(W_1/O/W_2)_{5\%,2:1,WPC:GM}$ (- - -; ▲), and c) $(W_1/O/W_2)_{0.7\%,2:1,WPC:LMP}$ (—; ●) multiple emulsions.

Table 5
Kinetic parameters of release of ferrous bisglycinate from W_1 to W_2 phases of $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ multiple emulsions during the first 24 h and after 24 h for each kinetic model tested.

	Kinetic parameters of release from multiple emulsions (first 24 h)					
	$(W_1/O/W_2)_{5\%, 2:1, WPC:GA}$	R^2	$(W_1/O/W_2)_{5\%, 2:1, WPC:MG}$	R^2	$(W_1/O/W_2)_{0.7\%, 2:1, WPC:LMP}$	R^2
K_{HC} (min ⁻¹)	2.00×10^{-4}	0.18	2.00×10^{-4}	0.11	3.00×10^{-4}	0.16
K_{PH} (min ⁻²)	4.40×10^{-2}	0.66	5.20×10^{-2}	0.46	8.00×10^{-2}	0.60
K_J (min ⁻¹)	4.60×10^{-1}	0.68	9.00×10^{-1}	0.74	1.60×10^1	0.70
K_0 (mg mL ⁻¹ min ⁻¹)	1.68×10^{-2}	0.85	1.64×10^{-2}	0.88	2.14×10^{-2}	0.84
K_1 (min ⁻¹)	1.10×10^{-3}	0.82	1.10×10^{-3}	0.84	1.00×10^{-3}	0.78
K_2 (mL mg ⁻¹ min ⁻¹)	-9.00×10^{-5}	0.69	-9.00×10^{-5}	0.67	-6.00×10^{-5}	0.56
K_H (mg mL ⁻¹ min ^{-0.5})	7.02×10^{-1}	0.97	6.88×10^{-1}	0.98	8.99×10^{-1}	0.96
Kinetic parameters of release from multiple emulsions (after 24 h)						
K_{HC} (min ⁻¹)	7.00×10^{-6}	0.39	9.00×10^{-6}	0.86	3.00×10^{-5}	0.78
K_{PH} (min ⁻²)	1.40×10^{-1}	0.69	1.70×10^{-1}	0.83	5.00×10^{-1}	0.90
K_J (min ⁻¹)	2.40×10^{-3}	0.49	2.60×10^{-3}	0.82	2.40×10^{-3}	0.89
K_0 (mg mL ⁻¹ min ⁻¹)	4.00×10^{-4}	0.90	3.00×10^{-4}	0.82	1.90×10^{-3}	0.85
K_1 (min ⁻¹)	1.00×10^{-5}	0.87	8.00×10^{-6}	0.80	3.00×10^{-5}	0.85
K_2 (mL mg ⁻¹ min ⁻¹)	-3.00×10^{-7}	0.85	-2.00×10^{-7}	0.78	-6.00×10^{-7}	0.79
K_H (mg mL ⁻¹ min ^{-0.5})	9.43×10^{-2}	0.96	7.46×10^{-2}	0.92	4.46×10^{-1}	0.93

K_{HC} , K_{PH} , K_J , K_0 , K_1 , K_2 , and K_H are the release rate constants for: Hixson & Crowell, Peppas-Higuchi, Jorgensen & Christensen, zero-order, first-order, second-order, and Higuchi's model respectively.

content was non-significantly lower than that of the $(W_1/O/W_2)_{0.7\%, 2:1, WPC:LMP}$ multiple emulsion at the end of the storage time (Table 3). These results suggest that both the Fe^{2+} entrapment capacity and the protection against the oxidation of ferrous bisglycinate were dependent of the type of polysaccharide used in the Pr:Ps complex forming the outer interfacial membrane of the multiple emulsions. A significantly higher protection against ferrous bisglycinate oxidation was provided by the $(W_1/O/W_2)_{5\%, 2:1, WPC:MG}$ than the $(W_1/O/W_2)_{5\%, 2:1, WPC:GA}$ multiple emulsion, despite that GA and MG have similar chemical composition and physicochemical characteristics (Vernon-Carter et al., 2000). It has been reported that MG has a considerably greater molecular weight ($\sim 2, 120, 000$ Da) (Vernon-Carter, Pedroza-Islas, & Beristain, 1998) than GA ($\leq 1, 000, 000$ Da) (Fenyo & Vandeveld, 1990), which is in agreement with results of z-average diameter of the Pr:Ps complexes presented in Table 4, so that it is probable that the adsorbed layer around the multiple emulsion containing MG is thicker than that containing GA, and that the resistance opposing the diffusion of pro-oxidant agents is directly proportional to the adsorbed biopolymer membrane thickness. The $(W_1/O/W_2)_{0.7\%, 2:1, WPC:LMP}$ multiple emulsion provided the worst protection against Fe^{2+} oxidation, and these results tend to confirm that the thickness of the adsorbed biopolymer layer might be in great measure responsible for providing protection to Fe^{2+} against oxidation, as LMP had the lowest molecular weight ($\sim 150, 000$ Da) among the three polysaccharides used and the WPC:LMP complex zeta-average diameter was the smallest among the three complexes used in this study. Adsorbed layer thickness seems to be also the main factor affecting multiple emulsion stability against coalescence. The greater the molecular weight of the polysaccharide making up the Pr:Ps complex, the greater the adsorbed layer thickness, the greater the steric repulsion forces (McClements, 2005), the lower the $(K_C)_{(W_1/O/W_2)_{a,b,c}}$ values, and the higher the multiple emulsion stability (Table 2).

3.4.1. Encapsulation yield and release kinetics

The EY of the $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ multiple emulsions is shown in Table 3. The results for EY were very similar and followed the same tendencies as that displayed by the Fe^{2+} concentrations the $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ multiple emulsions, i.e., that the $(W_1/O/W_2)_{5\%, 2:1, WPC:MG}$ and $(W_1/O/W_2)_{0.7\%, 2:1, WPC:LMP}$ multiple emulsions showed non-significant differences in EY between themselves, but significantly higher EY than the $(W_1/O/W_2)_{5\%, 2:1, WPC:GA}$ multiple emulsion.

The amount of total iron within W_1 for each $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ multiple emulsion diminished significantly in all cases with storage time as follows: 22.2% for $(W_1/O/W_2)_{5\%, 2:1, WPC:MG}$, 36.0% for $(W_1/O/W_2)_{5\%, 2:1, WPC:GA}$, and 66.3% for $(W_1/O/W_2)_{0.7\%, 2:1, WPC:LMP}$, respectively, probably because the portion of iron that was released into W_2 was oxidized.

Experimental release curves of the ferrous bisglycinate from the $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ multiple emulsions are given in Fig. 7. Fitting of the experimental data to Hixson & Crowell, Peppas-Higuchi, Jorgensen & Christensen, zero, first and second-order kinetics provided relatively low correlation coefficients (R^2 ranged in between 0.11 and 0.90), probably because the data seemed to follow a global release process that occurred in two consecutive single processes with different release kinetic rates: (1) An initial stage characterized by a steep gradient induced by the relatively high initial total iron concentration in the interior of W_1 compared to its concentration in W_2 , which took place at short storage times (~ 24 h), and (2) a second stage occurring at storage times larger than 24 h, where the gradient drastically diminished, probably because the concentrations in total iron between W_1 and W_2 tended to equilibrium. The data of both the steep and the relatively flat gradient stages of Fig. 7 were fitted to Higuchi's model (Higuchi, 1961), obtaining high correlation coefficients (R^2 from 0.92 to 0.98) (Table 5). Higuchi's release kinetics constants (K_H) for the steep gradient stage were from lower to higher as follows: $0.69 \text{ mg mL}^{-1} \text{ min}^{-0.5}$ for $(W_1/O/W_2)_{5\%, 2:1, WPC:MG}$, $0.70 \text{ mg mL}^{-1} \text{ min}^{-0.5}$ for $(W_1/O/W_2)_{5\%, 2:1, WPC:GA}$, and $0.90 \text{ mg mL}^{-1} \text{ min}^{-0.5}$ for $(W_1/O/W_2)_{0.7\%, 2:1, WPC:LMP}$, and for the second relatively flat gradient stage were $0.07 \text{ mg mL}^{-1} \text{ min}^{-0.5}$ for $(W_1/O/W_2)_{5\%, 2:1, WPC:MG}$, $0.09 \text{ mg mL}^{-1} \text{ min}^{-0.5}$ for $(W_1/O/W_2)_{5\%, 2:1, WPC:GA}$, and $0.45 \text{ mg mL}^{-1} \text{ min}^{-0.5}$ for $(W_1/O/W_2)_{0.7\%, 2:1, WPC:LMP}$, respectively. These results seem to indicate and confirm that release kinetics of ferrous bisglycinate from the inner aqueous phase of the multiple emulsions to the outer aqueous phase is highly dependent on the length of the diffusion pathways, i.e. the thicker the Pr:Ps complex interfacial membrane thickness in the $(W_1/O/W_2)_{a,b,c}$ multiple emulsions, the slower the release kinetics.

4. Conclusions

In this work a methodology and the general guidelines for achieving an efficient encapsulation, enhancing the protection against oxidation and controlling the rate of release of ferrous

biglycinate from water-in-oil-in-water multiple emulsions stabilized with protein:polysaccharides complexes was established. Given that ferrous deficiency is the most common nutritional deficiency in both the industrialized and developing worlds, affecting mostly infants, children, and women of childbearing age, we hope that this work helps to mitigate this problem.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) of Mexico for partially financing this project through grant U-81157-Z.

References

- AOAC Official Methods of Analysis. (1995). *AOAC official method 977.30. Iron in drugs, spectrophotometric method*. Drugs part I, (pp. 11–12). Arlington: AOAC International.
- Bais, D., & Lapasin, R. (2003). Studio di matrici polisaccharidiche per emulsioni: interazioni polimero tensioattivo e proprietà reologiche. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 80, 129–139.
- Benichou, A., Aserin, A., & Garti, N. (2002). Double emulsions stabilized by new molecular recognition hybrids of natural polymers. *Polymers for Advanced Technologies*, 13, 1019–1031.
- Bergensstahl, B. (1995). Emulsions. In S. T. Becket, & G. Talbot (Eds.), *Physico-chemical aspects of food processing* (pp. 49–64). London: Chapman & Hall.
- Bonnet, M., Cansell, M., Berkaoui, A., Ropers, M. H., Anton, M., & Leal-Calderon, F. (2009). Release rate profiles of magnesium from multiple W/O/W emulsions. *Food Hydrocolloids*, 23, 92–101.
- Bovell-Benjamin, A. C., Viteri, F. E., & Allen, L. H. (2000). Iron absorption from ferrous biglycinate and ferric triglycinate in whole maize is regulated by iron status. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 1563–1569.
- Dickinson, E. (2008). Interfacial structure and stability of food emulsions as affected by protein–polysaccharide interactions. *Soft Matter*, 4, 932–942.
- Dickinson, E., & McClements, D. J. (1996). *Advances in food colloids*. London: Blackie Academic & Professional.
- Espinosa-Andrews, H., Báez-González, J. G., Cruz Sosa, F., & Vernon-Carter, E. J. (2007). Gum arabic-chitosan complex coacervation. *Biomacromolecules*, 8, 1313–1318.
- Ettelaie, R., Akinshina, A., & Dickinson, E. (2008). Mixed protein–polysaccharide interfacial layers: a self consistent field calculation study. *Faraday Discussions*, 139, 161–178.
- Fenyo, J. C., & Vandeveld, M. C. (1990). Physico-chemical properties of gum Arabic in relation to structure. In G. O. Phillips, D. J. Wedlock, & P. A. Williams (Eds.), *Gums and stabilizers for the food industry*, Vol. 5 (pp. 17–23). Oxford: IRL Press.
- Higuchi, T. (1961). Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50, 874–879.
- Kitchener, J. A., & Mussellwhite, P. R. (1969). The theory of stability of emulsions. In Sherman, (Ed.), *Emulsion science* (pp. 77–130). London: Academic Press Inc.
- Kralj, D., & Brečević, L. (1998). Precipitation of some slightly soluble salts using emulsion liquid membranes. *Croatian Chemical Acta*, 71, 1049–1060.
- Lobato-Calleros, C., Rodriguez, E., Sandoval-Castilla, O., Vernon-Carter, E. J., & Alvarez-Ramirez, J. (2006). Reduced-fat white fresh cheese-like products obtained from W₁/O/W₂ multiple emulsions: viscoelastic and high-resolution image analyses. *Food Research International*, 39, 678–685.
- Lobato-Calleros, C., Sosa-Pérez, A., Rodríguez-Tafaya, J., Sandoval-Castilla, O., Pérez-Alonso, C., & Vernon-Carter, E. J. (2008). Structural and textural characteristics of reduced-fat cheese-like products made from W₁/O/W₂ emulsions and skim milk. *LWT – Food Science and Technology*, 41, 1847–1856.
- Lutz, R., Aserin, A., Portnoy, Y., Gottlieb, M., & Garti, N. (2009). On the confocal images and the rheology of whey protein isolated and modified pectins associated complex. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 69, 43–50.
- McClements, D. J. (2005). *Food emulsions. Principles, practices, and techniques*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Muschliolik, G. (2007). Multiple emulsions for food use. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 12, 213–220.
- Pasika, W. M. (1977). Polysaccharide polyelectrolytes. In P. A. Sanford, & A. I. Laskin (Eds.), *Extracellular microbial polysaccharides*, Vol. 45 (pp. 128–159). Washington, DC: ACS Symposium Series.
- Pimentel-González, D., Revah, S., Campos-Montiel, R., Monroy-Hermosillo, O., & Vernon-Carter, E. J. (2008). A laboratory study of the biodegradation of MTBE solubilised in water by a microbial consortium entrapped in a water-in-oil-in-water double emulsion. *Process Biochemistry*, 43, 1239–1243.
- Rodríguez-Huezo, M. E., Pedroza-Islas, R., Prado-Barragán, L. A., Beristain, C. I., & Vernon-Carter, E. J. (2004). Microencapsulation by spray drying of multiple emulsions containing carotenoids. *Journal of Food Science*, 69, E351–E359.
- Ruiz-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, 355–363.
- Tolstoguzov, Y. B. (1990). Interactions of gelatin with polysaccharides. In G. O. Phillips, D. J. Wedlock, & P. A. Williams (Eds.), *Gums and stabilisers for the food industry 5* (pp. 157–175). Oxford: IRL Press.
- Tolstoguzov, Y. B. (1998). Functional properties of protein–polysaccharide mixtures. In S. E. Hill, D. A. Ledward, & J. R. Mitchell (Eds.), *Functional properties of food macromolecules* (pp. 252–277). Gaithersburg: Aspen Publishers.
- Vernon-Carter, E. J., Beristain, C. I., & Pedroza-Islas, R. (2000). Mesquite gum (*Prosopis gum*). In G. Doxastasis, & V. Kiosseoglou (Eds.), *Novel macromolecules in food systems* (pp. 217–235). Amsterdam: Elsevier.
- Vernon-Carter, E. J., Gómez, S. A., Beristain, C. I., Mosqueira, G., Pedroza-Islas, R., & Moreno-Terrazas, R. C. (1996). Color degradation and coalescence kinetics of Aztec marigold oleoresin-in-water emulsions stabilized by mesquite or arabic gums and their blends. *Journal of Texture Studies*, 27, 625–641.
- 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, 553–567.
- Voragen, A. G. J., Pilnik, W., Thibault, J. F., Axelos, M. A. V., & Renard, C. M. G. C. (1995). Pectins. In A. M. Stephen (Ed.), *Food polysaccharides and their applications* (pp. 287–339). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Weinbreck, F., Nieuwenhuijse, H., Robijn, G. W., & de Kruij, C. G. (2003). Complex formation of whey proteins: exocellular polysaccharide EPS B40. *Langmuir*, 19, 9404–9410.
- Weinbreck, F., Tromp, R. H., & de Kruij, C. G. (2004). Composition and structure of whey protein/gum arabic coacervates. *Biomacromolecules*, 5, 1437–1445.
- Weinbreck, F., Wientjes, R. H. W., Nieuwenhuijse, H., Robijn, G. W., & de Kruij, C. G. (2004). Rheological properties of whey protein/gum arabic coacervates. *Journal of Rheology*, 48, 1215–1228.

13.2. Potencial zeta

Los coloides están en todas partes y la medición del potencial zeta puede ser utilizado para su conocimiento y control. Entre ellos pueden incluirse complejos sistemas alimenticios como las emulsiones, biológicos como la sangre o sistemas funcionales como las pinturas. En cada caso las propiedades físicas y funcionales de los sistemas están fuertemente afectadas por las propiedades de los coloides. Por su tamaño microscópico, las fuerzas de unión en la superficie del coloide y el líquido son las que determinan su comportamiento. Uno de los mayores efectos de la superficie son los fenómenos electrocinéticos. Cada coloide contiene una carga eléctrica que suele ser de naturaleza negativa, aunque también puede ser positiva. Estas cargas producen fuerzas de repulsión electrostática entre los coloides vecinos. Si la carga es suficientemente elevada los coloides permanecen discretos, dispersos y en suspensión. Reduciendo o eliminando estas cargas se obtiene el efecto opuesto y los coloides se aglomeran y sedimentan fuera de la suspensión.

La Doble Capa. Se usa el modelo de la doble capa para visualizar la atmósfera iónica en la proximidad del coloide cargado y para explicar cómo actúan las fuerzas eléctricas de repulsión. Es posible entender este modelo como una secuencia de etapas que ocurren alrededor de un solo coloide negativo, si los iones que neutralizan sus cargas son repentinamente sacados.

Veamos primero el efecto del coloide sobre el ion positivo (llamado contra-ion) en la solución. Inicialmente, la atracción del coloide negativo hace que algunos iones positivos formen una rígida capa adyacente alrededor de la superficie del coloide; esta capa de contra-iones es conocida como la capa de Stern (Fig. 20). Otros iones positivos adicionales son todavía atraídos por el coloide negativo, pero estos son ahora rechazados por la capa de Stern, así como por otros iones positivos que intentan acercarse al coloide. Este equilibrio dinámico

resulta en la formación de una capa difusa de contra-iones. Los contra-iones tienen una alta concentración cerca de la superficie, la cual disminuye gradualmente con la distancia, hasta que se logra un equilibrio con la concentración de los contra-iones en el seno de la disolución.

En forma similar, aunque opuesta, en la capa difusa hay un déficit de iones negativos, llamados co-iones pues tienen la misma carga que el coloide. Su concentración se incrementa gradualmente al alejarse del coloide, mientras que las fuerzas repulsivas del coloide son compensadas por los iones positivos, hasta alcanzar nuevamente el equilibrio. La capa difusa puede ser visualizada como una atmósfera cargada rodeando al coloide. A cualquier distancia de la superficie, la densidad de carga es igual a la diferencia de concentración entre iones positivos y negativos. La densidad de carga es mucho mayor cerca del coloide y gradualmente disminuye a cero cuando las concentraciones de iones positivos y negativos se asemejan. Los contra-iones de la capa de Stern y de la capa difusa en conjunto dan origen a la llamada doble capa. El espesor de esta doble capa depende del tipo y concentración de los iones de la solución.

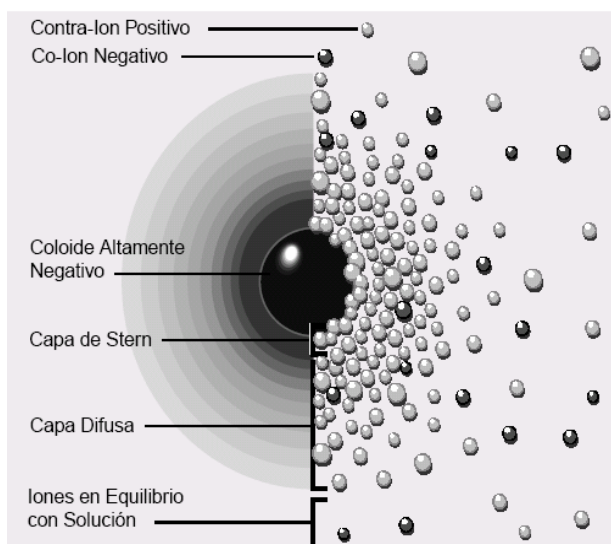


Figura 20. Esquema que muestra el modelo de la doble capa.

El Potencial Zeta. El coloide negativo y su atmósfera cargada positivamente producen un potencial eléctrico relativo a la solución. Este tiene un valor máximo en la superficie y disminuye gradualmente con la distancia, aproximándose a cero fuera de la capa difusa. La caída del potencial y la distancia desde el coloide es un indicador de la fuerza repulsiva entre los coloides en función de la distancia en la cual estas fuerzas entran en juego. Un punto de particular interés es el potencial donde se unen la capa difusa y la de Stern. Este potencial es conocido como el potencial zeta, el cual es importante porque puede ser medido de una manera muy simple, mientras que la carga de la superficie y su potencial no pueden medirse (Fig. 21). El potencial zeta puede ser una manera efectiva de controlar el comportamiento del coloide puesto que indica cambios en el potencial de la superficie y en las fuerzas de repulsión entre los coloides.

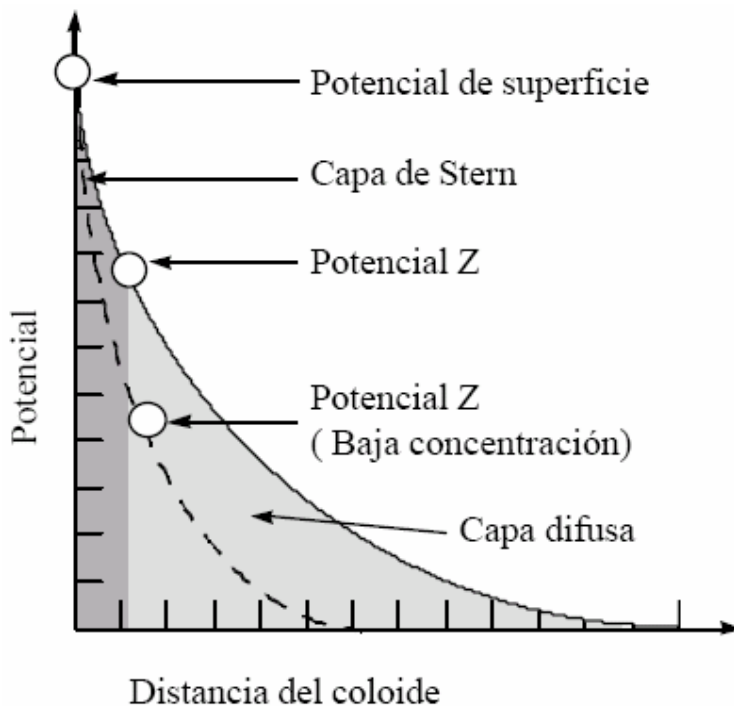


Figura 21. Localización del potencial Zeta dentro de la doble capa.

La determinación del potencial zeta puede realizarse mediante la determinación de la movilidad electroforética de las partículas coloidales. Esta técnica consiste en la adaptación de dos electrodos colocados en los extremos de una cámara (celda electroforética) y conectados a una fuente de poder, creándose un campo eléctrico que cruza la celda. Los coloides cargados migran en el campo y su movimiento y dirección están relacionados con su potencial zeta, la intensidad del campo, la constante dieléctrica y viscosidad del medio. Todos estos parámetros están readicionados en la ecuación de Henry:

$$U_E = \frac{2\varepsilon\xi f(K_a)}{3\eta} \quad (4)$$

donde:

ξ es el potencial zeta

U_E es la movilidad electroforética

ε es la constante dieléctrica del sistema

η es la viscosidad

$f(K_a)$ es la función de Henry, que generalmente presenta valores entre 1.0-1.5

13.3. Cambio en el diámetro volumétrico medio ($d_{3,0}$) de las emulsiones primarias a diferentes concentraciones totales de tensoactivo.

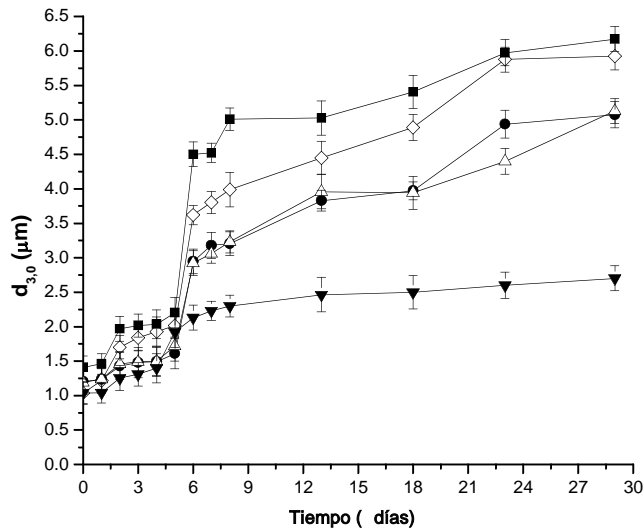


Figura 22. Cambio en el diámetro volumétrico medio ($d_{3,0}$) de las emulsiones primarias: $(W_1/O)_{6\%,9:1}$ (◇); $(W_1/O)_{6\%,8:2}$ (●); $(W_1/O)_{6\%,7:3}$ (Δ); $(W_1/O)_{6\%,6:4}$ (▼); y $(W_1/O)_{6\%,5:5}$ (■) en el tiempo.

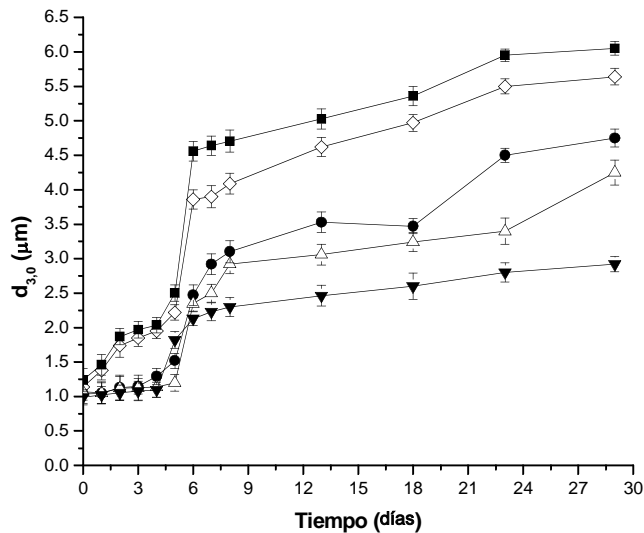


Figura 23. Cambio en el diámetro volumétrico medio ($d_{3,0}$) de las emulsiones primarias: $(W_1/O)_{8\%,9:1}$ (◇); $(W_1/O)_{8\%,8:2}$ (●); $(W_1/O)_{8\%,7:3}$ (Δ); $(W_1/O)_{8\%,6:4}$ (▼); y $(W_1/O)_{8\%,5:5}$ (■) en el tiempo.

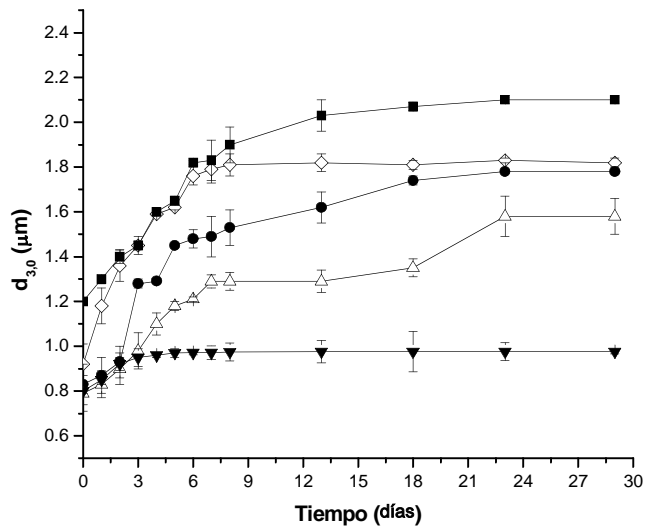


Figura 24. Cambio en el diámetro volumétrico medio ($d_{3,0}$) de las emulsiones primarias: $(W_1/O)_{12\%,9:1}$ (◇); $(W_1/O)_{12\%,8:2}$ (●); $(W_1/O)_{12\%,7:3}$ (Δ); $(W_1/O)_{12\%,6:4}$ (▼); y $(W_1/O)_{12\%,5:5}$ (■) en el tiempo..

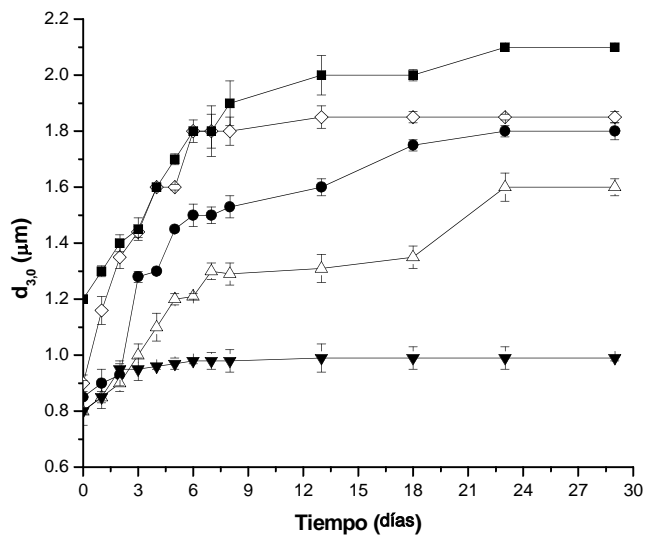


Figura 25. Cambio en el diámetro volumétrico medio ($d_{3,0}$) de las emulsiones primarias: $(W_1/O)_{14\%,9:1}$ (◇); $(W_1/O)_{14\%,8:2}$ (●); $(W_1/O)_{14\%,7:3}$ (Δ); $(W_1/O)_{14\%,6:4}$ (▼); y $(W_1/O)_{14\%,5:5}$ (■) en el tiempo.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

**ESTUDIO DEL EFECTO DE COMPLEJOS
BIOPOLIMÉRICOS EN LA ESTABILIZACIÓN Y
PROPIEDADES FUNCIONALES DE EMULSIONES
MÚLTIPLES CONTENIENDO HIERRO BIGLICINADO**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA
PRESENTA:
RUBÉN JIMÉNEZ ALVARADO

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'E. J. V. C.', is written over the printed name of the director.

Director
Dr. E. Jaime Vernon Carter

México, D.F.

Febrero de 2010