

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



MODULACIÓN DE LAS PROPIEDADES DEL CONCENTRADO DE PROTEÍNA DE  
SUERO Y GOMA ARÁBIGA PARA SU AUTOENSAMBLAJE Y USO EN LA  
ESTABILIZACIÓN DE EMULSIONES PICKERING DOBLES ACEITE-AGUA-  
ACEITE

## T E S I S

para obtener el grado de Doctora en Biotecnología

## P R E S E N T A

M. en C.A. Ana Guadalupe Estrada Fernández

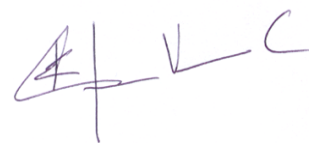
### CoDirección

Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter

Dra. Angélica Román Guerrero

### Asesor

Dr. Rubén Jiménez Alvarado



México, CDMX

Febrero, 2018

México, CDMX a 23 de Febrero del 2018

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad  
Iztapalapa aprobó la tesis

**MODULACIÓN DE LAS PROPIEDADES DEL CONCENTRADO DE PROTEÍNA DE  
SUERO Y GOMA ARÁBIGA PARA SU AUTOENSAMBLAJE Y USO EN LA  
ESTABILIZACIÓN DE EMULSIONES PICKERING DOBLES ACEITE-AGUA-ACEITE**

Que presentó:

Ana Guadalupe Estrada Fernández

**Comité tutorial**

Codirector: Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter  
Codirector: Dra. Angélica Román Guerrero  
Asesor: Dr. Rubén Jiménez Alvarado

**Comité de evaluación**

Presidente: Dr. Francisco Cruz Sosa  
Secretario: Dr. Benoit Auguste Roger Fouconnier  
Vocal: Dra. Angélica Román Guerrero  
Vocal: Dra. Landy Hernández Rodríguez



Four handwritten signatures on horizontal lines, corresponding to the members of the evaluation committee.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Jaime Vernon Carter, por haber depositado en mí su confianza y por sus sabios y oportunos conocimientos. Sinceramente agradezco su confianza y paciencia y sobre todo por su apoyo.

Al Dr. Rubén Jiménez Alvarado y a la Dra. Angélica Román Guerrero por el apoyo, confianza, guía y sobre todo su amistad durante la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado Dra. Landy Hernández Rodríguez, Dr. Francisco Cruz Sosa y Dr. Benoit Auguste Roger Fouconner por su asesoría, sus sugerencias y su valiosa intervención en la finalización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero brindado a través de los proyectos de Ciencia Básica números 236500 y 236565.

## **DEDICATORIA**

A mi mamá, July, mi tía Clara, y mis hermanas Karol, Lety y Didi, por nunca perder la esperanza en mí y creer en cada sueño que me propuse, siempre alentarme en seguir adelante y tener siempre presente la enseñanza de “el no ya lo tienes”.

A mi esposo Rodolfo, por todo el cariño, tolerancia y comprensión que tuvo hacia mí, por compartir conmigo los momentos difíciles que pasamos y me dejaron muchas enseñanzas, pero que supimos sacarlos adelante como familia, gracias por todo.

A mis compañeros y amigos de laboratorio W-107, César, Ángeles, Samuel y Daniel por ser más llevadero mi paso por el laboratorio y las duras batallas dadas con los equipos, así como las anécdotas contadas durante los lapsos de tiempo de pase, muchas gracias. Y a mi inigualable amiga Arely, gracias por los buenos cotorreos y ratos de sabiduría.

Y a Dios por permitirme terminar esta etapa de mi vida con grandes enseñanzas y por darme la oportunidad de conocer a grandes personas y amigos que son parte importante en mi vida.

## ÍNDICE GENERAL

Índice General	i
Índice de figuras	v
Índice de tablas	viii
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
2. Antecedentes	7
2.1. Emulsiones	7
2.1.1. Conceptos y tipos	7
2.1.2. Proceso de homogenización	9
2.1.3. Mecanismos generales de inestabilidad de las emulsiones	12
2.1.4. Inestabilidad de emulsiones dobles	14
2.2. Estabilizantes y emulsificantes	15
2.2.1. Agentes Tensoactivos	16
2.2.2. Biopolímeros	19
2.3. Emulsiones Pickering	27

2.3.1. Ángulo de contacto	29
2.3.2. Estabilidad de emulsiones Pickering	33
2.4. Coacervados	35
3. Justificación	40
4. Objetivos	41
4.1. Objetivo general	41
4.2. Objetivos particulares	41
5. Hipótesis	42
6. Materiales y métodos	43
6.1. Materiales	45
6.2. Primera etapa	46
6.2.1. Determinación del pH óptimo para la complejación de WPC-GA	46
6.2.2. Determinación de las relaciones en peso WPC-GA para la formación de complejos Solubles e insolubles	46
6.3. Segunda etapa	47
6.3.1. Medición de ángulo de contacto	47
6.3.2. Preparación de partículas sólidas de WPC-GA	48

---

6.3.3. Espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR)	49
6.3.4. Hidrofobicidad superficial de partículas sólidas	49
6.3.5. Tensión interfacial	50
6.3.6. Reología interfacial	51
6.4. Tercera etapa	53
6.4.1. Formación de emulsiones Pickering dobles aceite-en-agua-en-aceite	53
6.4.2. Análisis de tamaño medio de gota de las emulsiones	54
6.4.3. Morfología de las emulsiones	54
6.5. Análisis estadístico	55
7. Resultados	56
7.1. Potencial zeta	56
7.2. Efecto de la relación en peso y pH de los biopolímeros en la formación de complejos	58
7.3. Humectabilidad de películas realizadas con CI	60
7.4. Caracterización de partículas	63
7.4.1. Tamaño de partícula	63
7.4.2. Espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR)	66

---

7.4.3. Hidrofobicidad superficial de partículas sólidas	71
7.5. Actividad superficial de las SP <sub>T</sub>	73
7.5.1. Tensión interfacial (IFT)	73
7.5.2. Reología interfacial	77
7.6. Tamaño de gota de la emulsión O <sub>1</sub> /W	78
7.7. Concentración de partículas de coacervado insoluble para la elaboración de emulsiones Dobles Pickering	80
7.8. Estabilidad en el almacenamiento de las emulsiones dobles Pickering	84
7.9. Morfología de las PDE <sub>T,X</sub>	88
8. Conclusiones	92
9. Referencias	93
Anexos	108



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Representación esquemática de emulsiones dobles	8
Figura 2.2. Mecanismos de inestabilidad de emulsiones	13
Figura 2.3. Representación esquemática de los principales mecanismos de rompimiento de una emulsión doble: (A) coalescencia de las gotas externas, (B) coalescencia de las gotas internas, (C) coalescencia de las gotas internas/externas y (D) contracción o hinchamiento de las gotas internas.	15
Figura 2.4. Representación esquemática de (a) estructura de un tensoactivo, (b) moléculas de tensoactivo en la interfase, y (c) micelas de tensoactivo esféricas	18
Figura 2.5. Representación esquemática de conformaciones de moléculas adsorbidas de biopolímero globular y flexible en una interfase aceite-agua. Los segmentos no polares tienden a sobresalir en la fase de aceite, mientras que los segmentos polares sobresalen en la fase de agua.	21
Figura 2.6. Diversas configuraciones de un polipéptido flexible al colocarse en la interfase.	23
Figura 2.7. Representación de una emulsión clásica a base de tensoactivo (a) y de una emulsión Pickering (b). Las partículas sólidas adsorbidas en la interfase aceite-agua estabilizan las gotas en lugar de las moléculas de tensoactivo.	27
Figura 2.8. Ángulo de contacto y tensiones interfaciales.	30

Figura 2.9. Comportamiento de partículas en la interfase aceite-agua. (a) ángulo de contacto  $< 90^\circ$ , partículas estabilizan emulsiones O/W; (b) ángulo de contacto  $\sim 90^\circ$ , sin formación preferencial; y (c) ángulo de contacto  $< 90^\circ$ , pueden formar emulsiones W/O 32

Figura 2.10. Representación esquemática de disposiciones de estabilización alternativas de partículas en una película fina entre gotas de emulsión estrechamente próximas: (a) monocapas de partículas en las dos interfases aceite-agua; y (b) capa de red de baja densidad de partículas agregadas 34

Figura 2.11. Principales tendencias en el comportamiento de las mezclas de proteína/polisacárido. 37

Figura 2.12. Ilustración esquemática de dos enfoques alternativos de preparación de emulsiones aceite-agua utilizando complejos de proteína-polisacárido como emulsionante. (a) Emulsiones mixtas, complejo proteínas-polisacáridos presentes durante la emulsificación, y (b) emulsión paca por capa, polisacárido agregado a la emulsión previamente estabilizado por proteína 38

Figura 6.1. Diagrama de flujo esquemático que muestra las diferentes etapas de este trabajo. 44

Figura 7.1. Valores de potencial- $\zeta$  de soluciones acuosas de WPC y GA en función del pH. La línea vertical denota el potencial- $\zeta$  estequiométrico entre los biopolímeros. 57

Figura 7.2. Efecto del pH y relación en peso ( $R_{WPC-GA}$ ) a una concentración total de 1% p/v en lecturas de turbidez del sobrenadante 59

Figura 7.3. Ángulo de contacto de gota de agua sobre FT de coacervado insoluble WPC-GA secadas a diferentes tratamientos térmicos; (a) F<sub>60</sub> con un  $\theta = 98.6^\circ$ , (b) F<sub>80</sub> con un  $\theta = 102.6^\circ$ , (c) F<sub>100</sub> con un  $\theta = 107.7^\circ$  y (d) F<sub>120</sub> con un  $\theta = 114.4^\circ$ . 62

Figura 7.4. Efecto del tiempo de sonicación sobre el tamaño de partícula de las SP<sub>T</sub> dispersadas en aceite de canola. 66

Figura 7.5. Diferentes contribuciones de amidas para la región de flexión IR en el intervalo de 1300 -1720 cm<sup>-1</sup>. Los modos vibracionales de la amida I y II son también ilustrados en un fragmento de un péptido 67

Figura 7.6. (a) Espectro de IR normalizados de GA, WPC y SP<sub>T</sub> que muestran la ubicación de las bandas de Amida I y Amida II. (b) Ejemplo de curva deconvolucionada en la banda de Amida I. 70

Figura 7.7. Variación de la estructura secundaria de WPC en función del tratamiento térmico de las partículas de coacervado insoluble SP<sub>T</sub>. 71

Figura 7.8. Gráfica del coeficiente de partición (PQ) del colorante rosa de bengala al aumentar el área superficial de las SP<sub>T</sub>. 73

Figura 7.9. Medición de tensión interfacial de las partículas de coacervado insoluble (SP<sub>T</sub>) tratadas a diferentes temperaturas. 76

Figura 7.10. Comportamiento interfacial de fluencia capacitancia para las capas de adsorción de partículas sólidas WPC-GA en tres tiempos de envejecimiento para los cuatro tratamientos térmicos evaluados: SP<sub>60</sub> (a), SP<sub>80</sub> (b), SP<sub>100</sub> (c), y SP<sub>120</sub> (d). 78

Figura 7.11. Cambio de diámetro  $d_{1,0}$  a través del tiempo de almacenamiento de las emulsiones primarias estabilizadas con el coacervado soluble. 80

Figura 7.12. Evolución del diámetro medio de las emulsiones dobles  $O_1/W/O_2$  a lo largo del tiempo 87

Figura 7.13. Morfología de las gotas de las emulsiones dobles Pickering, de acuerdo a la microscopía óptica para (a)  $SP_{60}$ , (b)  $SP_{80}$ , (c)  $SP_{100}$  y (d)  $SP_{120}$  89

Figura 7.14. Microscopía confocal láser de barrido (CLSM) utilizando isotiocianato de fluoresceína como agente de tinción para (a)  $SP_{60}$ , (b)  $SP_{80}$ , (c)  $SP_{100}$  y (d)  $SP_{120}$  90

Figura 7.15. Microscopía óptica de; (a)  $DPE_{60,5}$ , (b)  $DPE_{80,5}$ , (c)  $DPE_{100,5}$  y (d)  $DPE_{120,5}$  al haber transcurrido 76 días de almacenamiento. 91

## ÍNDICE DE TABLAS

Cuadro 2.1. Diferentes tipos de homogeneizadores usados para elaborar emulsiones 11

Cuadro 7.1. Evolución de diámetro de gota con respecto a la concentración de partículas de coacervado soluble. 82

## Resumen

Los complejos solubles (CS) e insolubles (CI) se obtuvieron a partir de concentrado de proteína de suero y goma arábiga los cuales interaccionaban a un pH de 4.0, usando relaciones de masa de biopolímero de 2:1 y 3:1, respectivamente. Las partículas ( $SP_T$ ) se produjeron a partir de CI, secándose a diferentes temperaturas (60, 80, 100 y 120 °C). A medida que las temperaturas iban incrementando, se notó un incremento en el ángulo de contacto  $60\text{ °C} = 98.6^\circ$ ,  $80\text{ °C} = 102.6^\circ$ ,  $100\text{ °C} = 107.7^\circ$  y  $120\text{ °C} = 114.4^\circ$ , modificando la estructura secundaria de la proteína en mayor medida, y disminuyendo la tensión interfacial. La emulsión primaria  $O_1/W$  y las emulsiones dobles  $O_1/W/O_2$  se estabilizaron con CS y  $SP_T$ , respectivamente. El tamaño medio de gota de la emulsión primaria fresca y de las emulsiones dobles aumentó de 0.62 a 0.66  $\mu\text{m}$  y de 9.34-4.35 a 10.45-4.63  $\mu\text{m}$  después de 76 días de almacenamiento, respectivamente. Las microfotografías confocales permitieron observar las gotitas de aceite internas rodeadas por CS, y las gotas de agua de emulsión doble por  $SP_T$ . Las partículas hidrófobas obtenidas de CI representan una alternativa viable para sustituir el uso de tensoactivos sintéticos en las interfases  $W/O_2$ .

## **Abstract**

The soluble (CS) and insoluble complexes (CI) were obtained from whey protein concentrate and gum Arabic which interacted, at a pH of 4.0, using biopolymer mass ratios of 2:1 and 3:1, respectively. The particles ( $SP_T$ ) were produced from IC and dried at different temperatures (60, 80, 100 and 120 ° C). As the temperatures increased, an increase in the contact angle was observed: 60 ° C = 98.6 °, 80 ° C = 102.6 °, 100 ° C = 107.7 ° and 120 ° C = 114.4 °, and modifying the secondary structure of protein to a greater extent, and decreased interfacial tension to lower values. The  $O_1/W$  primary emulsion and the  $O_1/W/O_2$  double emulsions were stabilized with CS and  $SP_T$ , respectively. The sample size of the fresh primary emulsion and the double emulsions increased from 0.62 to 0.66  $\mu\text{m}$  and from (9.34-4.35 to 10.45-4.63  $\mu\text{m}$ ) after 76 days of storage, respectively. Confocal micro photos allowed observing the internal oil droplets surrounded by CS, and the water droplets of double emulsion by  $SP_T$ . Hydrophobic IC particles represent a viable alternative to replace the use of synthetic surfactants at the  $W/O_2$  interfaces.

## 1. Introducción

Las emulsiones dobles son sistemas complejos multifásicos polidispersos que consisten en una emulsión en la que las gotitas dispersas son en sí mismas una emulsión (Bhatia et al., 2013; Schmidt et al., 2015). Estas emulsiones son prometedoras en muchos campos debido a su estructura compartimentalizada que les otorga el potencial de separar, encapsular, proteger y facilitar la liberación sostenida y el transporte de compuestos bioactivos (Schmidt et al., 2015; Sivapriya et al., 2016). Las emulsiones dobles también pueden usarse en el desarrollo de productos bajos en calorías y reducidos en grasas (Lobato-Calleros et al., 2006), reduciendo el contenido de aceite de las emulsiones alimentarias convencionales de aceite en agua (O/W) o agua en aceite (W/O) reemplazando con una emulsión equivalente  $W_1/O/W_2$  u  $O_1/W/O_2$  de similar contenido de grasa percibido, mientras se mantiene la textura y por lo tanto la misma sensación en la boca que los productos convencionales (Hernández-Rodríguez et al., 2017; Mehrnia et al., 2017). La mayoría de las investigaciones recientes se han centrado en el diseño, la formación, la estructura y las propiedades de las emulsiones dobles en un intento de comprender el papel de las variables que influyen en su estabilidad durante la fabricación, almacenamiento y uso (Jiménez-Colmenero, 2013). Este no es un problema simple en el caso de las emulsiones dobles dirigidas al consumo humano directo, ya que existe una opción limitada de emulsionantes que pueden emplearse en su formulación debido a la legislación y las demandas del consumidor (Schmidt et al., 2015; Esfanjani et al., 2015). El principal problema en cuanto a la estabilidad de las emulsiones dobles, es la presencia de dos interfases termodinámicamente inestables. Tradicionalmente se usan dos diferentes

---

emulsionantes de bajo peso molecular para su estabilización: uno con un bajo equilibrio hidrofílico-lipofílico (HLB) para la interfase  $W_1/O$  y un segundo con un alto HLB para la interfase  $O/W_2$  (Schmidts et al., 2009). El progreso en el desarrollo de emulsiones dobles estables para uso alimentario depende del reemplazo de emulsionantes de moléculas pequeñas y agentes estabilizadores poliméricos sintéticos por ingredientes de grado alimenticio, como proteínas de alimentos y polisacáridos, que pueden conferir el complemento requerido (Dickinson, 2011). El efecto de los biopolímeros naturales, sus conjugados y complejos sobre la estabilidad de las gotas externas de las emulsiones  $W_1/O/W_2$  se ha estudiado en los últimos años (Pimentel-González et al., 2009; Li et al., 2017), y se ha encontrado en general que los conjugados proteína-polisacárido muestran propiedades emulsionantes superiores a los biopolímeros individuales (Jiménez-Alvarado et al., 2009; Hernández-Marín et al., 2013; Mohammadi et al., 2016; Esfanjani et al., 2017). La coacervación es un término utilizado para describir una separación de fases líquido/líquido que permite la formación de una fase precipitada rica en biopolímero, llamada coacervado, y una fase soluble que es pobre en biopolímeros (Weinbreck et al., 2004). La coacervación sigue dos eventos de formación de estructura inducidos por pH asociados con la formación de complejos solubles e insolubles durante la acidificación. A medida que la proteína toma una carga positiva neta por debajo de su punto isoeléctrico, se produce una atracción inicial con el polisacárido que lleva una carga neta negativa, lo que lleva a un ligero cambio en la turbidez y la formación de complejos solubles (CS). A medida que la solución se acidifica, los complejos crecen continuamente en tamaño y número hasta alcanzar un segundo pH crítico, hasta la formación de complejos insolubles (CI) (Aryee y Nickerson, 2012). La formación del complejo y la estabilidad se determinarán por la densidad de carga de los



biopolímeros, su peso molecular, naturaleza química, concentración de biopolímero, relación de biopolímero, pH, temperatura, entre otros (Ghasemi et al., 2017). Además, la hidrofobicidad de los complejos proteína-polisacárido se puede modular mediante tratamiento térmico, ya que las interacciones hidrofóbicas se vuelven más fuertes con el aumento de la temperatura (Mohammad y Kavehpour, 2015). Prácticamente no hay informes que se refieran al uso de biopolímeros naturales para estabilizar las gotas externas de las emulsiones  $O_1/W/O_2$ , probablemente porque los biopolímeros naturales de calidad alimentaria son solubles en agua. En los últimos años, se ha prestado atención al uso de partículas sólidas para estabilizar emulsiones. Estas emulsiones se denominan emulsiones Pickering y muestran una estabilidad mucho mayor que las emulsiones "clásicas" estabilizadas por tensoactivos debido a que las partículas sólidas se unen fuertemente a la interfase agua-aceite y crean una barrera rígida contra la coalescencia (Ridel et al., 2016).

Tavernier et al. (2016) han proporcionado una revisión detallada sobre las partículas de grado alimenticio que se han utilizado para estabilizar emulsiones Pickering O/W. Estos incluyen: cristales de grasa (citrato de estearato de glicerilo), polisacáridos (almidón de maíz, celulosa, metil celulosa, quitina y quitosano), proteínas ( $\beta$ -lactoglobulina, lactoferrina, albúmina de suero bovino, gelatina, aislado de proteína de soya, proteína de chícharo y zeína), y otros (flavonoide (tilirosida) y goma shellac-xantana). Mientras que sólo se ha empleado monooleato de glicerol y cera para la estabilización de emulsiones W/O. Sólo hay unos pocos estudios sobre las emulsiones dobles de Pickering. Xiao et al. (2017) estabilizaron las gotas externas de la emulsión  $W_1/O/W_2$  con nanopartículas de kafirina de calidad

---

alimentaria, mientras que Tyowua et al. (2017) estabilizaron una emulsión O<sub>1</sub>/W/O<sub>2</sub> únicamente con partículas de sílice con diferente contenido de silanol en la superficie.

## 2. Antecedentes

### 2.1. Emulsiones

#### 2.1.1. Conceptos y tipos

Una emulsión es un sistema heterogéneo, el cual consiste de al menos un líquido inmisible disperso en otro en forma de gotas (Abismaïl et al., 1999). Generalmente, los diámetros de las gotas se encuentran entre 0.1 y 100  $\mu\text{m}$  (McClements, 2005). Las emulsiones se clasifican de acuerdo con la organización relativa de la fase acuosa y de aceite. Un sistema que consiste de gotas de aceite dispersas en una fase acuosa es llamado como emulsión aceite-en-agua o O/W, mientras que un sistema que consiste de gotas de agua dispersas en una fase de aceite es llamado emulsión agua-en-aceite o W/O.

La sustancia dentro de las gotas de la emulsión es usualmente referida como dispersante, fase interna o fase discontinua, mientras que el material que compone el líquido circundante se refiere como a la fase continua o externa. La concentración de gotas es normalmente expresado en términos de fracción del volumen en la fase dispersa,  $\phi$  (McClements, 2005).

Es también posible realizar emulsiones dobles, por ejemplo, agua en aceite en agua ( $W_1/O/W_2$ ) y aceite en agua en aceite ( $O_1/W/O_2$ ). Las emulsiones dobles son sistemas multi-compartimentados en los que coexisten aceite en agua (O/W) y agua en aceite (W/O), donde los glóbulos de la fase dispersa contienen gotas dispersas aún más pequeñas. Las formas más comunes son agua en aceite en agua ( $W_1/O/W_2$ ), pero las emulsiones de aceite en agua en aceite ( $O_1/W/O_2$ ) también se pueden usar en aplicaciones específicas y han sido menos estudiadas (Benichou et al., 2007). Las emulsiones de agua en aceite en agua consisten en

diminutas partículas de agua ( $W_1$ ) dispersas dentro de glóbulos de grasa (O), que a su vez se dispersan en una fase acuosa continua (Figura 2.1), mientras que una emulsión aceite en agua en aceite, está formada de pequeñas gotas de aceite ( $O_1$ ) dispersas dentro de glóbulos de agua (W), que a su vez se encuentran dispersas en una fase oleosa continua ( $O_2$ ) (Jiménez-Colmenero, 2013).

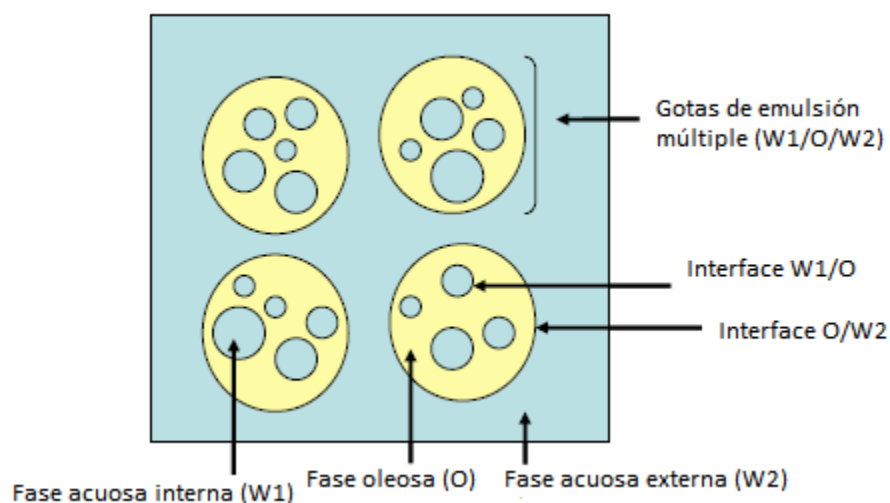


Figura 2.1. Representación esquemática de emulsiones dobles (Jiménez-Colmenero, 2013).

Potencialmente las emulsiones dobles tienen algunas ventajas sobre las emulsiones convencionales O/W, entre ellas está la capacidad de atrapar y proteger varias sustancias y controlar su liberación desde el interior de una fase a otra, tal como sistema de liberación de lípidos bioactivos, encapsulación, protección y liberación de componentes hidrofílicos (Jiménez-Colmenero, 2013). Así mismo ofrecen ventajas para la aplicación en alimentos, ya que se ha encontrado que son una estrategia potencialmente útil para producir alimentos bajos en calorías y grasas, enmascarar sabores, prevenir la oxidación, mejorar las características

sensoriales de los alimentos, controlar la liberación y protección de ingredientes lábiles durante su ingestión y digestión (Benichou et al., 2004; Muschiolik, 2007; Alberini et al., 2017). Por lo tanto las emulsiones dobles ofrecen la oportunidad de incluir compuestos nutricionales y bioactivos, y podrían utilizarse como ingredientes alimentarios, ofreciendo una optimización de los componentes activos de la dieta en los nuevos sistemas alimentarios, como los alimentos funcionales.

### **2.1.2. Proceso de homogenización**

El proceso que consiste en convertir parte del aceite y parte del agua en una emulsión, o el de reducir el tamaño de las gotas en una emulsión existente, es conocido como “homogenización”. Este proceso normalmente se lleva a cabo utilizando dispositivos mecánicos conocidos como homogeneizadores, los cuales someten a los líquidos a tensiones mecánicas intensas lo que resulta en la formación de gotitas (McClements, 2005).

Los procesos físicos que ocurren durante la homogenización se pueden destacar al considerar la formación de una emulsión a partir de aceite y agua pura. Cuando los dos líquidos entran en contacto, tienden a adoptar la configuración que es termodinámicamente más estable y tiene la energía libre más baja, que consiste en una capa de aceite en la parte superior de una capa de agua. Esta disposición se adopta porque se minimiza el área de contacto desfavorable entre los dos líquidos inmiscibles. Para crear una emulsión se necesita energía para interrumpir y mezclar las fases de aceite y agua. La energía generalmente se suministra en forma de agitación mecánica. Las gotas de aceite formadas durante la

aplicación de la agitación mecánica se mueven constantemente y frecuentemente colisionan y se fusionan con las otras vecinas. Si no se suministra más energía mecánica al sistema, las gotas formadas durante el proceso de agitación se moverán en dirección opuesta al campo gravitacional y eventualmente se unirán para formar una capa, es decir se separarán por fases (McClements, 2005).

El tamaño de gotas producidas durante la homogenización, es un equilibrio de dos procesos físicos opuestos: 1) ruptura de las gotas, que implica la ruptura de gotas grandes en más pequeñas y 2) coalescencia de gotas, lo cual ocurre con frecuencia durante la homogenización debido a las intensas fuerzas mecánicas experimentadas por las emulsiones dentro de los homogenizadores, si las gotas de la emulsión no están cubiertas por una membrana interfacial suficientemente fuerte, tendrá las gotas a unirse entre sí durante una colisión. La eficacia del proceso de emulsificación aumenta si: 1) el tamaño de gota inicial puede mantenerse pequeño y 2) las gotas se estabilizan rápidamente contra la coalescencia una vez que se forman (McClements, 2005). Dentro de los principales dispositivos de homogenización que se utilizan para la producción de emulsiones se muestran en el cuadro 2.1.

Cuadro 2.1. Diferentes tipos de homogeneizadores usados para elaborar emulsiones (McClements, 2009).

<b>Tipo de homogeneizador</b>	<b>Rendimiento</b>	<b>Densidad de energía</b>	<b>Tamaño mínimo de gota</b>	<b>Viscosidad de muestra</b>
Mezclador de alta velocidad	Lote o continuo	Baja-alta	$\approx 2 \mu\text{m}$	Baja a media
Molino coloidal	Continuo	Baja-alta	$\approx 1 \mu\text{m}$	Media a alta
Homogenizador a alta presión	Continuo	Medio-alta	$\approx 0.1 \mu\text{m}$	Baja a media
Microfluidizador	Continuo	Medio-alta	$< 0.1 \mu\text{m}$	Baja a media
Sonda ultrasónica	Lote o continuo	Medio-alta	$\approx 0.1 \mu\text{m}$	Baja a media
Homogenizador de chorro ultrasónico	Continuo	Medio-alta	$\approx 1 \mu\text{m}$	Baja a media
Procesamiento de membrana	Lote o continuo	Baja-alta	$\approx 0.3 \mu\text{m}$	Baja a media

La homogenización eficiente normalmente requiere la selección del tipo de homogeneizador más apropiado, y las condiciones de operación del homogeneizador (por ejemplo, presión, caudal, temperatura) para la emulsión y aplicación particular que se produce. Además, requiere la selección de un tipo y cantidad de emulsionante apropiado:

deber haber suficiente emulsionante presente para estabilizar las superficies de las gotitas de la emulsión recién formada durante la homogenización, el emulsionante debe adsorberse rápidamente en la interfase aceite-agua y poder formar un recubrimiento que proteja las gotas contra la agregación (McClements, 2009).

### **2.1.3. Mecanismos generales de inestabilidad de las emulsiones**

El término estabilidad de la emulsión se usa ampliamente para describir la capacidad de una emulsión para resistir los cambios en sus propiedades con el tiempo. Las propiedades de una emulsión pueden evolucionar con el tiempo debido a una variedad de procesos físicos, químicos o bioquímicos (McClements, 2005). En la figura 2.2 se muestran esquemáticamente algunos de los mecanismos físicos más importantes responsables de la inestabilidad de las emulsiones.

– *Separación gravitacional*; ésta es una de las formas más comunes de inestabilidad en emulsiones y puede dar como resultado el cremado o sedimentación, dependiendo de las densidades relativas de la fase dispersa y la continua (McClements, 2005). El cremado describe el movimiento ascendente de las gotas debido a que tiene una baja densidad en comparación con el fluido que las circunda, la sedimentación describe el movimiento descendente de las gotas debido a que tienen una alta densidad en comparación con el líquido que las rodea (McClements, 1999).

– *Agregación de gotas*: las gotas en una emulsión están en movimiento continuo (movimiento Browniano) debido a los efectos de la energía térmica, la gravedad o las fuerzas



mecánicas aplicadas, a medida que se mueven, chocan con frecuencia con sus gotas vecinas. Después de una colisión, las gotas de emulsión pueden separarse o permanecer agregadas, dependiendo de la magnitud relativa de las interacciones atractivas y repulsivas entre ellas. Los dos tipos principales de agregación en emulsiones son *floculación* y *coalescencia* (McClements, 2005). La floculación ocurre cuando dos o más gotas están unidas formando un agregado en el cual las gotas retienen su integridad individual. La coalescencia es el mecanismo principal por el cual una emulsión alcanza su estado termodinámicamente más estable, porque el área de contacto entre las fases de aceite y agua disminuye a lo largo del proceso, considerando que la coalescencia es el proceso donde dos o más gotas se unen para formar una gota grande. La coalescencia también causa que las gotas de la emulsión crezcan o sedimenten más rápidamente debido al aumento del tamaño de la gota (McClements, 2005).

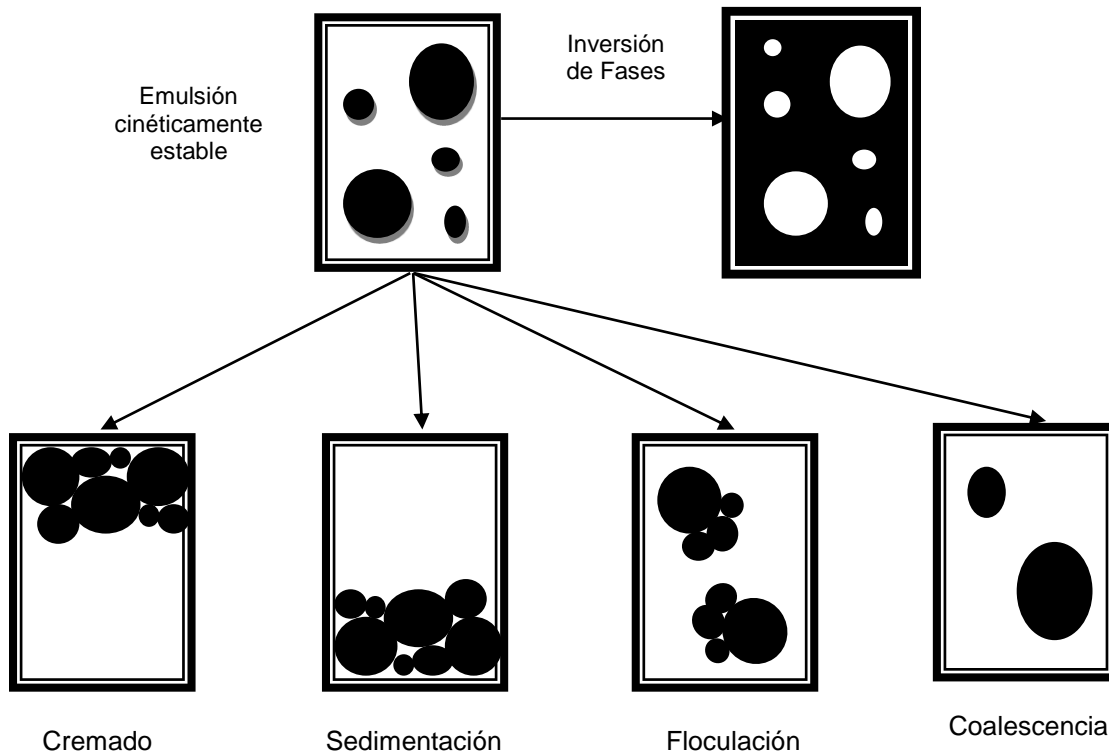


Figura 2.2. Mecanismos de inestabilidad de emulsiones (McClements, 1999).

- *Maduración de Ostwald*: en una emulsión es un proceso de crecimiento gradual de las gotas más grandes a expensas de las más pequeñas debido al transporte masivo de la fase dispersa soluble (aceite) a través de la fase continua (agua) (Dickinson, 2009; Taylor, 1995; Kabalnov y Shchukin, 1992).
- *Inversión de fase*: es el proceso mediante el cual un sistema cambia de una emulsión de aceite en agua a una emulsión agua en aceite, o viceversa (McClements, 2005).

#### **2.1.4. Inestabilidad de emulsiones dobles**

La inestabilidad de un sistema de emulsiones dobles puede seguir una gran variedad de vías de destrucción dependiendo de su composición y microestructura. Los principales mecanismos de inestabilidad se muestran en la figura 2.3. El mecanismo A involucra la coalescencia de las gotas exteriores, este es semejante a la coalescencia de las gotas de una emulsión primaria. El mecanismo B es la coalescencia de las gotas interiores, no debe existir ningún cambio en la interfase de las gotas exteriores. El mecanismo C es la coalescencia de las gotas interiores con la interfase de las gotas exteriores, permitiendo la transferencia de algún material de la fase dispersa interna a la fase continua externa. El mecanismo D es la contracción o hinchamiento de las gotas interiores, derivados del cambio difusivo de material entre la fase interna y la fase externa como resultado de transporte de masa hacia la película líquida que interviene (Dickinson, 2010).

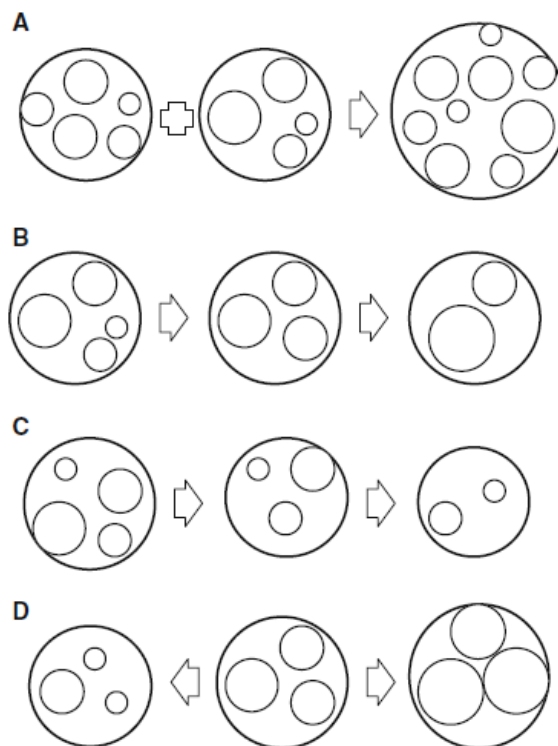


Figura 2.3. Representación esquemática de los principales mecanismos de rompimiento de una emulsión doble: (A) coalescencia de las gotas externas, (B) coalescencia de las gotas internas, (C) coalescencia de las gotas internas/externas y (D) contracción o hinchamiento de las gotas internas.

## 2.2. Estabilizantes y emulsificantes

Hoy en día muchos emulsionantes están disponibles para la estabilización de emulsiones. Algunos de estos son naturales, sin embargo los emulsionantes sintéticos han tenido un amplio uso comercial en la segunda mitad del siglo XX. Su desarrollo fue impulsado por la industria de alimentos procesados, que necesitaban productos estables para su distribución en el mercado.

Las emulsiones son dispersiones de gotas termodinámicamente inestables (Pawar, 2011), estos sistemas tienden irremediablemente hacia la separación macroscópica de fases que corresponden a su estado de menor energía (Destribast et al., 2014). Por lo tanto, se requiere que los emulsionantes proporcionen estabilidad cinética recubriendo las gotitas y generando interacciones repulsivas (estéricas o electrostáticas) que inhiban la agregación de las gotas (Bai et al., 2016). Además, reducen la tensión interfacial, evitando así la ruptura de las gotas (Kralova y Sjöblom, 2009). Numerosos emulsionantes de calidad alimentaria están legalmente aprobados para su utilización comercial en la industria alimentaria (Kralova, 2009), dentro de estos tenemos agentes de bajo peso molecular con actividad superficial (tensoactivos) o macromoléculas (tales como proteínas o polímeros) (Destribas et al., 2014).

### **2.2.1. Agentes Tensoactivos**

Un tensoactivo es una sustancia que tiene la propiedad de adsorberse sobre la interfase y de alterar significativamente la energía libre interfacial de estas interfases. Se debe tener en cuenta que el término interfase se utiliza para describir las interfases fluido/fluido o fluido/gas. Cuando uno de los fluidos es gas (más comúnmente aire) el término superficie tiende a usarse en lugar de interfase. Los agentes con actividad superficial tienen una estructura molecular característica conocida como estructura anfipática. Esta consiste de un grupo que tiene poca o ninguna atracción para el solvente, llamado liófilo y un grupo que tiene una gran atracción por el solvente, llamado liofílico. En medios acuosos, los términos los grupos hidrofóbico o hidrofílico se usan como grupos liófilos o liofílicos,

respectivamente. La estructura del tensoactivo se llama anfifílico. Los restos hidrofílicos e hidrófobos del agente tensoactivo se denominan normalmente cabeza y cola.

La naturaleza de los grupos de la cabeza y la cola del tensoactivo puede ser muy diferente, lo que ofrece numerosas variaciones de la estructura del compuesto (Eastoe, 2005). El grupo hidrofílico puede estar cargado o ser neutro, de tamaño pequeño y compacto: el grupo hidrofóbico es generalmente una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada simple o doble, y también puede contener grupos aromáticos. La solubilidad del tensoactivo en medios acuosos se determina por la afinidad de la parte hidrófila (cabeza) con el medio. La clasificación de los tensoactivos se basa en el tipo del grupo hidrofílico de la siguiente manera: aniónicos, el resto de la cabeza tiene una carga negativa (ácidos grasos); no iónico: el resto de la cabeza no tiene carga aparente (monoacilgliceroles, esteres de sacarosa de ácidos grasos); y zwitteriónico: el resto de la cabeza tiene cargas positivas y negativas (lecitina).

Un tensoactivo disuelto en un líquido puede adsorberse en la interfase o autoensamblarse para la formación de micelas (Figura 2.3), siendo ambos fenómenos causados por el efecto hidrofóbico. El grupo líofobo del tensoactivo va a ser expulsado del líquido en el que está disuelto.

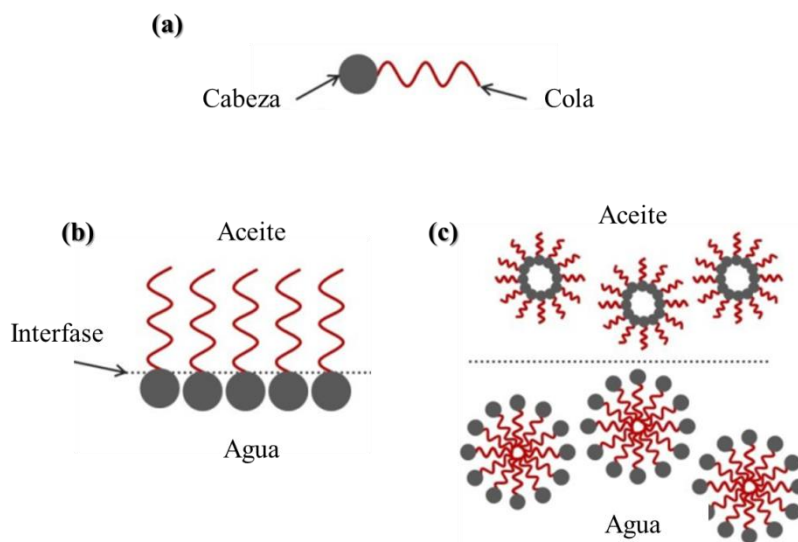


Figura 2.4. Representación esquemática de (a) estructura de un tensoactivo, (b) moléculas de tensoactivo en la interfase, y (c) micelas de tensoactivo esféricas.

En la formación de una emulsión, cuando no se agrega algún tipo de tensoactivo al aceite puro y al sistema de agua, el tipo de emulsión va a depender de la fracción de volumen de cada fase. La fase con la fracción de volumen menor será la fase dispersa. En presencia de algún tensoactivo, el tipo de emulsión se debe sólo a las propiedades de éste.

Una de las primeras reglas empíricas desarrolladas para describir el tipo de emulsión que podría ser solubilizada por un tensoactivo fue propuesta por Bancroft, él relacionó la capacidad del tensoactivo para estabilizar emulsiones W/O u O/W con la solubilidad en aceite o agua. Esto se conoce como regla de Bancroft: el tensoactivo soluble en aceite tiende a estabilizar la emulsión W/O, mientras que el tensoactivo soluble en agua tiende a estabilizar la emulsión O/W (Bancroft, 1913). La elección teórica del tensoactivo es complicada ya que las fases de aceite y agua son de composición variable. Existen algunos métodos para la selección de los tensoactivos y uno de los métodos semiempíricos ampliamente utilizado para clasificar a los tensoactivos es el método del balance hidrofílico-lipofílico (HLB). El HLB se

describe mediante un número que proporciona la afinidad relativa de una molécula de tensoactivo por las fases oleosa y acuosa. A cada tensoactivo se le asigna un número HLB según su estructura química. Una molécula con un alto valor de HLB tiene una alta proporción de grupos hidrofílicos a grupos lipofílicos y viceversa. Los números de HLB de muchos tensoactivos se han tabulado en la literatura (Abismaïl et al., 1999). El número HLB de un tensoactivo proporciona una indicación útil de su solubilidad en la fase de aceite y/o agua y puede usarse para predecir el tipo de emulsión que se formará. Un tensoactivo con bajo valor de HLB (3 a 6) es predominantemente hidrófobo, se disuelve preferentemente en aceite y estabiliza emulsiones de agua en aceite. Un tensoactivo con un alto valor de HLB (8 a 18) es predominantemente hidrofílico, se disuelve preferentemente en agua, estabiliza emulsiones de aceite en agua. Un tensoactivo con un valor de HLB intermedio (6 a 8) no tiene una preferencia particular por el aceite o por el agua. Las moléculas con valor de HLB por debajo de 3 y por encima de 18 no son particularmente activas en superficie y tienden a acumularse preferentemente en aceite o agua, en lugar de una interfase aceite-agua (McClements, 1999).

### **2.2.2. Biopolímeros**

Proteínas y polisacáridos son dos de los biopolímeros más importantes utilizados como ingredientes en las emulsiones alimentarias. Los biopolímeros proveen una importante fuente de energía y nutrientes esenciales en la dieta humana. Además, tienen la habilidad de modificar la apariencia, textura, estabilidad y el sabor de las emulsiones alimentarias debido a sus características funcionales únicas (capacidad de estabilizar emulsiones y espumas,

formar geles y mejorar en gran medida la viscosidad de las soluciones). Existe una amplia variedad de diferentes tipos de biopolímeros, cada uno con sus propios atributos únicos funcionales (Yan y Zhang, 2014). La actividad interfacial de muchos biopolímeros se debe al hecho de que tienen regiones hidrofílicas y lipofílicas distribuidas a lo largo de su columna vertebral. La principal fuerza motriz para la adsorción de estos biopolímeros anfifílicos a las interfases aceite-agua es, por lo tanto, el efecto hidrofóbico. Cuando el biopolímero se dispersa en una fase acuosa, algunos de los grupos no polares están en contacto con el agua, que es termodinámicamente desfavorable debido a las interacciones hidrofóbicas. Cuando un biopolímero se adsorbe a una interfase puede adoptar una conformación donde los grupos no polares se ubican en la fase oleosa (lejos del agua) y los grupos hidrofílicos se ubican en la fase acuosa (en contacto con el agua). La adsorción también reduce el área de contacto entre las moléculas de aceite y agua en la interfase aceite-agua lo que reduce la tensión interfacial. La conformación de un biopolímero en una interfase, y las propiedades fisicoquímicas y estructurales de la capa interfacial formada, dependen de su estructura e interacciones moleculares. Los biopolímeros flexibles de espiral aleatoria adoptan una disposición donde los segmentos predominantemente no polares sobresalen en la fase oleosa, los segmentos predominantemente polares sobresalen en la fase acuosa y las regiones neutras se encuentran planas contra la interfase (Figura 2.5) (McClements, 2009).



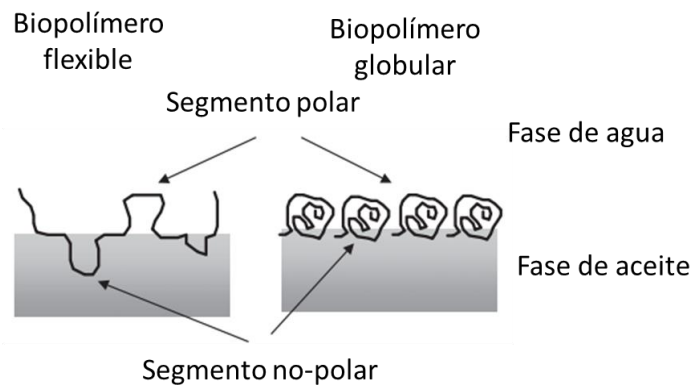


Figura 2.5. Representación esquemática de conformaciones de moléculas adsorbidas de biopolímero globular y flexible en una interfase aceite-agua. Los segmentos no polares tienden a sobresalir en la fase de aceite, mientras que los segmentos polares sobresalen en la fase de agua.

#### – Proteínas

Las proteínas son polímeros biológicos compuestos de aminoácidos con una gran variedad de estructuras, como son fibrosas y globulares, dependiendo de su secuencia de aminoácidos, de las condiciones ambientales prevalecientes, exposición a diferentes temperaturas, presiones, solventes, valores de pH y composición iónica. Las proteínas son ampliamente utilizadas como estabilizantes de emulsiones en la industria alimentaria. De forma similar a los tensoactivos convencionales, las proteínas facilitan la rotura de las gotas de aceite durante la emulsificación (disminuyendo la tensión interfacial de aceite-agua) y estabilizan las gotas contra la coalescencia durante la emulsificación, así como durante el posterior almacenamiento de las emulsiones formadas (Tcholakova et al., 2006). Las proteínas al ser moléculas anfifílicas, van a migrar espontáneamente a la interfase aire-agua

o aceite-agua. A diferencia de los agentes tensoactivos de bajo peso molecular, las proteínas forman una película muy viscoelástica en la interfase; esta película resiste los choques mecánicos durante el almacenamiento y la manipulación. Las proteínas con una actividad de superficie apropiada poseen tres atributos: (a) transporte y unión de las moléculas en la interfase, (b) reordenamiento estructural de las moléculas adsorbidas con posible despliegue parcial y formación de enlaces intermoleculares y (c) capacidad, una vez situadas y orientadas en la interfase, de interactuar con las moléculas vecinas y formar una película viscoelástica fuerte, que soporte los movimientos mecánicos y térmicos (Tcholakova et al., 2006). La rapidez con que puede adsorberse una proteína en la interfase va a depender del esquema de distribución de zonas hidrófilas e hidrófobas en su superficie. Si la superficie de la proteína es extremadamente hidrófila y no contiene zonas apreciables hidrófobas, probablemente no se adsorberá, porque su energía libre será inferior en la fase acuosa que en la interfase o en la fase polar. A medida que aumenta el número de zonas hidrofóbicas en la superficie, va siendo más probable su adsorción espontánea en la interfase. Las características moleculares de la superficie de las proteínas influyen enormemente en su capacidad de adsorberse espontáneamente en la interfase y en su eficacia como estabilizante.

Las proteínas se adsorben en la interfase de diferente modo a como lo hacen las sustancias tensoactivas de bajo peso molecular. En las proteínas la adsorción y orientación están limitadas por el esquema de distribución de grupos hidrófobos e hidrofílicos en la superficie y por la rigidez estructural de la molécula. Como las moléculas proteicas son voluminosas y están plegadas, una parte considerable de la molécula permanece, después de su adsorción, en la fase dispersante y sólo una pequeña porción de la misma se encuentra anclada en la

superficie. La tenacidad con que la molécula proteica permanece en la interfase depende del número de segmentos peptídicos que se han fijado en ella y de la energía de la interacción entre estos segmentos y la interfase. En la interfase, las cadenas polipeptídicas asumen una o más de las tres configuraciones siguientes: trenes, son segmentos de la proteína que contactan directamente con la interfase; bucles, son segmentos del polipéptido suspendidos en la fase acuosa; y colas, son segmentos N- y C- terminales de la proteína que generalmente se sitúan en la fase acuosa (Figura 2.6). La distribución relativa de estas tres configuraciones depende de las características conformacionales de la proteína. Cuanto mayor sea la proporción de segmentos polipeptídicos en la configuración “en tren” más fuerte será la unión y menor la tensión interfacial.

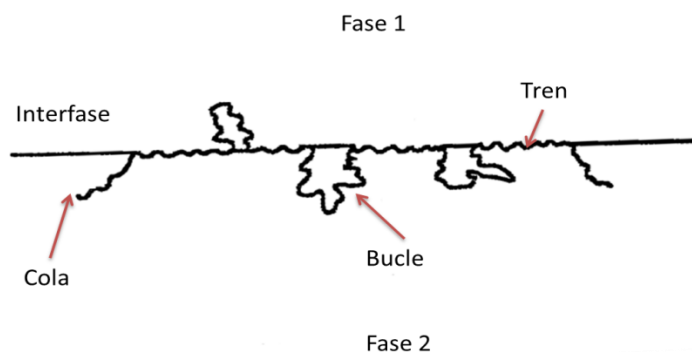


Figura 2.6. Diversas configuraciones de un polipéptido flexible al colocarse en la interfase.

Las proteínas del suero de leche son ampliamente usadas en formulación de alimentos debido a sus excelentes propiedades funcionales y nutricionales. Una de las más importantes propiedades de las proteínas del suero de leche es la estabilización de emulsiones por difusión

en la interfase O/W, reduciendo la tensión superficial. Las proteínas del lactosuero incluyen al conjunto de sustancias nitrogenadas que no floculan cuando el pH de la leche se lleva a 4.6, por lo mismo, también se les llaman proteínas solubles.

La fracción de proteína de suero de leche bovina contiene cuatro proteínas principales  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg),  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -La), albúmina de suero sanguíneo (BSA) e inmunoglobulinas (Ig). Las proteínas del lactosuero pueden ser de síntesis mamaria, como la  $\alpha$ -lactoalbúmina y la  $\beta$ -lactoglobulina, que representan conjuntamente el 70% de las proteínas del lactosuero y el 20% del total de las proteínas en la leche de vaca (Amiot, 1991), y la lactoferrina, o bien de transferencia sanguínea, como la albúmina y las inmunoglobulinas. Todas las proteínas del suero contienen enlaces disulfuro para estabilizar su estructura. La proteína mayoritaria en el suero con el 50 % es la  $\beta$ -lactoglobulina. La molécula de está formada de  $\alpha$ -hélice, lamina- $\beta$  y espirales al azar presentes en concentraciones de hasta 10-15, 43 y 47% respectivamente (Jovanović et al., 2005). La  $\beta$  – Lg el primer agente gelificante que domina el comportamiento térmico del sistema total de las proteínas del suero de leche. La  $\beta$ -Lg tiene dos enlaces disulfuro y un grupo sulfhídrido (Cys 121), el cual se encuentra cubierto con la estructura de la proteína, pero se expone y se activa después de la desnaturalización de la proteína por varios agentes (incluido el calor). La agregación de la proteína puede ocurrir dependiendo principalmente de la concentración de proteína y del pH. A pH neutro el grupo sulfhídrido forma enlaces disulfuro, a pH ácidos la participación de los grupos sulfhidrido en la formación de agregados es mínima y grandes agregados son formados principalmente por agregados físicos. Si la  $\beta$ -lactoglobulina es calentada arriba de los 60 °C su estructura secundaria es parcialmente modificada. La

segunda proteína más abundante del lactosuero es la  $\alpha$ -lactoalbúmina, en su estructura contiene cuatro enlaces disulfuro. Ha sido reportado que puede tener propiedades emulsificantes, estabilizantes y puede participar junto con la  $\beta$ -lactoglobulina en la formación de puentes disulfuro y formar una película en la interfase (Bouaouina et al., 2006). La molécula nativa de la  $\alpha$ -La consta de dos dominios, un dominio  $\alpha$ -helicoidal grande y un dominio lamina- $\beta$  pequeño, que están conectados por un bucle de unión de calcio. Debido a sus propiedades hidrófilas,  $\alpha$ -La no precipita de la leche al punto isoeléctrico (Jovanović et al., 2005).

– *Polisacáridos*

Los polisacáridos son clasificados como homopolisacáridos, el cual consiste en un sólo tipo de monosacáridos, o hetero-polisacáridos, el cual contiene diferentes monosacáridos, dependiendo de su secuencia de monómeros, las condiciones ambientales imperantes y su historia. Los polisacáridos difieren uno de otro químicamente en términos del tipo, número, secuencia y enlaces de la unidad de repetición dentro de la cadena de polímero. Estas diferencias químicas permiten diferencias en sus propiedades moleculares, como es peso molecular, grado de ramificación, estructura, flexibilidad y carga eléctrica. Sucesivamente, estas diferencias moleculares permiten diferencias en las propiedades funcionales, como es solubilidad, espesante, gelación, capacidad de ligar agua, actividad superficial, emulsificación y digestibilidad. Como las proteínas, cuando se selecciona el polisacárido para formar un coacervado, sus propiedades fisicoquímicas deben ser consideradas, especialmente sus características eléctricas (potencial  $\zeta$  vs pH). La carga eléctrica en los polisacáridos depende de la naturaleza de los grupos iónicos a lo largo de la cadena, también

como son las condiciones de la solución. Algunos polisacáridos son aniónicos como es la goma arábiga, estos polisacáridos aniónicos tienden a ser neutrales a valores de pH suficientemente más bajos que su valor de pKa, pero negativos arriba de éste. Los grupos comúnmente cargados en los polisacáridos es el grupo carboxilo (Yan y Zhang, 2014).

La goma arábiga (GA), es uno de los polisacáridos anfifílicos más comúnmente utilizados en la industria alimentaria (Bai et al., 2016). Es un heteropolisacárido que contiene alrededor del 2% de proteína, y consiste químicamente de una columna vertebral de  $\beta$ -1,3 D galactopiranososa con ramificaciones de unidades de  $\alpha$ -L-rhamnopiranosil, b-D-glucoronopiranosil y 4-O-metil-b-D-glucoronopiranosil. Alrededor del 20% de las unidades de azúcar contienen un grupo carboxilo. Es un poli electrolito débil que lleva una carga neta negativa por encima de pH 2.2 debido a sus grupos carboxilo (Yan y Zhang, 2014). El análisis de composición de la goma arábiga revela la presencia de una cadena principal de galactanos con ramificaciones de cadenas de galactosa y arabinosa. El resto de carbohidratos se compone de D-galactosa (40 % de residuos), L-arabinosa (24 %), L-ramnosa (13%), y dos ácidos urónicos, responsables del carácter poli aniónico de la goma, D-ácido glucurónico (21 %) y 4-O-metil-D-ácido glucurónico (2 %). La GA es cargada negativamente arriba de un pH 2.2, debido a que bajo este pH ( $< 2.2$ ) la disociación de los grupos carboxilos es suprimida (Weinbreck et al., 2004<sup>a</sup>). La goma arábiga no es muy sensible a la agregación a valores de pH intermedios, alta fuerza iónica y temperaturas elevadas debido a la formación de gruesas capas estabilizadoras estéricas alrededor de las gotas de aceite (Ozturk et al., 2016). Sin

embargo, un problema importante es que es difícil usar bajos niveles de polisacáridos para producir emulsiones con tamaños pequeños de gota (Charoen et al., 2011).

### 2.3. Emulsiones Pickering

La mayoría de las emulsiones son estabilizadas con agentes de grado alimentario y sustancias biocompatibles. Hasta los últimos años se han basado principalmente en proteínas y biopolímeros, aunque estas moléculas grandes pueden proporcionar barreras considerables contra la desestabilización, se ha demostrado que las partículas estabilizan las emulsiones de manera más eficiente que los tensoactivos, o por biopolímeros (Lam et al., 2014). En la figura 2.7 puede apreciarse dos emulsiones, donde se puede observar las partículas sólidas adsorbidas en la interfase aceite-agua estabilizando las gotas en lugar de moléculas de tensoactivos.

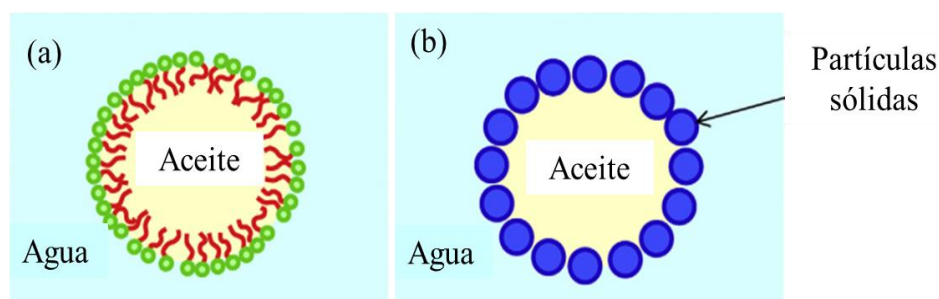


Figura 2.7. Representación de una emulsión clásica a base de tensoactivo (a) y de una emulsión Pickering (b). Las partículas sólidas adsorbidas en la interfase aceite-agua estabilizan las gotas en lugar de las moléculas de tensoactivo.

El hecho de que las emulsiones se pueden estabilizar por partículas sólidas fue investigado hace más de un siglo. Ramsden mencionó por primera vez que la materia sólida tenía el poder de formar emulsiones resistentes. Sin embargo, el descubrimiento de este tipo de emulsiones es atribuido a Pickering (de ahí el término emulsiones Pickering) (Pawar, 2011; Destribats et al., 2014). Una de las ventajas que ofrece la estabilización por partículas sólidas es la elevada resistencia a la coalescencia y por lo tanto el carácter “libre de tensoactivos” las hace atractivas para varios campos de aplicaciones, en particular en aplicaciones en alimentos (Chevalier et al., 2013). La formación de emulsiones Pickering van a estar influidas principalmente por las propiedades de las partículas y las fases de la emulsión que van a controlar la disposición de las partículas en la interfase. Dependiendo de la hidrofobicidad de su superficie, las partículas pueden estabilizar emulsiones aceite en agua, agua en aceite y dobles (Yusoff et al., 2011).

Las emulsiones Pickering han generado mucho interés en los últimos años por razones tales como la eliminación de tensoactivos artificiales del proceso de emulsiones, la capacidad de estabilizar las interfases con éxito contra la maduración de Ostwald y la coalescencia (Gould et al., 2013). Se han realizado varios estudios en la estabilidad de emulsiones por medio de partículas sólidas, pero el interés en este tipo de emulsiones es debido a la estabilidad que confieren a las emulsiones sobre los tensoactivos comúnmente utilizados. El tamaño de las partículas se correlaciona con el tamaño de las gotas de la emulsión formadas, gotas de hasta milímetros de tamaño se pueden hacer estables a la coalescencia a través de partículas adsorbidas, algo que no es posible con los tensoactivos (Yusoff et al., 2011). Consecuentemente, algunos investigadores describen los mecanismos de estabilización de las emulsiones Pickering y comparan la estabilidad de partículas con la estabilidad de



tensoactivos. La habilidad de diferentes tipos de partículas para estabilizar emulsiones ha sido investigada, como son partículas de sílica, arcilla, carbonato de calcio, poliestireno, entre otros (Gonzenbach et al., 2006). Tales emulsiones exentas de agentes tensoactivos representan una nueva alternativa a las convencionales y también pueden tener ventajas.

### **2.3.1. Ángulo de contacto**

Es evidente, simplemente observando la naturaleza, que los líquidos no mojan de igual manera a un determinado sólido y que no todos los sólidos se mojan de la misma forma por un líquido. Los líquidos sobre una superficie horizontal se comportan de forma diferente según la naturaleza tanto de la superficie sólida como del líquido. En realidad, esto depende de los tres constituyentes, según sea el gas o el fluido que rodea la gota. Son posibles dos situaciones diferentes: si el líquido forma una gota se dice que el mojado es parcial, si el líquido forma una película delgada mojando la superficie sólida se trata de un mojado total. (Lee, Chan y Moharz, 2011). En el caso del mojado parcial, el líquido no moja la superficie y superficies con este carácter se conocen como hidrófobas, en el caso de que el líquido sea agua. Cuando es un mojado total, el líquido moja bien la superficie y se le conoce como hidrofílico en el caso del agua (Chevalier et al., 2013). Trasladando esta analogía a la utilización de partículas sólidas, una partícula muy hidrófila estaría totalmente mojada por el agua, de modo que estas no se adsorberían debido a que permanecerían dispersas en la fase acuosa de la emulsión. En igualdad de condiciones, las partículas demasiado hidrófobas serán totalmente mojadas por el aceite (Chevalier et al., 2013).

La magnitud física relacionada con la mojabilidad es el ángulo de contacto ( $\theta$ ). Se define como el ángulo que forma la tangente a la interfase líquido-gas con la superficie del sólido en el punto de contacto de las tres fases hacia el lado de la fase líquida (Figura 2.8). De forma general, se define al ángulo de contacto como el ángulo que forma la superficie de un líquido al entrar en contacto con una superficie sólida. El valor del ángulo de contacto depende principalmente de la relación existente entre las fuerzas adhesivas del líquido y del sólido, y las fuerzas cohesivas del propio líquido (Pawar, 2011).

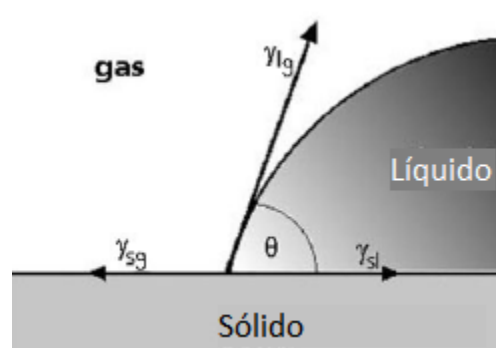


Figura 2.8. Ángulo de contacto y tensiones interfaciales.

El comportamiento de la mojabilidad de las partículas en la interfase se describe por los ángulos de contacto, que están relacionados con la tensión superficial de cada una de las tres interfases por la ecuación de Young y se expresa como (Rousseau et al., 2000):

$$\cos \theta_r = \frac{\gamma_{SG} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LG}}$$

Donde  $\gamma_{SG}$ ,  $\gamma_{SL}$  y  $\gamma_{LG}$  son la tensión interfacial sólido-gas, sólido-líquida, y líquido-gas respectivamente y  $\theta_r$  es el ángulo de Young. La ecuación de Young es invariante en presencia de la gravedad. El ángulo de contacto sólo depende de las propiedades físico-químicas de las

---

tres fases, mientras que la gravedad, sólo afecta a la formación de la interfase líquido-gas relativamente lejos de la línea de contacto (Chevalier et al., 2013).

Para las moléculas de tensoactivo presentes en las mezclas de agua y aceite, el sistema hidrofílico-lipofílico (HLB) es un parámetro importante para determinar si el tensoactivo agregado reside en agua, aceite o en una tercera fase (Aveyard et al., 2003). Para la adsorción en una interfase, se requiere que las partículas sean parcialmente mojadas por ambas fases, las partículas que sólo son mojadas por una fase no pueden actuar como emulsificantes ya que las partículas permanecerían en el líquido de manera dispersas. Por lo tanto, las partículas deben ser mojadas en mayor cantidad por una fase, la cual determina el tipo de emulsión que se formará, las partículas que son mojadas por agua podrán estabilizar emulsiones O/W, mientras que las partículas que son mojadas por aceite estabilizarán emulsiones W/O. La adsorción de la partícula sólida en la interfase aceite-agua está dada por los grados de hidrofobicidad. En otras palabras, la habilidad de las partículas a estabilizar una emulsión depende de su mojabilidad de la fase de aceite y agua de la emulsión. La regla de Finkle determina que el tipo de emulsión que se va a formar va a estar determinado principalmente por la mojabilidad de las partículas en ambos líquidos y se caracteriza por el ángulo de contacto (Schmitt et al., 2014). Para un ángulo de contacto medido a través de la fase acuosa de menos de  $90^\circ$ , la partícula es mojada preferentemente por el agua (es decir, es preferentemente de naturaleza hidrófila) y van a estabilizar emulsiones O/W. Para una partícula con un  $\theta > 90^\circ$  es mojada preferentemente por el aceite (hidrófoba) y van a estabilizar emulsiones W/O. Para un ángulo de contacto de  $90^\circ$ , es igualmente mojado por ambas (Figura 2.9). Sin embargo partículas muy hidrofílicas (con un ángulo de contacto muy pequeño) o muy hidrofóbicas (ángulo de contacto muy grande) será más probable que

permanezcan dispersos en la fase de agua o aceite, respectivamente (Averyard et al., 2003; Destribats et al., 2014), estas condiciones extremas de ángulos de contacto (cerca de  $0^\circ$  o  $180^\circ$ ), no darán como resultado emulsiones estables (Hunter et al., 2008).

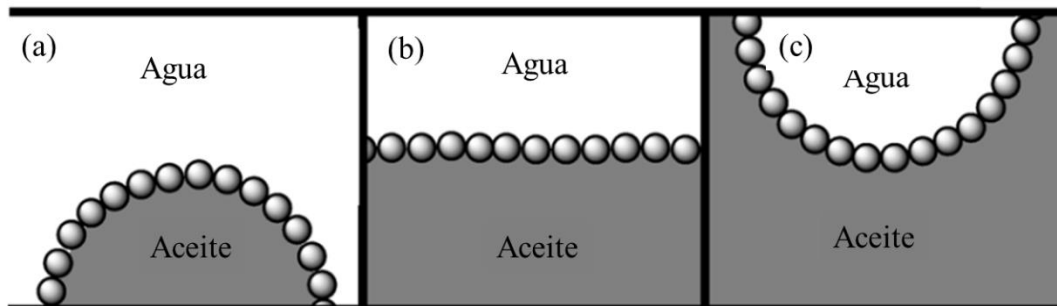


Figura 2.9. Comportamiento de partículas en la interfase aceite-agua. (a) Partícula mojada preferentemente por el agua, es decir, es preferentemente de naturaleza hidrofílica, estabilizan emulsiones O/W; (b) partícula mojada por ambas fases, sin formación preferencial; y (c) partícula mojada preferentemente por el aceite, es decir, hidrofóbica, pueden formar emulsiones W/O (Hunter et al., 2008)

Como los tensoactivos, las partículas sólidas actúan como emulsificantes y estos se adsorben en la interfase, sus efectos sobre la tensión interfacial no quedan bien entendidos. Este hecho ha sido contradictorio ya que algunos autores mencionan que las partículas no modifican la tensión superficial, mientras que otros demostraron que la tensión interfacial se ve afectada por la presencia de partículas. La tensión interfacial depende de la hidrofobicidad de las partículas, la tensión interfacial disminuye a medida que aumenta el ángulo de contacto de  $0$  a  $90^\circ$  o disminuye de  $180$  a  $90^\circ$  (Tzoumaki et al., 2011).

### 2.3.2. Estabilidad de emulsiones Pickering

Se han utilizado varios tipos de partículas en la estabilización de emulsiones O/W y W/O, como son cristales de grasa, almidones, proteínas y algunos otros como son flavonoides (Tavernier et al., 2016). La efectividad de un tipo de partícula específico para estabilizar una emulsión va a depender del medio de la emulsión, la forma y el tamaño de partícula, la mojabilidad y las interacciones entre partículas (Hunter et al., 2008).

El concepto que define la estabilización de Pickering es muy simple: las partículas dispersas se acumulan en la interfase agua-aceite para formar una barrera (estérica) mecánica que protege a las gotas de la emulsión contra la coalescencia (Murray et al., 2011). Existen al menos dos mecanismos mediante los cuales las partículas estabilizan las emulsiones. En el primero, se requiere que las partículas se adsorban en la interfase aceite-agua y permanezcan allí formando una película densa (monocapa o multicapa) alrededor de las gotas dispersas que impiden la coalescencia (Aveyard et al. 2003). Las partículas sólidas se mantienen juntas en la interfase aceite-agua por medio de interacciones atractivas que se requieren para construir una capa rígida de partículas sólidas (Chevalier et al., 2013). Cuando dos gotas recubiertas de partículas se acercan, se observa una especie de disposición de bicapa de partículas (Figura 2.10a). La magnitud de la barrera estérica depende de cuán difícil es eliminar las partículas de la interfase. La barrera estérica es más efectiva cuando la capa de partículas se encuentra predominantemente en el lado externo (convexo) de las gotas dispersas, es decir, cuando las partículas son humectadas preferentemente por la fase continua (Dickinson, 2010). En el segundo, se produce una estabilización adicional cuando las interacciones partícula-partícula son tales que se desarrolla una red tridimensional de

partículas en la fase continua que rodea a las gotas (Aveyard et al. 2003), esto ocurre a altas concentraciones de partículas, suprimiendo la coalescencia debido al impedimento estérico (Gould et al., 2013). En este caso, como se ilustra en la figura 2.10b, la barrera basada en partículas esféricas no es una simple bicapa, más bien consiste en una capa/red de partículas desordenada y rígida, adsorbida en la interfase de agua-aceite, con toda la estructura agregada unida por fuerzas atractivas entre partículas (Dickinson, 2010).

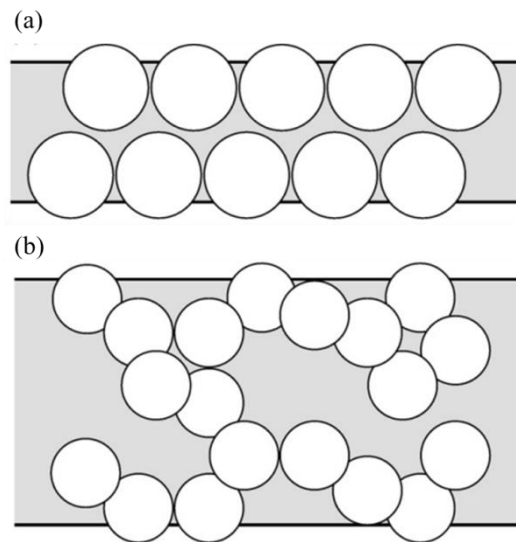


Figura 2.10. Representación esquemática de disposiciones de estabilización alternativas de partículas en una película fina entre gotas de emulsión estrechamente próximas: (a) monocapas de partículas en las dos interfaces aceite-agua; y (b) capa de red de baja densidad de partículas agregadas (Dickinson, 2010)

## 2.4.Coacervados

La estabilidad, las propiedades de textura y mecánicas de las emulsiones, dependen de la forma en que los emulsionantes (emulsificantes de bajo peso molecular) y biopolímeros (proteínas y polisacáridos) se adsorben e interactúan en las interfases. Una de las principales tendencias en la industria alimentaria es la sustitución de emulsionantes de bajo peso molecular y estabilizadores poliméricos sintéticos por macromoléculas naturales que son más biocompatibles. En particular importancia para lograr la funcionalidad requerida se necesitan biopolímeros, como son las proteínas y polisacáridos (Milanovic et al., 2014). Las proteínas son bien conocidas por su actividad superficial y su capacidad para estabilizar sistemas dispersos (Dickinson, 1998; McClements, 2005). Debido a que son polielectrólitos, cuya carga neta depende del pH de la solución, dando opción a ocurrir diferentes tipos de interacciones en sus mezclas o en mezclas con otros biopolímeros (Milanovic et al., 2014). La formación de complejos de proteína y polisacárido se debe principalmente a diversas interacciones no covalentes, como las interacciones electrostáticas, por puente de hidrógeno e interacciones hidrófobas. Las proteínas tienen un potencial  $\zeta$  positivo o negativo basado en el pH del medio (positivo a  $\text{pH} < \text{pI}$  y viceversa). Esta carga eléctrica en la proteína se debe a la presencia de diferentes aminoácidos y su modo de ionización a diferentes pH y por lo tanto es la responsable de la atracción o repulsión electrostática entre las proteínas y polisacáridos. La presencia del grupo carboxilo (-COOH) en los polisacáridos y el grupo amino (-NH<sub>3</sub>) y carboxilo en la proteína son la fuente de los enlaces de hidrógeno entre estos biopolímeros. La formación de estos enlaces va a depender de los parámetros de la solución como el pH, fuerza iónica, temperatura, entre otros (Gosh et al., 2012).

La concentración de biopolímeros y el pH juegan un papel importante en la solubilidad de los agregados de proteína-polisacárido (Gosh et al., 2012). La coacervación sigue dos eventos formadores de estructuras inducidos por el pH asociado con la formación de complejos solubles e insolubles durante la acidificación. Las proteínas adquieren una carga neta positiva por debajo de su pI ( $\text{pH} > \text{pI}$ ; carácter catiónico) y al unirse con el polisacárido aniónico da como resultado la formación de agregados aniónicos de proteína-polisacárido (Gosh et al., 2012). Esta atracción inicial conduce a un ligero cambio en la turbidez y la formación de complejos solubles (que corresponden a un pH ácido, denominado  $\text{pH}_c$ ). A medida que la solución se acidifica aún más, se cree que los complejos crecen continuamente de tamaño y número hasta alcanzar un segundo pH crítico (denominado  $\text{pH}_{\phi 1}$ ) y se da la formación de complejos insolubles. A este pH, las soluciones cambian de una solución turbia a una solución transparente y se producen cambios macroscópicos en la turbidez, que se representa por una separación de fases, una fase rica en biopolímero (coacervado) y otra fase pobre en biopolímeros. Se alcanza un máximo (pH óptimo), donde los biopolímeros cargados opuestamente alcanzan una equivalencia eléctrica que proporciona un complejo proteína-polisacárido neutro (Aryee et al., 2012), debido a la presencia de polisacáridos aniónicos y proteínas catiónicas. A medida que el pH se reduce aún más, los sitios reactivos en el polisacárido aniónico comienzan a protonarse, lo que conduce a la pérdida progresiva de la estructura compleja y la turbidez hasta alcanzar una disolución completa a un  $\text{pH}_{\phi 2}$  (Figura 2.9). Aunque el proceso de coacervación se basa principalmente en interacciones electrostáticas, las interacciones hidrofóbicas y de enlace de hidrógeno son menores, y lo más probable es que sean dependencias de los biopolímeros y el solvente, además la agregación



proteína-proteína juega un papel importante tanto en la formación del complejo como en la estabilidad (Aryee et al., 2012).

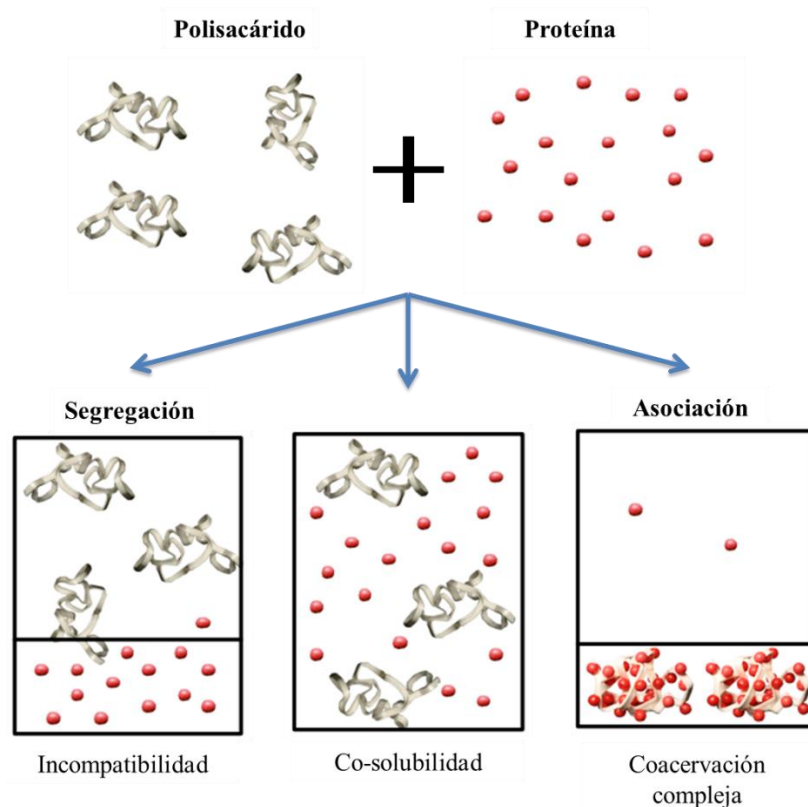


Figura 2.11. Principales tendencias en el comportamiento de las mezclas de proteína/polisacárido.

Los complejos de proteína-polisacárido exhiben una amplia gama de propiedades importantes, tales como la actividad de superficie para estabilizar interfases aceite-agua, propiedades de viscosidad y gelificación, entre algunas otras (Gosh et al., 2012). Algunos estudios señalan que los complejos proteína-polisacárido pueden usarse para mejorar las propiedades de las emulsiones a través de su deposición de la superficie de la gota (Dardelle et al., 2014). La estabilización de emulsiones por complejos proteína-polisacárido se realiza por medio de dos formas. Una de ellas implica la adición de una solución de polisacáridos

cargados a una emulsión primaria que ya está estabilizada por la proteína como emulsionante individual, para producir gotas de emulsión con un revestimiento superficial de bicapa de proteína-polisacárido (Figura 2.12b). Otro método implica la adición de una solución acuosa que contiene los complejos de proteína-polisacárido como un agente emulsionante seguido de la homogenización y que pueden adsorberse juntos en la interfase (Figura 2.12a). El primer método se denomina emulsiones bicapa o capa por capa y el segundo emulsiones preformadas (Hernández- Marín, et al., 2013).

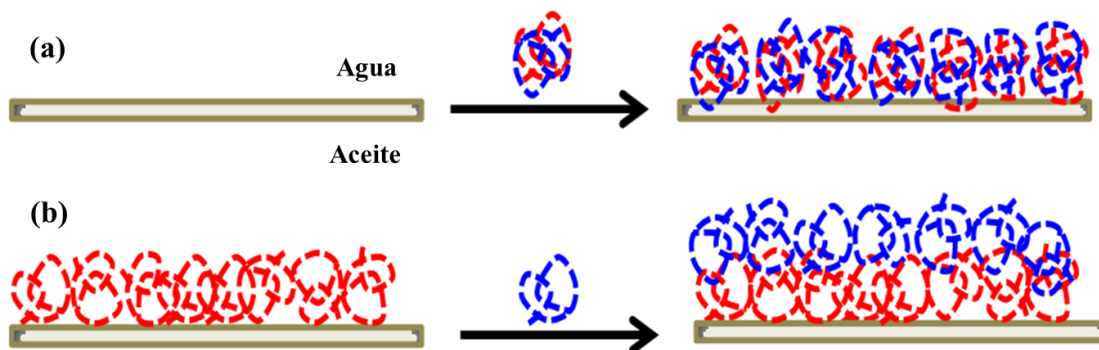


Figura 2.12. Ilustración esquemática de dos enfoques alternativos de preparación de emulsiones aceite-agua utilizando complejos de proteína-polisacárido como emulsionante. (a) Emulsiones mixtas, complejo proteínas-polisacáridos presentes durante la emulsificación, y (b) emulsión capa por capa, polisacárido agregado a la emulsión previamente estabilizado por proteína (Gosh et al., 2012).

---

El efecto de los biopolímeros naturales, sus conjugados y complejos sobre la estabilidad de emulsiones se ha demostrado en los últimos años (Pimentel-González et al., 2009; Li et al., 2017) y se ha encontrado que los conjugados y complejos proteína-polisacárido muestran propiedades emulsionantes superiores que los biopolímeros individuales (Jiménez-Alvarado et al., 2009; Hernández-Marín et al., 2013; Mohammadi et al., 2016; Esfanjani et al., 2017).

### 3. Justificación

El principal problema con respecto a la estabilización de las emulsiones dobles es la presencia de dos interfases termodinámicamente inestables. En la actualidad la utilización de emulsionantes para la estabilización de emulsiones es una opción limitada debido a la legislación y las demandas del consumidor. El progreso en el desarrollo de emulsiones dobles estables para uso alimentario depende de la sustitución de emulsionantes de moléculas pequeñas y agentes estabilizantes poliméricos sintéticos por ingredientes de grado alimentario, como proteínas de alimentos y polisacáridos, que pueden conferir la funcionalidad requerida. Una alternativa a esta problemática es en uso de partículas sólidas, pero a la fecha existe una gran variedad de partículas de origen sintético, lo que limitan su aplicación en sistemas alimentarios, por lo tanto, surge la necesidad de utilizar partículas de origen natural para la formación de emulsiones Pickering estables, y que las partículas formadas cuenten con la hidrofobicidad necesaria para estabilizar interfases agua-aceite y poder formar emulsiones dobles, libres de compuestos sintéticos. Tales partículas pueden ser obtenidas a partir de complejos electrostáticos proteína-polisacárido (concentrado de proteína de suero de leche y goma arábiga).

## 4. Objetivos

### 4.1. Objetivo general

Diseñar una emulsión doble  $O_1/W/O_2$  libre de tensoactivos, por medio de la utilización de complejos proteína de suero de leche-goma arábica, tanto solubles para la estabilización de la emulsión  $O_1/W$  e insolubles para la obtención de partículas sólidas para estabilizar la emulsión  $W/O_2$ .

### 4.2. Objetivos particulares

- ✓ Obtención de complejos solubles (CS) e insolubles (CI) entre concentrado de proteína de suero y goma arábica.
- ✓ Evaluar la hidrofobicidad y la dinámica de tensión interfacial de las partículas de CI secadas a diferentes temperaturas.
- ✓ Formar emulsiones Pickering  $O_1/W/O_2$  en donde la interfase interior  $O_1/W$  se estabilizó con CS y la interfase externa  $W/O_2$  se estabilizó con las partículas de CI tratadas a diferentes temperaturas.
- ✓ Determinar la estabilidad (cambio en el tamaño de gota) y la morfología (microscopía óptica y confocal) de las emulsiones  $O_1/W/O_2$ .

## 5. Hipótesis

El diseño de una emulsión doble ( $O_1/W/O_2$ ), a partir de la utilización de biopolímeros hidrosolubles como son el concentrado de proteína de suero y la goma arábiga, permitirá la formación de complejos tanto solubles como insolubles, los cuales van a conferir las características superficiales necesarias para estabilizar tanto la emulsión primaria  $O_1/W$  por medio del complejo soluble como la emulsión doble por medio de partículas sólidas obtenidas de un complejo insoluble, dándole a esta emulsión la característica que sea libre de tensoactivos o sustancias sintéticas para la estabilización de las dos interfases presentes.

## **6. Materiales y Métodos**

Esta investigación se dividió en tres etapas: la formación de complejos solubles (CS) e insolubles (CI) se realizó en la primera etapa; la segunda etapa consistió en obtener partículas sólidas de CI y su caracterización; y la tercera etapa se relacionó con la formación y caracterización de emulsiones (Figura 6.1).

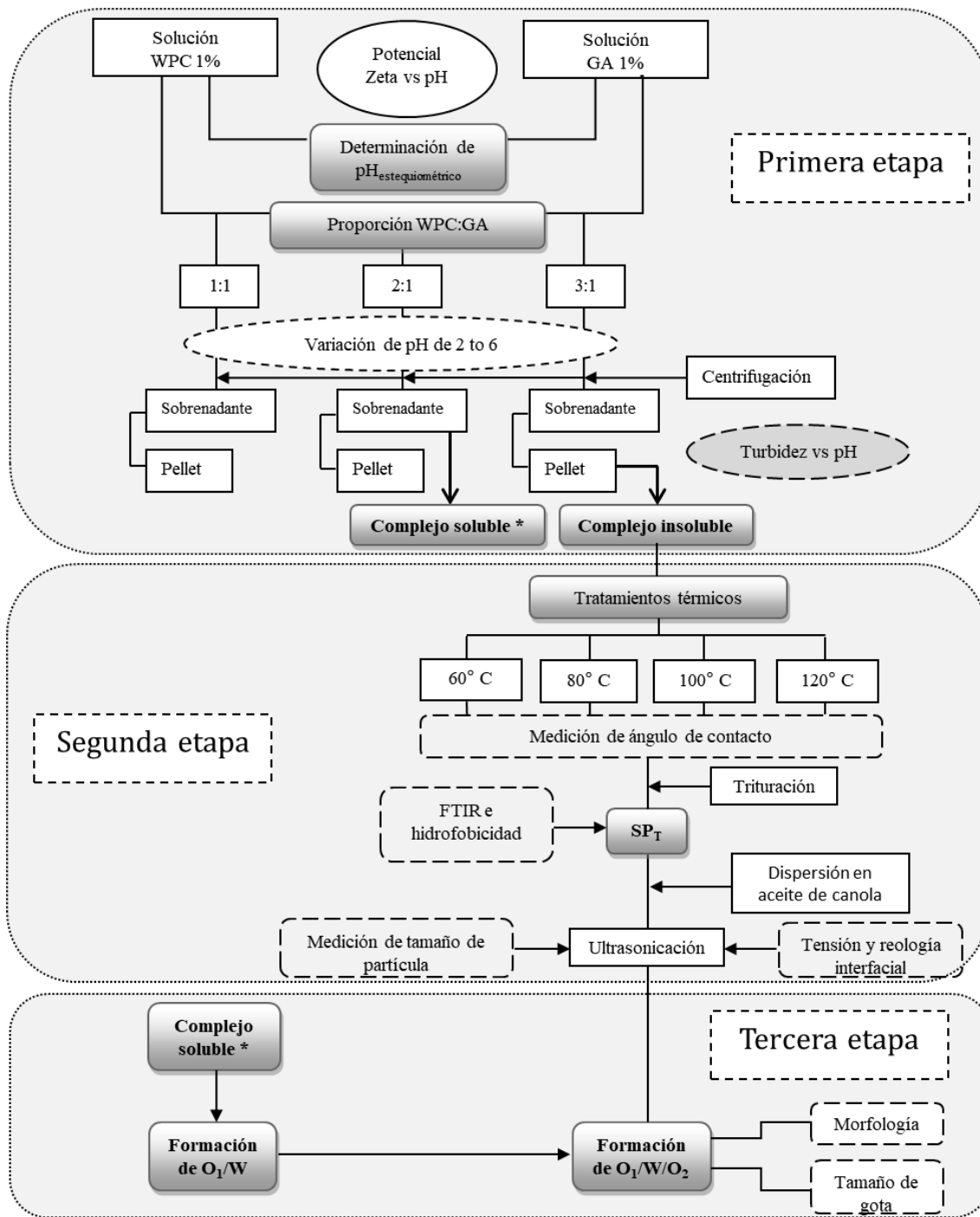


Figura 6.1. Diagrama de flujo esquemático que muestra las diferentes etapas de este trabajo.



## 6.1. Materiales

El concentrado de proteína de suero (WPC; Hilmar™ 8200, 4.5% de humedad, 82.5% de proteína, 5.0% de lactosa y 4.5% de ceniza, con un contenido mineral de 12.5 mg de Na<sup>+</sup>, 5.30 mg K<sup>+</sup>, 0.45 mg Mg<sup>+</sup> y 3.25 mg Ca<sup>2+</sup> por gramo) se obtuvo de Hilmar Cheese Co. (Hilmar, CA. EE.UU.). La goma arábica (GA; G9752, 6.65% de humedad, 89.95% de polisacáridos, 0.30% de nitrógeno y 3.10% de ceniza) se adquirió de Sigma-Aldrich Química (Toluca, Estado de México, México). Se prepararon soluciones madre acuosas de GA (1% en peso) y WPC (1% en peso). Las soluciones se agitaron suavemente durante 12 horas y se almacenaron durante la noche a 4° C, para asegurar la hidratación completa de los biopolímeros. Se adquirieron ácido clorhídrico (HCl) grado analítico, hidróxido de sodio (NaOH) y etanol de Química Laitz, S.A. de C.V. (ciudad de México, México). El aceite de canola (Capullo®, Unilever de México, S.A. de C.V., Tultitlán, Estado de México, México) se adquirió en un supermercado local. El desecante de gel de sílice se obtuvo de Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA, EE.UU.). Rosa de Bengala (RB) se obtuvo de Sigma-Aldrich (Munich, Alemania). Toda el agua utilizada en los experimentos fue doblemente destilada y desionizada (DDW).

## **6.2. Primera Etapa**

### **6.2.1. Determinación del pH óptimo para la complejación de WPC-GA**

Para evaluar la carga superficial total de WPC y GA en función del pH, se determinó el potencial zeta (potencial- $\zeta$ ) de las soluciones madre de los biopolímeros (1% en peso) con un Zetasizer Nano ZS acoplado a un auto titulador MTP-2 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, Reino Unido). El pH de las soluciones se ajustó al valor deseado mediante la adición de 0.1 M NaOH o 0.1 M HCl. El potencial- $\zeta$  se determinó midiendo la dirección y la velocidad de la dispersión a medida que se movían a lo largo del campo eléctrico aplicado. El software del equipo convirtió las mediciones de movilidad electroforética en valores del potencial- $\zeta$  utilizando el modelo matemático Smoluchowski. El pH en que se produjo la máxima diferencia estequiométrica entre el potencial- $\zeta$  positivo de WPC y el potencial- $\zeta$  negativo de GA ( $\text{pH}_E$ ) se consideró como el pH óptimo para impulsar la complejación entre ambos biopolímeros.

### **6.2.2. Determinación de las relaciones en peso WPC-GA para la formación de complejos solubles e insolubles.**

Los efectos del pH y la relación en peso de los biopolímeros ( $R_{\text{WPC:GA}}$ ) en la complejación WPC-GA se estudiaron mediante análisis turbidimétrico.  $R_{\text{WPC:GA}}$  se varió de 1:1 a 3:1 con una concentración de biopolímero constante ( $\text{TB}_{\text{cons}}$ ) de 1% en peso. Para cada mezcla de

biopolímero, el pH (2.0 a 6.0) se ajustó con HCl (0.1 M) o NaOH (0.1 M). Las mezclas se agitaron suavemente durante 1 h a temperatura ambiente, se dejaron reposar durante 48 h a 4° C y se centrifugaron (Hermle modelo Z36HK, Hermle Labor Technik GmbH, Wehingen, Alemania) a 1350 rpm durante 30 min., para separar el CI del CS en el sobrenadante. Los valores de turbidez del sobrenadante se midieron con un turbidímetro (Hach modelo 2100N, HACH, Loveland, CO, E.U.) calibrado con patrones que varían de 0 a 2000 unidades de turbidez nefelométricas (NTU). El aumento de las lecturas de NTU del sobrenadante es indicativo de la formación progresiva de CS, mientras que las lecturas pronunciadas de caída de NTU acompañadas de la formación de precipitados indican que se formó la fase CI (Hernández-Marín et al., 2013; Liu et al., 2017).

### **6.3. Segunda etapa**

#### **6.3.1. Medición de ángulo de contacto**

Los CI húmedos se extendieron uniformemente por separado sobre portaobjetos de vidrio y se secaron en un horno convectivo forzado (Riossa, modelo E-51, Ciudad de México, México) a temperaturas (T) de 60, 80, 100 y 120 ± 1° C, hasta que se obtuvieron películas homogéneas con peso constante (Yang et al., 2017). El equilibrio fue alcanzado cuando la diferencia entre dos ponderaciones consecutivas era inferior a 1 mg/g. En todos los casos, el contenido de humedad de las películas fue de 5 ± 0.2% en peso. Las películas obtenidas se codificaron como F<sub>T</sub>, donde el subíndice T denota la temperatura a la que se secó el CI. Los F<sub>T</sub> se colocaron en desecadores que contenían gel de sílice hasta que se requirió para el

análisis. El ángulo de contacto de una gota sésil de agua (10  $\mu$ L) a 25° C se midió con un dispositivo de ángulo de contacto óptico (OCA20, Data Physics Instruments, Filderstadt, Alemania). El perfil de la gota se resolvió numéricamente y se ajustó a la ecuación de Laplace-Young (Zou et al., 2016).

### **6.3.2. Preparación de partículas sólidas de WPC-GA**

Los  $F_T$  se trituraron usando un molino de cuchillas (Grindomix GM 200, Retsch, GmbH, Haan, Alemania) y los polvos se pasaron a través de una malla de acero inoxidable de tamiz estándar (N° 500) con una abertura de tamiz de 25.4  $\mu$ m. Las partículas sólidas se codificaron como  $SP_T$  y se usaron como tales para la espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR).

En el caso de las mediciones de tensión interfacial (IFT), reología interfacial y emulsiones Pickering  $O_1/W/O_2$  (PDE), se aplicó un tratamiento de acuerdo con la metodología propuesta por Bel Haaj et al., (2013). Se colocó una dispersión de  $SP_T$  (5% en peso) en aceite de canola en un recipiente de vidrio y se sumergió en un baño de hielo para mantener una temperatura constante. Esta solución se sometió a ultrasonido (Vibra-Cel VCX 130 PB, Newtown, CT., E.U.) con una amplitud del 90% y una frecuencia de 20 kHz durante 64 min de sonicación intermitente (50 s de energía: 10 s de pausa). Las muestras de la suspensión de  $SP_T$  se eliminaron a diferentes intervalos para el análisis del tamaño de partícula. El diámetro de partícula se midió usando un NanoZetasizer ZS Malvern. Las muestras se diluyeron 1:100 con aceite para evitar dobles efectos de dispersión. Las mediciones de dispersión de luz

dinámica (DLS) dan una intensidad armónica promedio de diámetro de partícula conocida como tamaño promedio Z.

### **6.3.3. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).**

El análisis de FTIR se realizó con un espectrofotómetro infrarrojo (Perkin Elmer, Waltham, MA, E.U.). Las muestras se pusieron en contacto con el cristal de diamante aplicando una presión de carga y se escanearon en el intervalo de 650-1800  $\text{cm}^{-1}$ . Se utilizó un espectro de celda vacía como fondo. El espectro de agua se restó de todos los espectros de las SP<sub>T</sub> con el fin de eliminar el efecto de distorsión del agua en la región 1200-900  $\text{cm}^{-1}$ . Para cada muestra, el espectro representaba un promedio de cuatro escaneos con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Además, los espectros fueron corregidos en la línea base. Para obtener contribuciones espectrales individuales, todos los espectros se deconvolucionaron usando técnicas descritas por Cameron y Moffatt (1984). En este caso, la forma de línea superpuesta era Lorentzian con un ancho medio de 15  $\text{cm}^{-1}$ .

### **6.3.4. Hidrofobicidad superficial de partículas sólidas**

La hidrofobicidad superficial de las SP<sub>T</sub> se determinó mediante experimentos de adsorción del tinte hidrófobo Rosa de bengala (RB) en la superficie de las partículas (Xiao y Wiesner, 2012). RB es un colorante que muestra una mayor adsorción a la superficie de la partícula a medida que está aumenta su hidrofobicidad. Este método ha sido utilizado en estudios de farmacéutica para determinar la hidrofobicidad de la superficie de nanopartículas. Se

---

realizaron soluciones en un buffer pH 4.0 (fosfato/citrato 0.1 M) con concentraciones crecientes de SP<sub>T</sub> (10 a 1000 mg/L) y 20 mg/L de RB. Se preparó un control añadiendo RB a DDW para contabilizar la adsorción de RB. Después de que las soluciones se mezclaron suavemente a temperatura ambiente durante 3 h, RB se repartió entre la superficie de las SP<sub>T</sub> y el agua. Las SP<sub>T</sub> se separaron del sobrenadante por ultracentrifugación a 185,000 g. La concentración de RB libre en el sobrenadante se determinó mediante espectroscopía UV-VIS a  $\lambda = 542.7$  nm. El cociente de partición (PQ) se calculó con la siguiente ecuación (1):

$$PQ = \frac{\text{Masa de RB adsorbida en la superficie de la partícula}}{\text{Masa de RB en el agua}} \quad (1)$$

Para calcular el área superficial total (SA), se determinó el diámetro medio de la superficie ( $d_{3,2}$ ) de las SP<sub>T</sub> mediante mediciones dinámicas de dispersión de luz (Malvern; Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, Reino Unido). Las suspensiones de SPT se diluyeron 1:15 con DDW para evitar dobles efectos de dispersión. Se realizó un gráfico de PQ contra SA, lo cual proporciona una línea recta, la pendiente calculada se considera como indicador de la hidrofobicidad superficial de SP<sub>T</sub> (Xiao y Wiesner, 2012).

### 6.3.5. Tensión interfacial

La adsorción interfacial de las SP<sub>T</sub> se investigó por medio de estudios de medición de la tensión interfacial (IFT) en la interfase de agua-aceite de canola a 25° C. Las SP<sub>T</sub> (5% en peso) se dispersaron en aceite de canola y se sonicaron como se describe en la subsección

---

6.3.2. Las mediciones de tensión interfacial se realizaron con un medidor de ángulo de contacto óptico (OCA20, Data Physics Instruments, Filderstadt, Alemania), equipado con accesorios de caída oscilante ODG-20. Una gota ( $\sim 40 \mu\text{L}$ ) de la dispersión oleosa con las  $\text{SP}_T$  se formó automáticamente con la ayuda de una jeringa en una cubeta de vidrio que contenía DDW. El cambio en la forma de caída durante un periodo de 5000 s se capturó con una cámara del dispositivo de acoplamiento de carga (CCD) y el software del equipo registró los cambios en IFT.

### 6.3.6. Reología interfacial

Los estudios de capacidad de fluencia interfacial en el tiempo se determinaron siguiendo el procedimiento de Carrillo-Navas, et al., (2013) con modificaciones. Un reómetro compacto modular Physica MCR 300 (Physica Mebtechnik GmbH, Stuttgart, Alemania), con un disco bicónico de acero inoxidable (radio de disco,  $R_b$ , de 15 mm y disco de doble ángulo,  $2\alpha$ , de  $10.0^\circ$ ), y un recipiente de acrílico con termostato (radio interno,  $R_c$ , de 27 mm) insertado en la placa de medición del reómetro. Se vertió DDW (30mL) en el recipiente. Después, la unidad de motor del reómetro se bajó hasta que se colocó el disco bicónico en la superficie del DDW. Enseguida la fase oleosa (28.5 g de aceite de canola + 1.5 g de  $\text{SP}_T$ ) se vertió cuidadosamente con ayuda de una varilla de vidrio en la pared vertical del recipiente hasta que el aceite formó una capa por encima del DDW. El envejecimiento de la interfase se tomó desde el momento en que se vertió la última gota de la fase de aceite. Las películas interfaciales se codificaron como  $\text{IF}_T$ . El  $\text{IF}_T$  se sometió a una velocidad angular de disco constante ( $\Omega$ ) de  $1.27 \times 10^{-3}$  rad/s. El torque necesario ( $M$ ) requerido para mantener la

velocidad de rotación constante y el desplazamiento angular del disco con el tiempo ( $\theta_b$ ) fue monitoreado cada 10 s durante 15 min con el software del reómetro. La capacitancia de fluencia interfacial se llevó a cabo sometiendo a las películas IF<sub>T</sub> a una constante tensión de cizalla de 0.33535 mN/m durante 15 min, después de lo cual se retiró la tensión de cizalla y se siguió la relajación de la tensión de la película durante 15 min más. La tensión de cizalla interfacial  $\gamma^{\text{int}}$  y el esfuerzo cortante interfacial ( $s^{\text{int}}$ ) fueron calculadas usando las ecuaciones 2 y 3.

$$\sigma^{\text{int}} = \frac{M}{2\pi r^2} \quad (2)$$

$$\gamma^{\text{int}} = \frac{2R_b^2}{R_c^2 - R_b^2} \theta_b \quad (3)$$

Donde  $r$  es la ubicación radial entre el disco y la vasija ( $R_b \leq r \leq R_c$ ).

La capacitancia interfacial de las películas IF<sub>T</sub> en función del tiempo se obtuvieron con la siguiente ecuación:

$$J(t) = \frac{\gamma^{\text{int}}(t)}{\sigma^{\text{int}}} \quad (4)$$

Donde  $s^{\text{int}}$  fue evaluado en el radio del disco ( $R_b$ ). Se obtuvieron gráficos de la capacitancia interfacial contra el tiempo para las películas IF<sub>T</sub>.



## 6.4. Tercera etapa

### 6.4.1. Formación de emulsiones Pickering dobles aceite-en-agua-en-aceite

Las emulsiones Pickering dobles fueron preparadas a temperatura ambiente ( $22 \pm 2$  °C) utilizando un procedimiento de emulsificación de dos etapas (Rodríguez-Huezo et al., 2004) con ligeras modificaciones. La primera etapa consistió en la formación de la emulsión primaria  $O_1/W_X$ , donde el subíndice x denota la concentración de CS adicionado a la emulsión. El aceite de canola se vertió gota a gota con agitación continua en la fase acuosa (1, 3 y 5% en peso de complejo soluble WPC-GA) y se homogeneizó a 22,000 rpm durante 10 min con un homogeneizador Ultra Turrax® de alto cizallamiento (modelo T25 básico, IKA Works, Inc., Wilmington, NC, E.U.). La fracción de masa dispersada de la emulsión primaria fue de 0.3.

En la segunda etapa, la emulsión  $O_1/W$  se volvió a emulsionar en la dispersión oleosa con las  $SP_T$  (1, 3 y 5% en peso), utilizando el homogeneizador a 2,800 rpm durante 2 min. Las emulsiones dobles Pickering aceite-en-agua-en-aceite ( $O_1/W/O_2$ ) se codificaron como  $PDE_{T,X}$  donde el subíndice T denota la temperatura a la que se secaron las  $SP_T$  y X denota la concentración de partículas. Todas las  $PDE_{T,X}$  tenían una fracción de masa dispersada de emulsión primaria de 0.3 y un pH de 4.0.

#### **6.4.2. Análisis de tamaño medio de gota de las emulsiones**

El diámetro medio de longitud de número ( $d_{1,0}$ ) de la emulsión O<sub>1</sub>/W recién preparada y almacenada durante 76 días a  $5 \pm 1$  °C se determinó con un analizador de tamaño de partícula Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Ltd., Worcestershire, Reino Unido). Índices de refracciones de las fases dispersas y continuas utilizadas en los cálculos fueron 1.466 y 1.330 respectivamente.

El tamaño medio de gota ( $d_{1,0}$ ) y la distribución de las PDE<sub>T</sub> recién preparadas y almacenadas durante 76 días a  $5 \pm 1$  °C se determinaron mediante el análisis de micrografías tomadas con un microscopio óptico de contraste de fases Olympus BX45 acoplado con una cámara digital Camedia C-3030 (Olympus Optical Co., Ltd., Tokio, Japón) y analizada con el software Image-Pro Plus versión 7.0. Se muestran micrografías ópticas seleccionadas con una ampliación de 40X.

#### **6.4.3. Morfología de las emulsiones**

La microscopia confocal láser de barrido (CLMS) de las PDE<sub>T</sub> se realizó utilizando un microscopio de escaneo confocal LMS 710 NLO (FC Carl Zeiss, Jena, Alemania). Las muestras se tiñeron con isotiocianato de fluoresceína (0.01% en peso en acetona) y el análisis se llevó a cabo utilizando un objetivo de inmersión en aceite de 63X a longitudes de excitación de 48 nm y una emisión de luz del 6%.

## 6.5. Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado en todas las etapas de experimentación. Las variables fueron potencial zeta, pH, turbidez, ángulo de contacto, tensión interfacial, tamaño de partícula y tamaño de gota. Todas las mediciones se realizaron por triplicado a partir de tres experimentos independientes y se reportaron como media  $\pm$  DE. Se aplicó el análisis de varianza de clasificación simple y una prueba de Tukey para determinar la diferencia de medias ( $p \leq 0.05$ ). Los análisis estadísticos se realizaron con el software NCSS 2000 (Kaysville, Utha, E.U.).

## 7. Resultados

### 7.1. Potencial Zeta

La figura 7.1 muestra los valores de potencial- $\zeta$  de las soluciones acuosas de WPC y GA en función del pH. Las soluciones acuosas de WPC y GA mostraron un comportamiento típico como la mayoría de los biopolímeros utilizados para la formación de coacervados complejos (Espinosa-Andrews et al., 2013). GA presentó valores de potencial- $\zeta$  negativos (desde  $-6.04$  a  $-18$  mV) durante todo el intervalo de pH estudiado. WPC exhibió un carácter anfifílico, que muestra un punto isoeléctrico (PI) a un pH de 4.39. Este PI se ubicó entre los reportados para  $\alpha$ -lactoalbumina (4.1) y  $\beta$ -lactoglobulina (5.2) por Weinbreck et al., (2004), que son los principales constituyentes de WPC. Además otros autores han reportado diferentes valores de PI para WPC, que van de pH 4.0 (Hernández-Rodríguez et al., 2014) a 5.2 (Thongkaew et al., 2014), esta variación en los valores de PI podrían deberse a diferencias en la composición química de WPC. Por lo tanto, el pH juega un papel importante en la formación de complejos coacervados debido a su efecto sobre el grado de ionización de los grupos funcionales amino ( $-\text{NH}_2$ ) y carboxilo ( $-\text{COOH}$ ) unidos a las moléculas de biopolímeros como las proteínas y los polisacáridos (Schmitt et al., 1998; Hong y McClements, 2007). Por debajo del PI, los restos cargados positivamente ( $-\text{NH}_3^+$ ) superaron en número a los restos cargados negativamente ( $-\text{COO}^-$ ), lo que dio como resultado una carga neta positiva de la proteína (Timilsena et al., 2016), este comportamiento es el mecanismo impulsor para la interacción electrostática entre los biopolímeros (Espinosa-Andrews et al.,

2013). Para valores superiores a su PI, WPC mostró un carácter aniónico debido a la desprotonación de los grupos carboxilo causada por la presencia de iones hidroxilo (Klein et al., 2010). El pH donde se presenta la diferencia máxima entre el potencial- $\zeta$  positivo de WPC y el potencial- $\zeta$  negativo de GA ( $pH_E$ ) fue de 3.5.

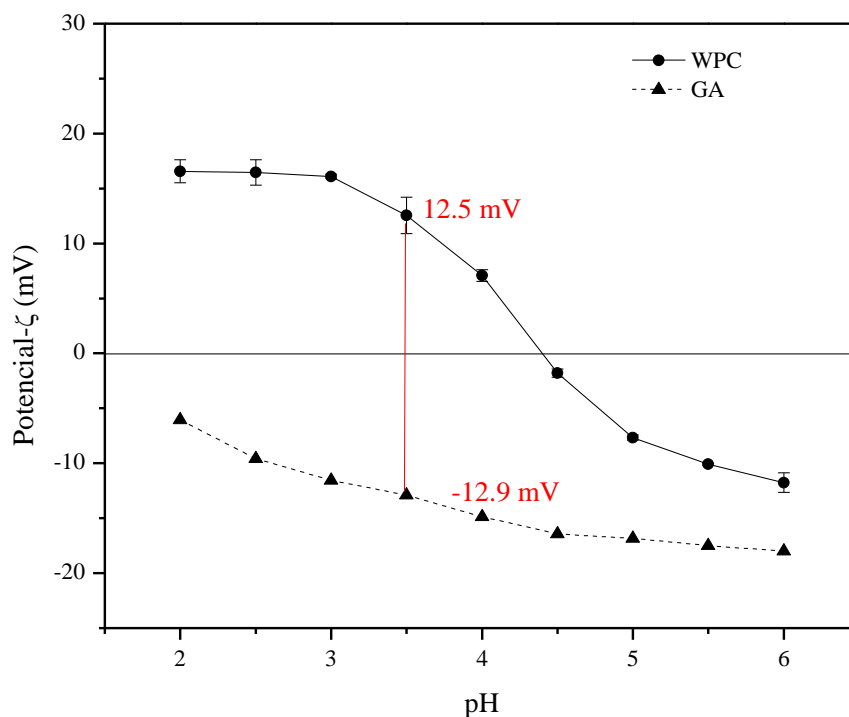


Figura 7.1. Valores de potencial- $\zeta$  de soluciones acuosas de WPC y GA en función del pH. La línea vertical denota el potencial- $\zeta$  estequiométrico entre los biopolímeros.

## **7.2.Efecto de la relación en peso y pH de los biopolímeros en la formación de complejos.**

El efecto de la variación del pH y  $R_{WPC-GA}$  a 1% p/v  $TB_{conc}$  en las lecturas de turbidez del sobrenadante se muestran en la figura 7.2. Para el propósito de esta investigación, tres regiones generales de los perfiles de turbidez son relevantes: (1) una región por encima del pH 5.0, donde la complejación entre los biopolímeros es baja o despreciable, ya que ambos biopolímeros están cargados negativamente. Esto provoca una repulsión electrostática entre los biopolímeros, que tienden a coexistir como moléculas solubles individualmente en el sobrenadante. (2) Una región entre pH 5.0 y 3.9 donde las lecturas de turbidez aumentaron hasta un valor máximo, como resultado de la formación de CS entre las moléculas de WPC y GA (Liu et al., 2010). (3) Una región para valores de pH entre 3.9 y 2.5, donde la turbidez del sobrenadante disminuye drásticamente hasta alcanzar valores cercanos a cero. En esta región, se producen fuertes interacciones electrostáticas entre la proteína cargada positivamente y las moléculas de polisacárido con carga negativa, que conducen a la formación de CI neutros (coacervados complejos). El pH en el que se produce este fenómeno depende de la relación entre los biopolímeros utilizados (Dickinson, 2008; Gulão et al., 2016).

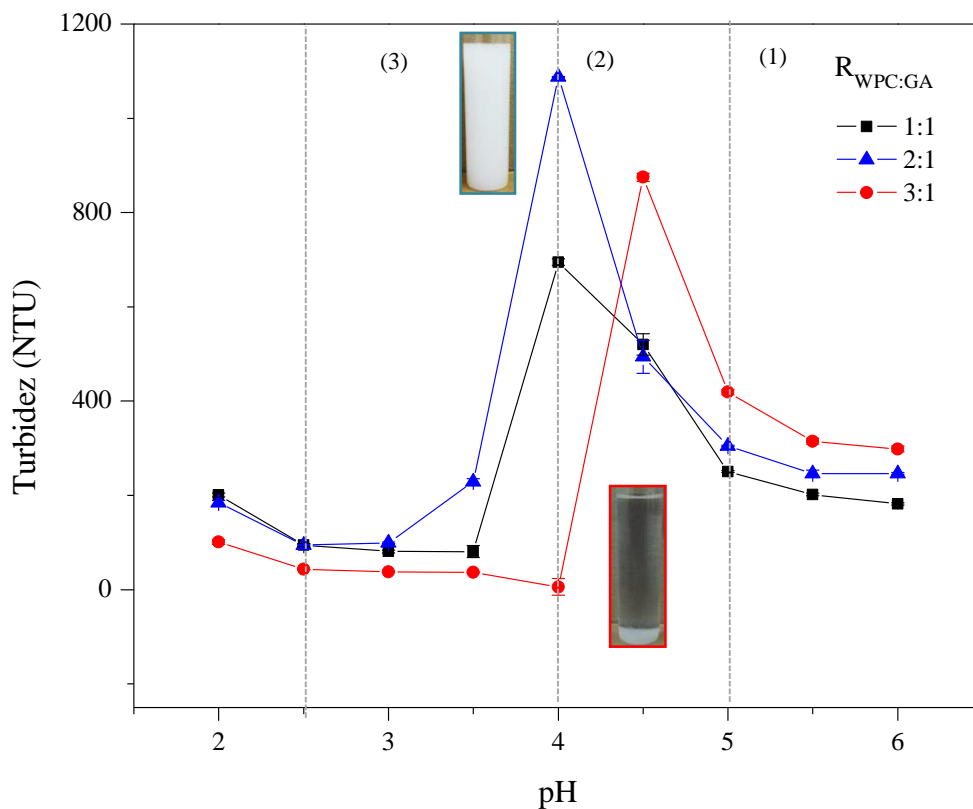


Figura 7.2. Efecto del pH y relación en peso ( $R_{WPC:GA}$ ) a una concentración total de 1% p/v en lecturas de turbidez del sobrenadante.

Como puede observarse en la figura 7.2,  $R_{WPC:GA}$  estuvo relacionado con las lecturas de la turbidez. A pH 4.0 se produjo una lectura de turbidez mínima para  $R_{3:1}$ , lo que implica que el número de restos cargados negativamente de la GA y el número de grupos cargados positivamente del WPC se encontraban en una relación estequiométrica, de modo que se produjo una neutralización completa entre las cargas del signo opuesto, y se produjo la formación del CI. Por otro lado,  $R_{1:1}$  y  $R_{2:1}$  mostraron lecturas de turbidez máxima a un pH 4.0,  $R_{2:1}$  mostro una lectura mayor de turbidez en comparación con  $R_{1:1}$ . Esto significa que

se produjo una neutralización incompleta de los restos cargados negativamente de la GA y los restos cargados positivamente del WPC (Ramírez-Santiago et al., 2012), dando como resultado la formación de CS.

Con base en estos resultados, se decidió seleccionar un pH de 4.0 para la formación de los complejos de concentrado de proteína de suero-goma arábica, utilizando un R<sub>3:1</sub> para obtener el CI y un R<sub>2:1</sub> para la obtención del CS. Las proteínas del suero de leche pueden formar coacervados complejos con polisacáridos aniónicos en un rango de pH entre 3 y 4 (Weinbreck et al., 2004; Capitani et al., 2007).

### **7.3. Humectabilidad de películas realizadas con CI**

Las propiedades de superficie de las proteínas están estrechamente relacionadas con su estructura. Las fuerzas hidrofóbicas, estéricas y atractivas son variables importantes que afectan la estructura de las proteínas y su interacción con otras moléculas. Otros factores como el pH, temperatura y enlaces disulfuro afectan su flexibilidad y estabilidad molecular y por lo tanto la hidrofobicidad de la proteína (Uruakpa y Arntfield, 2006). La mojabilidad es una de las propiedades más importantes de las superficies sólidas, y está estrechamente relacionada con la medición del ángulo de contacto ( $\theta$ ) (Yang y Suya, 2017). La mojabilidad de los coacervados por las fases de aceite/agua es un factor crucial para el desarrollo de partículas como estabilizador de emulsiones Pickering. Por ejemplo, una gota de líquido hidrofílico formará ángulos de contacto  $\geq 90^\circ$  en superficies hidrófilicas. Las películas F<sub>T</sub> se sometieron a mediciones de ángulo de contacto con el fin de establecer si el tratamiento térmico tenía algún efecto sobre su hidrofobicidad.



No todas las partículas, sirven como buenos estabilizadores, y en muchos casos sus superficies necesitan ser modificadas para absorberse en interfases fluidas (Lam et al., 2014). Si las partículas son demasiado hidrófilas (bajo  $\theta$ ) o demasiado hidrófobas (alto  $\theta$ ) tienden a permanecer dispersas en la fase acuosa o en la fase oleosa, respectivamente, dando lugar a emulsiones muy inestables (Binks et al., 2002). Todos los  $F_T$  exhibieron ángulos de contacto mayores de  $90^\circ$ , lo que significa que todos poseían un carácter hidrofóbico. Esto es de suma importancia, ya que WPC y GA son ambos de naturaleza hidrófila, lo que significa que CI adquiere una naturaleza hidrófoba. El valor del ángulo de contacto aumentó a medida que la temperatura del tratamiento térmico aumentó, como puede observarse en la figura 7.3, donde se aprecia la diferencia de la mojabilidad de la superficie del coacervado por el agua. A medida que va en aumento la temperatura que se utiliza en el tratamiento término, el ángulo de contacto va en aumento, siendo de  $98.6^\circ$  para  $F_{60}$ ,  $102.6^\circ$  para  $F_{80}$ ,  $107.7^\circ$  para  $F_{100}$  y  $114.4^\circ$  para  $F_{120}$ . En principio las partículas sólidas ( $SP_T$ ) obtenidas de la trituración de las  $F_T$  deberían ser adecuadas para promover la formación de emulsiones Pickering de fase continua de aceite (Xiao y Wiesner, 2012).

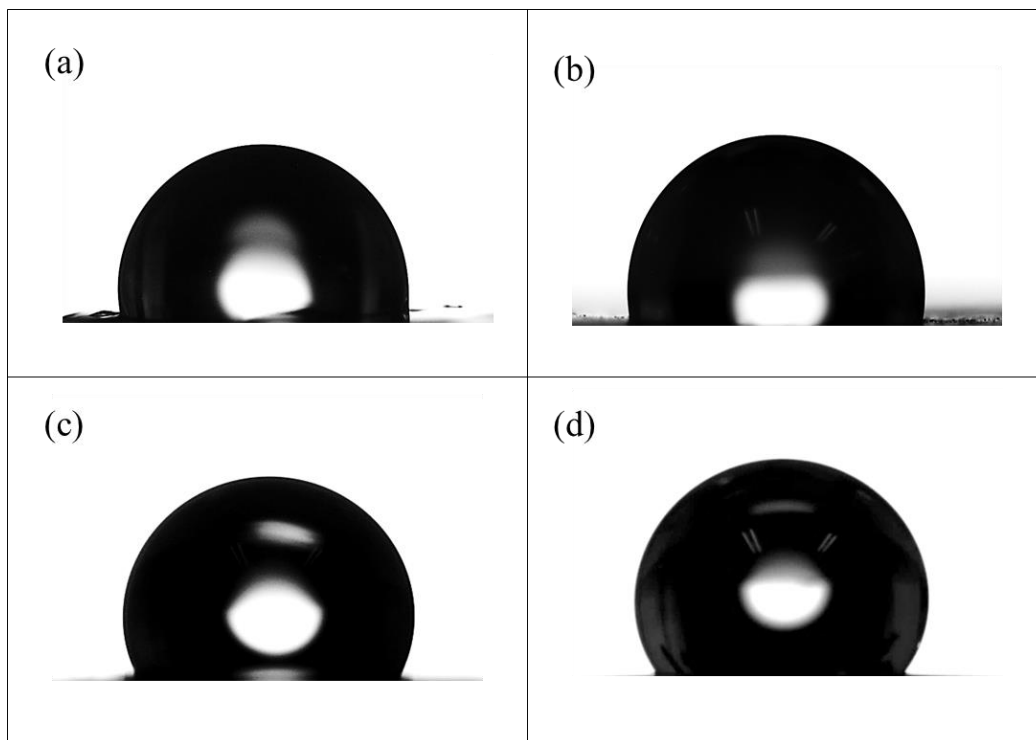


Figura 7.3. Ángulo de contacto de gota de agua sobre  $F_T$  de coacervado insoluble WPC-GA secadas a diferentes tratamientos térmicos; (a)  $F_{60}$  con un  $\theta = 98.6^\circ$ , (b)  $F_{80}$  con un  $\theta = 102.6^\circ$ , (c)  $F_{100}$  con un  $\theta = 107.7^\circ$  y (d)  $F_{120}$  con un  $\theta = 114.4^\circ$ .

Wu et al. (2015) reporta ángulos de contacto para agregados de aislado de proteína de suero de 74 a 86°, este incremento del ángulo de contacto lo atribuyen a que cuando la proteína está en su punto isoeléctrico (pH 5) la carga neta es cero y la superficie es más hidrofóbica. Esto es coherente con la literatura, donde se ha informado de que las partículas se vuelven hidrofóbicas cuando se acerca a su pI, debido a la disminución de la densidad de la carga superficial (de Folter et al., 2012). Feng y Lee (2015), realizaron nano complejos coloidales de zeína y caseinato de sodio, encontrando que las partículas coloidales fueron preferentemente mojadas por la fase acuosa, a medida que se aumenta la cantidad de caseinato de sodio, aumento significativamente la mojabilidad por la fase acuosa pero sólo

hasta alcanzar un ángulo de contacto de  $80^\circ$ . Ellos atribuyen el cambio de la mojabilidad por cambios superficiales de la partícula al agregar caseinato de sodio

Dardelle y Erni (2014), realizaron la medición de ángulo de contacto de un coacervado, utilizando gelatina como fuente de proteína y goma acacia como polianión, colocando una gota de aceite con una densidad mayor a la del agua, sobre una superficie de coacervado gelificado, los valores del ángulo de contacto que obtuvieron fueron mayores a  $90^\circ$ , que van de  $110$  a  $140^\circ$ , lo cual quiere decir que obtiene una partícula hidrofílica, que comparado con los ángulos obtenidos para el coacervado realizado con WPC y GA, se obtienen superficies hidrofóbicas, lo cual le da esta característica el contenido del aminoácido hidrofóbico presente en la  $\beta$ -lactoglobulina con 3 aminoácidos de cisteína y la  $\alpha$ -lactoalbumina con 6 aminoácidos de cisteína.

## **7.4. Caracterización de partículas**

### **7.4.1. Tamaño de partícula**

Algunas especies han sido utilizadas como estabilizadores Pickering, incluyendo partículas inorgánicas y sintéticas como es la silica hidrófobizada y perlas de vidrio (Tsabet y Fradette, 2015). El desarrollo de partículas estabilizadoras comestibles ha incluido especies basadas en almidón (Yusoff y Murray, 2011; Timgren et al., 2011), partículas coloidales de zeína/quitosano (Wei-Jian et al., 2016), celulosa, flavonoides y esporas. Dependiendo de si las partículas adsorbidas son predominantemente hidrófilas o hidrófobas, es el uso que se les va a dar para formar emulsiones del tipo O/W o W/O. En la presente investigación las

---

partículas obtenidas son utilizadas para estabilizar emulsiones del tipo W/O<sub>2</sub>, debido a que presenta ángulos de contacto  $> 90^\circ$ . El tamaño de partícula medio es un factor crucial que va a influir en la eficacia de la estabilización de las emulsiones (Dickinson 2012), por lo tanto, el tamaño de las partículas utilizadas para estabilizar emulsiones Pickering pueden ser de escala nanométrica o micrométrica. Las partículas sólidas (SP<sub>T</sub>) obtenidas de las películas de F<sub>T</sub> mediante molienda y tamizado tenían valores  $d_{1,0}$  de la siguiente manera:  $2.23 \pm 0.27 \mu\text{m}$  para SP<sub>60</sub>,  $2.27 \pm 0.19 \mu\text{m}$  para SP<sub>80</sub>,  $2.25 \pm 0.27 \mu\text{m}$  para SP<sub>100</sub> y  $2.28 \pm 0.27 \mu\text{m}$  para SP<sub>120</sub>, no teniendo diferencia significativa entre ellas. Este rango de tamaño de partícula fue similar a lo reportado por otras partículas sólidas naturales usadas para la estabilización de emulsiones Pickering tales como gránulos de almidón ( $\sim 1.34 - 3.45 \mu\text{m}$ ) (Timgren et al., 2011). El tamaño micrométrico de las partículas las dota de un buen potencial para estabilizar emulsiones Pickering, de acuerdo a Wang et al., (2016), establece que cuando mayor sea el tamaño de partícula, mayor será la energía de desorción. Pawar et al., (2011), utilizaron partículas de sílica con un diámetro de  $1.5 \mu\text{m}$ , para estabilizar una emulsión O/W Pickering, el cual es similar a las partículas encontradas para las partículas sólidas de CI, pero con la diferencia de que son partículas naturales y no sintéticas. Gartí et al., (1999) utilizaron cristales para la estabilización de emulsiones logrando obtener emulsiones de 6 a  $18 \mu\text{m}$  en un tamaño de partícula de cristales de aprox.  $1 \mu\text{m}$ , con este tamaño podemos ver que las partículas de CI podrán colocarse en la interfase agua/aceite.

A pesar de esto, se decidió reducir aún más el tamaño de nuestras partículas dispersándolas en aceite de canola y aplicando ultrasonido de alta densidad. El efecto de la sonicación en el tamaño de las SP<sub>T</sub> se muestra en la figura 7.4. La sonicación tuvo un efecto importante sobre el tamaño de partícula, disminuyendo de dimensiones micrométricas a nanométricas. La

aplicación del tiempo del tiempo de sonicación más allá de 8 minutos no produjo ninguna disminución adicional en el tamaño de las partículas. Los tamaños de partículas obtenidos fueron de  $773.1 \pm 0.29$  nm para SP<sub>60</sub>,  $748.5 \pm 0.23$  nm para SP<sub>80</sub>,  $778.6 \pm 0.13$  nm para SP<sub>100</sub> y  $745.0 \pm 0.34$  nm para SP<sub>120</sub> después de 8 min de sonicación, con un índice de polidispersidad (PDI) que varía de 0.391 para SP<sub>60</sub> a 0.367 para SP<sub>120</sub>. Como regla general, cuando el PDI se determina mediante técnica de dispersión dinámica de luz (DLS), se considera que la distribución monodispersa uniforme ocurre cuando el PDI = 0, una distribución estrecha monodispersa ocurre cuando el PDI está en el rango de 0.1 a 0.4, y la distribución polidispersa amplia ocurre cuando el PDI > 0.4. Por lo tanto, todas las SP<sub>T</sub> exhibieron una clasificación polidispersa moderada, lo que significa que la distribución no fue ni extremadamente polidispersa ni amplia, ni en ningún sentido estrecha (Malvern, 2014). Bel Haaj et al., (2013) estudiaron en efecto de la sonicación en el tamaño de partícula de almidón, observando un comportamiento similar a lo obtenido para las SP<sub>T</sub>. Las partículas sonicadas fueron las utilizadas para tensión interfacial y la formación de las emulsiones dobles Pickering.

Por lo tanto, el tamaño y el PDI obtenido para las SP<sub>T</sub>, el tratamiento térmico que se le aplicó a las partículas no tuvo algún efecto significativo sobre estos parámetros, sugiriendo que este efecto se puede descartar sobre la estabilización de las emulsiones.

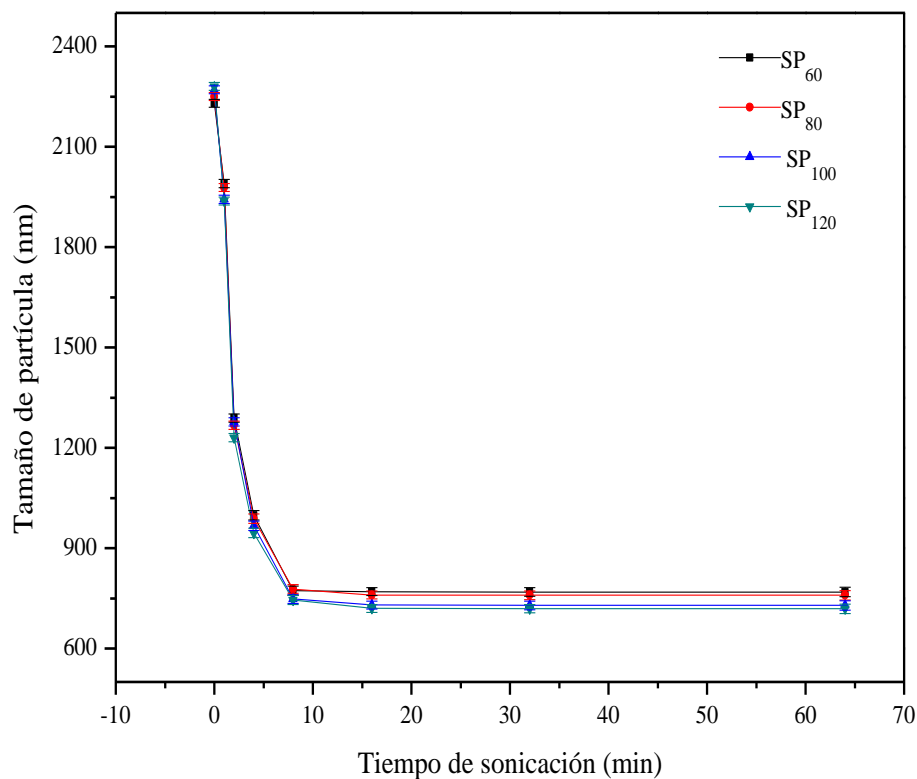


Figura 7.4. Efecto del tiempo de sonicación sobre el tamaño de partícula de las SP<sub>T</sub> dispersadas en aceite de canola.

#### 7.4.2. Espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR)

Las proteínas son un sistema muy complejo que se caracteriza por un número de residuos de aminoácidos cuya cadena flexible se pliega de una manera precisa para formar el estado nativo de la proteína. El proceso de plegado depende de muchas variables tales como la temperatura, presión y pH (Mallamace et al., 2014).

La espectroscopia FTIR está basada en la adsorción de la radiación debido a las vibraciones entre átomos de las moléculas y provee información acerca de la composición química y conformacional (Ven et al., 2002), utilizando el esqueleto peptídico y las cadenas laterales de las proteínas como monitores de conformación sensible (Mallamace et al., 2015). La información específica sobre la estructura secundaria de proteínas se obtiene a partir del análisis de las diversas bandas de amida que son de hecho sensibles a la conformación de proteínas (Mallamace et al., 2015). Las bandas de amida I y II son las más importantes que dan la vibración de la columna vertebral de proteínas. Las diferentes contribuciones de las amidas en la región de las flexiones están reportadas en la figura 7.5, los modos vibraciones de la amida I y la amida II están también representados en un fragmento de péptido (Mallamace et al., 2014).

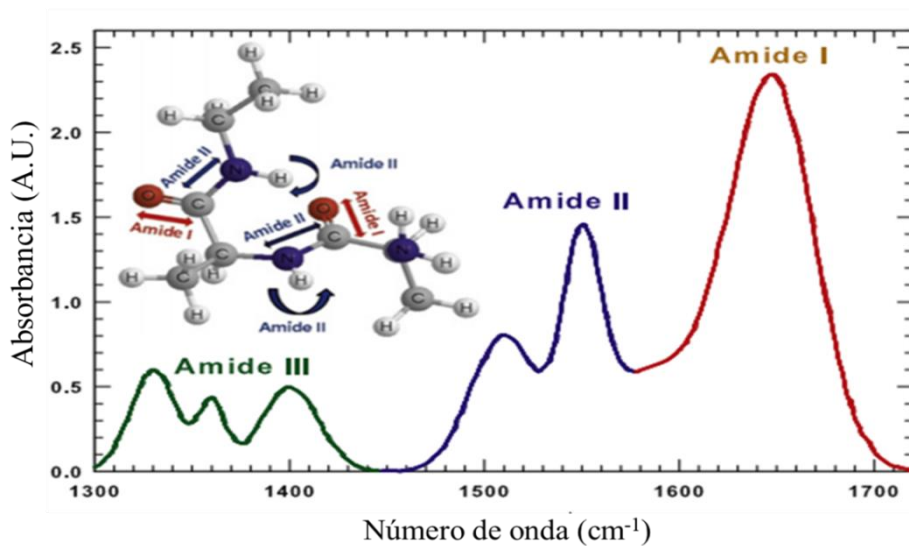


Figura 7.5. Diferentes contribuciones de amidas para la región de flexión IR en el intervalo de 1300 -1720  $\text{cm}^{-1}$ . Los modos vibracionales de la amida I y II son también ilustrados en un fragmento de un péptido (Mallamace et al., 2014).

---

Por lo tanto, se utilizó FTIR para explicar los cambios en la hidrofobicidad a nivel molecular, monitoreando las bandas de Amida I y Amida II cuando los coacervados insolubles fueron sometidos a tratamientos térmicos. La figura 7.6a muestra los espectros de IR normalizados de GA, WPC y SP<sub>T</sub>, que muestran dos regiones importantes: (1) banda de Amida I, detectable desde 1600 a 1700 cm<sup>-1</sup>, que es el 80% debido a un estiramiento del grupo carbonilo (C = O) (Sánchez et al., 2015). Un cambio en la banda de Amida I se asocia comúnmente con un cambio en la estructura secundaria de las proteínas. Esta banda se compone de muchas otras bandas debido a una superposición de diferentes elementos estructurales que podrían estudiarse por separado mediante una deconvolución máxima (Mallamace et al., 2015). (2) Banda de Amida II, detectable desde 1500 a 1550 cm<sup>-1</sup>, y se debe al estiramiento C-N junto con los modos de flexión N-H (Chanphai y Tajmir-Riahi, 2016). Esta banda presenta una menor sensibilidad con respecto a la conformación estructural de las proteínas. La banda de Amida I de WPC mostró un pico más estrecho y más alto que los mostrados por las SP<sub>T</sub>, y se detectó una disminución en la intensidad de las bandas de Amida I y Amida II a medida que el tratamiento térmico aumentaba de 60 a 120 °C. Este comportamiento se puede atribuir a interacciones moleculares entre GA y WPC que involucran los grupos C=O, C-N y N-H de las proteínas y alteraciones de la estructura secundaria de las proteínas (Chanphai y Tajmir-Riahi, 2016).

La figura 7.6b ilustra la deconvolución de la banda de Amida I con tres funciones gaussianas. Observe la ajustada aproximación del espectro FTIR, indicando que tres bandas gaussianas bastaron para describir la medida experimental. Las bandas gaussianas se ubicaron a ~1660-1662 cm<sup>-1</sup> ( $\alpha$ -hélice), ~1643-1642 cm<sup>-1</sup> (agregados aleatorios) y ~1621-1619 cm<sup>-1</sup> (láminas- $\beta$ ). El tamaño de los picos de las SP<sub>T</sub> cuantificados en términos de la



---

fracción de área relativa al área total se muestra en la figura 7.7 en función del tratamiento térmico. La transformación de la estructura secundaria se puede relacionar con la aparición de procesos de agregación de proteínas, en los que los agregados aleatorios y posibles  $\alpha$ -hélice se transforman en láminas- $\beta$  que tienden a autoagregarse (Mallamace et al., 2015). Este proceso de agregación implica la exposición del grupo sulfhídrico enterrado al disolvente al sufrir un tratamiento térmico (Klarenbeek, 1984). Nuestros conocimientos derivados de los resultados de FTIR indicaron que una modificación de la estructura secundaria podría reflejarse en la hidrofobicidad de las SP<sub>T</sub> debido a una exposición importante de los grupos sulfhídrico. Estos resultados concuerdan con los encontrados en las mediciones del ángulo de contacto, en la cuales las temperaturas más elevadas del tratamiento térmico producen un mayor valor de ángulo de contacto. Por lo tanto, las partículas SP<sub>120</sub> mostraron los cambios más notables en la banda de Amida I.

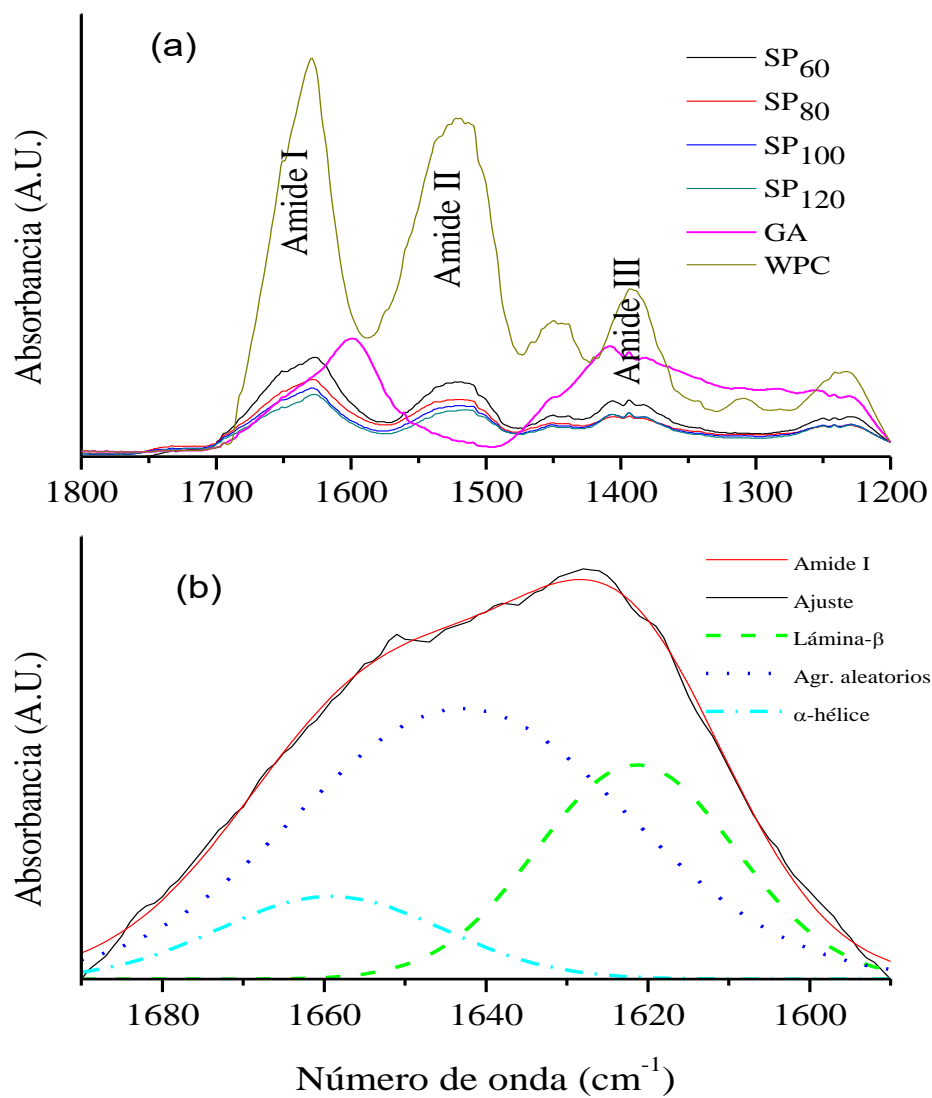


Figura 7.6. (a) Espectro de IR normalizados de GA, WPC y SP<sub>T</sub> que muestran la ubicación de las bandas de Amida I y Amida II. (b) Ejemplo de curva deconvolucionada en la banda de Amida I.

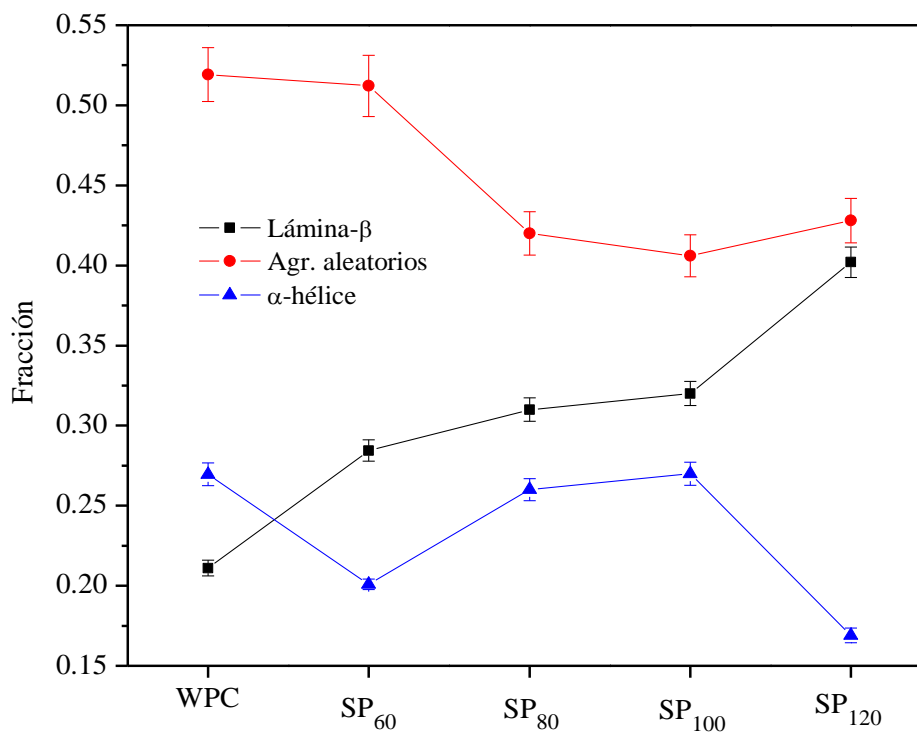


Figura 7.7. Variación de la estructura secundaria de WPC en función del tratamiento térmico de las partículas de coacervado insoluble SP<sub>T</sub>.

### 7.4.3. Hidrofobicidad superficial de partículas sólidas

La hidrofobicidad de las SP<sub>T</sub> es muy importante, ya que la estabilidad de las emulsiones Pickering está estrechamente relacionado. Para la obtención de una mejor caracterización sobre la hidrofobicidad de las SP<sub>T</sub>, se midió la adsorción del colorante hidrófobo RB sobre la hidrofobicidad de las SP<sub>T</sub>. Este método de particionamiento del rosa de bengala ha sido utilizado por otros para la caracterización de partículas hidrofóbicas. La pendiente de cada línea recta es un parámetro para la hidrofobicidad de la superficie: cuanto más pronunciada

---

es la pendiente, más hidrofóbica es la superficie (Müller et al., 1997; Xiao y Wiesner, 2012). Se utilizó un diámetro ( $d_{1,0}$ ) de  $0.7731 \pm 0.29 \mu\text{m}$  para  $\text{SP}_{60}$ ,  $0.7485 \pm 0.23 \mu\text{m}$  para  $\text{SP}_{80}$ ,  $0.7789 \pm 0.13 \mu\text{m}$  para  $\text{SP}_{100}$  y  $0.7450 \pm 0.34 \mu\text{m}$  para  $\text{SP}_{120}$ , para la determinación del área total superficial. Los resultados se muestran en la figura 7.8, lo que indica una mayor absorción de RB (valores de PQ más altos) a medida que aumenta el área de superficie total de las  $\text{SP}_T$ . Este comportamiento es presentado por materiales hidrofóbicos, mostrando pendientes positivas, cuyo valor es mayor a medida que la hidrofobicidad es mayor. Por lo tanto las  $\text{SP}_{120}$  fueron las que presentaron mayor hidrofobicidad teniendo la mayor pendiente, seguida de  $\text{SP}_{100}$ ,  $\text{SP}_{80}$  y  $\text{SP}_{60}$ . La pendiente aumentó a medida que la absorción del colorante fue mayor en las partículas hidrofóbicas, indicando una mayor exposición de residuos de aminoácidos no polares debido a cambios en la estructura de la proteína. La unión del colorante hidrofóbico sobre la superficie de las partículas indican que estas áreas están disponibles para otras posibles reacciones (Uruakpa y Arnfield, 2006). Kato et al., 1981, revelan que algunas de las proteínas aumentan su hidrofobicidad superficial a medida que aumenta su desnaturalización, debido a la exposición de residuos localizados en el interior de las proteínas y que son expuestos, este comportamiento es observado en las  $\text{SP}_T$ , a mayor tratamiento térmico utilizado, mayor exposición de sitios hidrofóbicos y mayor hidrofobicidad de  $\text{SP}_T$ . Hong y McClementes, (2007), indican que con el calentamiento de las proteínas de suero de leche mayor a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  ocurre un desdoblamiento irreversible (desnaturalización térmica) de las proteínas globulares, ya que esto conduce un fuerte incremento en atracciones hidrofóbicas entre las moléculas, aumentando la hidrofobicidad de la superficie de la proteína. La presencia de parches hidrófobos en la superficie de la

proteína pueden ayudar en su capacidad de adsorberse en una interfase de aceite-agua para lograr estabilizar una emulsiones agua-en-aceite (Uruakpa y Arnfield, 2006).

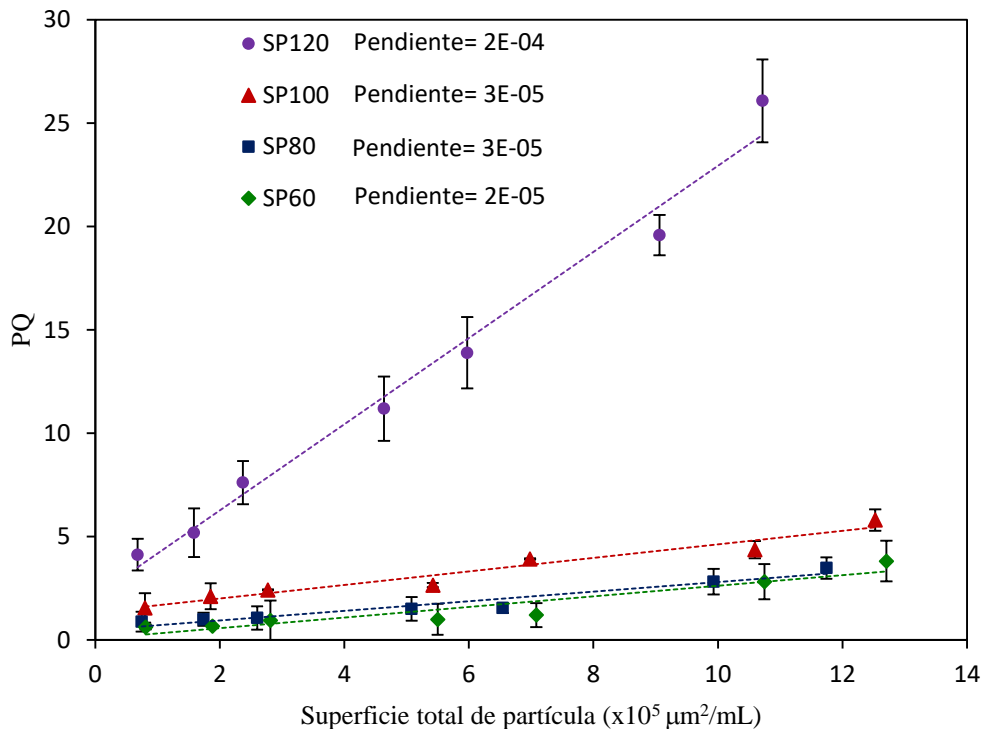


Figura 7.8. Grafica del coeficiente de partición (PQ) del colorante rosa de bengala al aumentar el área superficial de las  $\text{SP}_T$ .

## 7.5. Actividad superficial de las $\text{SP}_T$

### 7.5.1. Tensión interfacial (IFT)

La medición de tensión interfacial (IFT) proporcionan una comprensión cuantitativa de como las partículas se difunden y adsorben en las interfases (Kurukji et al., 2013). Con el fin de comprender el mecanismo de estabilización de las emulsiones, se ha investigado la

---

tensión interfacial de las partículas obtenidas del coacervado. El agua y el aceite no se mezclan y la tensión interfacial entre las dos fases es alrededor de  $50 \pm 5$  mN/m, en orden de hacer compatible el agua y el aceite es necesario agregar agentes emulsificantes los cuales van a disminuir la tensión interfacial, y lo más importante, es que van a crear una barrera energética entre las gotas, la cual va a prevenir la coalescencia de las mismas. En todos los casos las partículas sólidas se adsorben en la interfase entre el agua y el aceite (generalmente pero no necesariamente disminuyen la tensión interfacial) y proveen una barrera electrostática o estérica entre las gotas lo cual previene la coalescencia (Stamkulov et al., 2009).

Por lo tanto, se realizaron mediciones de IFT para obtener comprensión de estos fenómenos para las SP<sub>T</sub>. En la figura 7.9 puede observarse una disminución drástica en el IFT con la inclusión de SP<sub>T</sub>, indicando la existencia de un buen efecto de sinergia asociado con la adición de SP<sub>T</sub> en la interfase, lo cual va a asegurar la formación de una emulsión Pickering (Sharma et al., 2015). De igual manera, se presenta una disminución de IFT dependiendo de la temperatura de secado utilizada para la obtención de SP<sub>T</sub> ( $SP_{120} < SP_{100} < SP_{80} < SP_{60}$ ), esto se puede atribuir al cambio en la mojabilidad/hidrofobicidad de la partícula, haciendo que los agregados de mayor mojabilidad/hidrofobicidad promueven mejor su adsorción interfacial (Sharma et al., 2014). A medida que se presenta un cambio o aumento en la hidrofobicidad las partículas tienden a adsorberse con mayor facilidad en la interfase. Este comportamiento es característico de sustancias que son sólo parcialmente solubles en el disolvente como es el caso de las SP<sub>T</sub>. Después de una disminución rápida inicial, la IFT continúa evolucionando ligeramente durante largos periodos de tiempo, posiblemente debido a reordenamientos muy lentos en las capas superficiales, también podría ser debido a una

adsorción lenta de las partículas, para una vez alcanzada la saturación, permaneciendo relativamente constante (Maestro et al., 2014). Sin embargo, la amplitud de este largo tiempo de disminución es menor que la reproducibilidad de las mediciones ( $\pm 1 \text{ mN/m}$ ) y no afecta a la determinación de la tensión interfacial en tiempos largos, alcanzando un valor meseta, lo cual sugiere que las partículas en este momento están ya reorganizadas en la superficie y en forma concomitante una mejor superficie de embalaje (Tzoumaki et al., 2011; Maestro et al., 2014).

La diferencia en la medición del IFT también podría ser atribuida a la presencia de moléculas de superficie activa o a la presencia de complejos hidrosolubles de superficie activa que pudieron permanecer aún después del proceso de separación en la obtención del coacervado (Tzoumaki et al., 2011). Tsabet y Fradette, 2015, atribuyen la disminución de la tensión interfacial al reordenamiento de las partículas al ser absorbidas en la interfase agua-aceite.

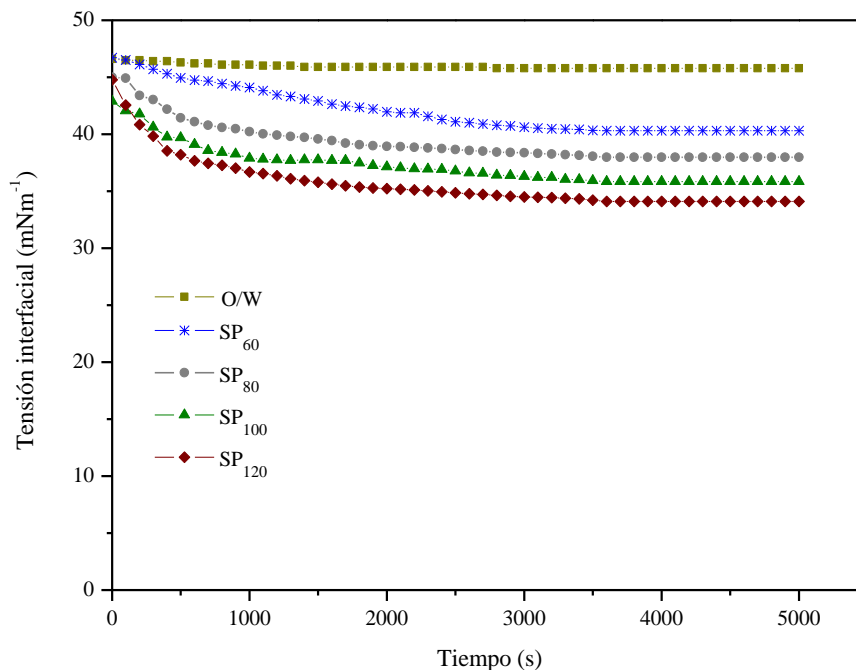


Figura 7.9. Medición de tensión interfacial de las partículas de coacervado insoluble (SP<sub>T</sub>) tratadas a diferentes temperaturas.

Algunos autores que han evaluado partículas de biopolímeros para la estabilización de emulsiones no han observado una disminución de la tensión interfacial por parte de sus partículas, mientras que otros si lo hicieron. Una posible explicación es que la disminución de la tensión interfacial o superficial en estos sistemas se debe a la adsorción de polímeros disueltos o material proteínico residual (Lam et al., 2014). De acuerdo a Yusoff et al., (2011), utilizaron partículas de almidón modificadas hidrofólicamente, y encontraron una reducción significativa en la tensión interfacial, ellos atribuyen esta disminución al hecho de que las moléculas del almidón contienen fragmentos o partes hidrofóbicas que actúan como emulsionantes primarios, este comportamiento puede estar manifestando las partículas de



coacervado por la presencia de grupos hidrofóbicos. Okubo et al., (2005), analizó con esferas de látex, la actividad interfacial, la cual era inusualmente alta para esferas de un tamaño de 100 a 200 nm y resultó en la reducción de la tensión interfacial en valores grandes de 20 mN/m en concentraciones de 10 y 20%.

### 7.5.2. Reología interfacial

Se realizaron pruebas interfaciales de fluencia para proporcionar información que permita elucidar la adsorción de las SP<sub>T</sub> en la interfase agua-aceite de las emulsiones Pickering. Todas las interfases formadas por las SP<sub>T</sub> mostraron curvas de fluencia de las películas que exhiben una respuesta viscoelástica (Pérez-Orozco et al., 2004). Se observó una disminución de  $J(t)$  en todas las películas formadas con respecto al tiempo de envejecimiento. Las curvas de fluencia interfaciales con un tiempo de envejecimiento de 2 h, en la figura 7.10 muestran una mayor fluencia en comparación con las curvas con tiempos de envejecimiento mayores (4 y 6 h), en los que el cambio de la fluencia causado por el mismo esfuerzo fue menor. Por otro lado cuando se retiró el esfuerzo, las películas de partículas formadas con un tiempo de envejecimiento de 2 h muestra una menor recuperación de la condición inicial, mientras que las películas de partículas con tiempos de envejecimiento de 4 y 6 h muestran una mayor recuperación. Esta recuperación puede estar relacionada con la acumulación de una película interfacial estructurada con las SP<sub>T</sub>, lo que resulta en una interfase más fuerte (Carrillo-Navas et al., 2013; Tarancón et al, 2014; Kpogbemabou et al., 2014). De estos resultados se infiere que, a medida que pasa el tiempo, se está produciendo un mecanismo de adsorción de las SP<sub>T</sub> en la interfase.

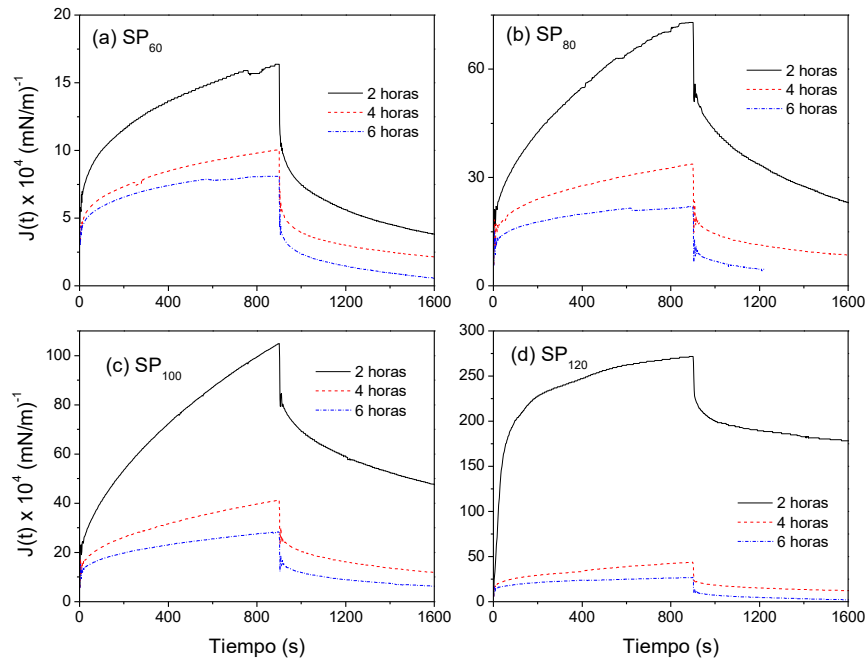


Figura 7.10. Comportamiento interfacial de fluencia capacitancia para las capas de adsorción de partículas sólidas WPC-GA en tres tiempos de envejecimiento para los cuatro tratamientos térmicos evaluados: SP<sub>60</sub> (a), SP<sub>80</sub> (b), SP<sub>100</sub> (c), and SP<sub>120</sub> (d).

### 7.6. Tamaño de gota de la emulsión O<sub>1</sub>/W

Para la obtención de una emulsión que fuera estable a través del tiempo, se realizaron emulsiones primarias con diferentes concentraciones de CS. Los diámetros de las emulsiones primarias recién preparados mostraron valores diferentes, dependiendo de la concentración de CS que fue emulsionado. En la figura 7.11, puede observarse que las emulsiones estabilizadas con concentraciones del 1 y 3 % presentaron un incremento en el tamaño de

---

gota con el transcurso del tiempo de almacenamiento, con un diámetro inicial de  $2.17 \pm 0.1 \mu\text{m}$  a  $4.74 \pm 0.23 \mu\text{m}$  transcurrido los 76 días para la emulsión  $O_1/W_{1\%}$  y  $1.27 \pm 0.07 \mu\text{m}$  a  $3.90 \pm 0.35 \mu\text{m}$  al día 76 para la emulsión  $O_1/W_{3\%}$ , lo cual indica que se presentó un incremento en el tamaño de gota de las emulsiones sin llegar a una separación de fases (Arranberri et al., 2006). En cambio la emulsión  $O_1/W_{5\%}$  recién preparada tuvo un  $d_{1,0}$  de  $0.62 \pm 0.17 \mu\text{m}$  que presentó un aumento ligero hasta aproximadamente  $0.66 \pm 0.12 \mu\text{m}$  durante los primeros 15 días de almacenamiento, después del cual el tamaño se mantuvo sin cambios significativos hasta el final de los 76 días de almacenamiento (Figura 7.11). Este resultado indica que el CS efectivamente emulsionó y estabilizó las gotas de aceite. Evans et al., (2013), investigaron que para los complejos proteína-polisacárido se consideren emulsionantes eficientes, el componente proteico necesita ser lo suficientemente grande e hidrófobo para permitir que el complejo se adsorba en la superficie de las gotas de aceite, mientras que el polisacárido debe estar por encima de un cierto tamaño crítico para formar una capa adsorbida que es capaz de prevenir la agregación de gotitas a través de fuerzas de repulsión estéricas. Hernández-Marín et al., (2013), estudiaron la estabilidad de emulsiones dobles por medio de complejos solubles formados por suero de leche y carboximetilcelulosa, encontrando una variación en el diámetro de las gotas de  $3.7$  a  $4.2 \mu\text{m}$ , el cambio en el tamaño de las gotas fueron significativos. Los resultados de este trabajo pueden ayudar a comprender mejor la influencia de la secuencia de adsorción de los biopolímeros en las interfases, la interacción del pH y la distribución de carga de los biopolímeros en la estabilidad y funcionalidad de las emulsiones dobles.

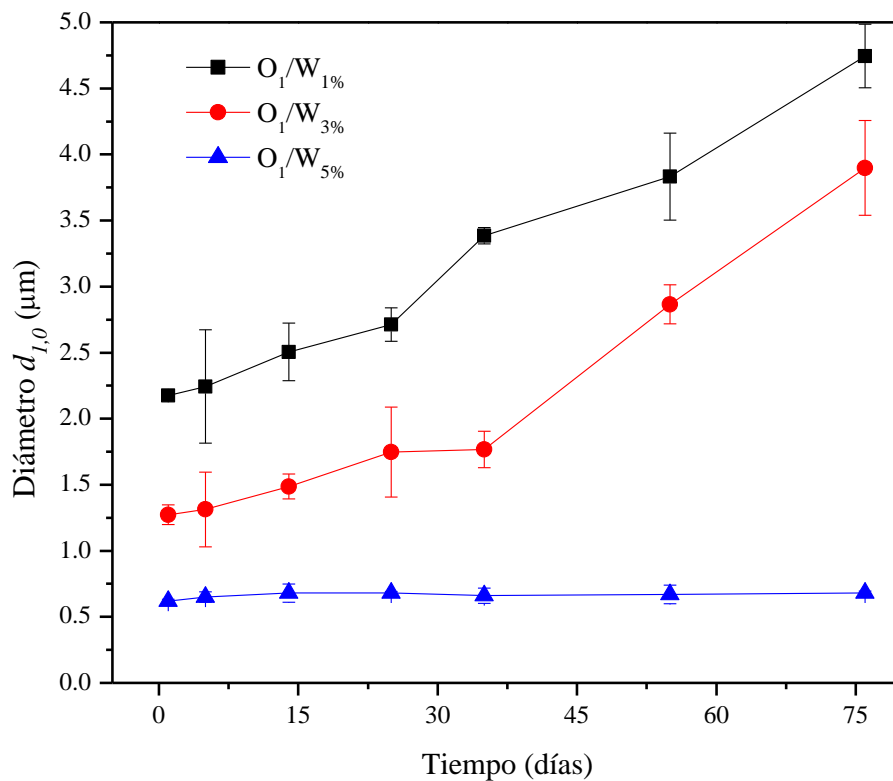


Figura 7.11. Cambio de diámetro  $d_{1,0}$  a través del tiempo de almacenamiento de las emulsiones primarias estabilizadas con el coacervado soluble.

### 7.7. Concentración de partículas de coacervado insoluble para la elaboración de emulsiones dobles Pickering

La concentración de partículas tiene un efecto profundo en la estabilidad de la emulsión Pickering contra la coalescencia y en el tamaño de la gota de la emulsión cubierta por las partículas (de Folter et al., 2012). Inicialmente, una serie de experimentos preliminares se realizaron para identificar la concentración óptima de partículas la cual da una emulsión

---

físicamente estable. Los cambios en el tamaño de gota de las emulsiones fueron establecidas a diferentes concentraciones (1, 3 y 5 % de partículas). El tamaño de distribución de la gota es amplio para las emulsiones realizadas con baja concentración de partículas (1 y 3 % de SP<sub>T</sub>), presentando una floculación de las gotas de las emulsiones y un aumento significativo en el tamaño de las gotas de las emulsiones en un periodo corto de tiempo (Cuadro 7.1). Sin embargo, no hubo cambio significativo cuando se utilizó concentraciones del 5 % de SP<sub>T</sub> durante el periodo de 25 días de la evaluación de la estabilidad, por lo tanto se seleccionó la concentración del 5% de SPT para la realización de las emulsiones dobles. Por lo, tanto un incremento en la concentración de partículas resulta en la disminución del tamaño de gota de la emulsión y un incremento en la estabilidad física de la emulsión (Song et al., 2015). A medida que la concentración de partículas incrementó, la estabilidad de la emulsión contra la coalescencia fue mejorada. Esto puede ser debido a la habilidad de las partículas para cubrir la superficie de las gotas a medida que la concentración de partículas es mayor y si así formar una red en la cual las gotas de la emulsión quedan atrapadas (Dickinson, 2012). Como consecuencia a medida que la adición de las partículas en el sistema se incrementa, la tasa de cobertura de las gotas de agua se incrementa, lo que mejora aún más la resistencia de las gotas de la emulsión a la agregación o a la coalescencia. Esto concuerda con los resultados previamente reportados por Frelichowski et al. (2009), donde mostraron que las gotas de emulsiones disminuyen de tamaño cuando se aumenta la concentración de partículas de sílice. Gould Joanne et al. (2013), utilizaron partículas de cocoa para estabilizar emulsiones O/W, utilizando una concentración de partículas del 8 al 10%, siendo estables y presentando un diámetro de 5  $\mu\text{m}$  después de haber transcurrido 13 días de haber formado la emulsión.

Cuadro 7.1. Evolución de diámetro de gota con respecto a la concentración de partículas de coacervado soluble.

Tiempo (días)	Diámetro de gota (µm)											
	PDE <sub>60,1</sub>	PDE <sub>60,3</sub>	PDE <sub>60,5</sub>	PDE <sub>80,1</sub>	PDE <sub>80,3</sub>	PDE <sub>80,5</sub>	PDE <sub>100,1</sub>	PDE <sub>100,3</sub>	PDE <sub>100,5</sub>	PDE <sub>120,1</sub>	PDE <sub>120,3</sub>	PDE <sub>120,5</sub>
0	13.21 ± 0.67	11.54 ± 1.89	9.34 ± 0.01	12.32 ± 1.12	15.56 ± 2.13	8.29 ± 0.08	10.98 ± 1.68	9.98 ± 2.45	7.09 ± 0.06	9.12 ± 3.21	8.73 ± 2.76	4.34 ± 0.01
1	16.71 ± 1.21	14.78 ± 3.12	10.01 ± 0.03	19.64 ± 2.13	23.38 ± 1.81	8.76 ± 0.19	21.87 ± 3.21	19.76 ± 1.98	7.54 ± 0.05	21.6 ± 1.87	19.65 ± 1.14	4.36 ± 0.03
4	41.45 ± 2.13	38.92 ± 2.19	10.09 ± 0.06	54.06 ± 2.31	39.70 ± 3.12	9.07 ± 0.09	45.43 ± 2.78	35.76 ± 3.76	7.74 ± 0.09	39.7 ± 2.56	33.78 ± 2.65	4.66 ± 0.07
8	-	-	10.34 ± 0.16	-	-	9.56 ± 0.05	-	-	7.98 ± 0.07	-	-	4.73 ± 0.02
12	-	-	10.52 ± 0.08	-	-	9.95 ± 0.06	-	-	8.21 ± 0.15	-	-	5.11 ± 0.05
15	-	-	10.63 ± 0.03	-	-	9.76 ± 0.06	-	-	8.51 ± 0.09	-	-	5.42 ± 0.07
20	-	-	10.87 ± 0.01	-	-	9.23 ± 0.12	-	-	8.23 ± 0.08	-	-	4.89 ± 0.08
25	-	-	10.99 ± 0.21	-	-	9.03 ± 0.09	-	-	7.99 ± 0.13	-	-	4.65 ± 0.12

Yusoff y Murray (2011), realizaron emulsiones del tipo O/W estabilizadas por partículas de almidón modificado hidrofólicamente, las partículas de almidón se lograron a partir de gránulos químicamente reticulados que no se hinchan en contacto prolongado con el agua y que se realizaron parcialmente hidrófoba por reacción con anhídrido octenil succínico. Las gotas de la emulsión producidas utilizando del 1 al 3% de almidón iban de 1 a 20 µm en diámetro. Rousseau (2013), utilizó nanocristales de quitina (partículas coloidales en forma de varilla) para estabilizar emulsiones aceite en agua (O/W). La quitina se preparó por hidrólisis ácida de la quitina en bruto a partir de conchas de cangrejo, las emulsiones aceite en agua fueron generadas a partir de homogenización de una dispersión acuosa de nanocristales de quitina y aceite de maíz. El tamaño de la emulsión después de haber transcurrido 35 días fue aproximadamente 10 µm. Los resultados obtenidos en estas investigaciones nos muestran el tamaño de gotas de emulsiones primarias y no dobles, pero nos sirven como parámetro para comprar las gotas estabilizadas por partículas de coacervado

soluble, que son menores a las obtenidas por Yusoff y Murray (2011) y Rousseau (2013), con un diámetro medio ( $d_{1,0}$ ) de  $DPE_{60,5} = 10.99 \pm 0.21$ ;  $DPE_{80,5} = 9.03 \pm 0.09$ ;  $DPE_{100,5} = 7.99 \pm 0.13$  y  $DPE_{120,5} = 4.65 \pm 0.21 \mu\text{m}$  al haber transcurrido 25 días de almacenamiento, se ha encontrado que las partículas parcialmente hidrófobas son de hecho los mejores estabilizadores para sistemas dispersos, y que el aumento de la concentración de partículas produce gotas de emulsiones más pequeñas. Esto se debe a que un aumento en el número de partículas parcialmente hidrófobas en la dispersión da como resultado la capacidad de estabilizar un área interfacial más grande. Los sistemas de emulsiones estabilizados por partículas de biopolímeros tienen buena estabilidad a largo plazo contra la coalescencia y el engrosamiento como resultado de la barrera estérica proporcionada por las partículas adsorbidas (Lam et al., 2014).

Tan y col., (2014), utilizaron partículas de almidón modificadas hidrofóticamente, teniendo diámetros medios de  $59 \mu\text{m}$  a  $36 \mu\text{m}$ , con una concentración de partículas de 0.5 a 2 %, observado que a medida que se aumenta la concentración de partículas menor es el diámetro de la partícula y se ve reflejado en la estabilidad de las emulsiones, presentando tamaño de gota de las emulsiones mayores a lo encontrado para las emulsiones dobles , infiriendo que aunque se utilice una concentración mayor de  $SP_T$  (5 %) las emulsiones dobles presentan un tamaño de gota menor a lo reportado a las partículas de almidón.

## 7.8. Estabilidad en el almacenamiento de las emulsiones dobles Pickering

Los principios esenciales del concepto que define la estabilización Pickering es muy simple: las partículas dispersas se acumulan en la interfase de aceite y agua para formar una barrera (estérica) mecánica que protege las gotitas de la emulsión contra la coalescencia. El alcance de esta protección depende de la densidad de empaquetamiento de las partículas en la capa interfacial y, por lo difícil que es para eliminar las partículas adsorbidas en la interfaz. La barrera estérica es más eficaz para partículas adsorbidas que están preferentemente humectadas por la fase continua (Dickinson, 2012), por lo tanto la estabilidad de las emulsiones por partículas sólidas, está predominada por su hidrofobicidad (Pawar, 2011). Los factores claves que van a determinar la influencia de las partículas en la estabilización de una emulsión son: (1) la mojabilidad de las partículas en la interfase; (2) microestructura de la partícula y (3) la localización de las partículas en la fase dispersa o en la fase continua (Rosseau, 2000). Una combinación de estabilización por Pickering y por red se puede esperar en emulsiones que contienen una mezcla de partículas de superficie activa y no tensoactivos (Dickinson, 2012).

Después de haber seleccionado la concentración adecuada para la realización de las emulsiones dobles, se decidió prolongar el almacenamiento de las emulsiones realizadas con una concentración del 5% de  $SP_T$ . Como puede observarse en la figura 7.12, el tamaño de las gotas de las  $PDE_{T,X}$  va a depender de las  $SP_T$  utilizadas para su estabilización. Las  $PDE_{T,X}$  recién hechas exhibieron los siguientes valores de  $d_{1,0}$  yendo del mayor al menor:  $PDE_{60,5} = 9.34 \pm 0.41 \mu\text{m}$ ;  $PDE_{80,5} = 8.29 \pm 0.46 \mu\text{m}$ ;  $PDE_{100,5} = 7.09 \pm 0.52 \mu\text{m}$  y  $PDE_{120,5} = 4.35 \pm 0.29 \mu\text{m}$ . Estos resultados sugieren un efecto del tratamiento térmico sobre el tamaño de las



gotas en las emulsiones dobles Pickering, probablemente como resultado de las diferencias en hidrofobicidad encontradas en el presente trabajo para las  $SP_T$ , por lo tanto, cuanto mayor era la hidrofobicidad mostrada por las partículas  $SP_T$ , mayor era su afinidad hacia la fase oleosa, lo que facilita la formación de  $PDE_{T,X}$  con un tamaño de gota más pequeño, como es el caso de las  $SP_{120}$ , logrando la gota más pequeña de las emulsiones dobles Pickering. Por otro lado, el mayor tamaño de gota se encontró para las emulsiones estabilizadas por las  $SP_{60}$ . Estos tamaños relativamente grandes son típicos de las emulsiones Pickering estabilizadas con partículas (Timgren et al., 2011; Gould et al., 2013). Estos resultados están de acuerdo a los encontrados en la sección 7.5.1, con la disminución de la tensión interfacial causada por las  $SP_T$ . El tamaño de gota de las  $PDE_{T,X}$  disminuyó durante aproximadamente los primeros 25-35 días de almacenamiento. En el día 35, el tamaño medio de gota de las  $PDE_{T,X}$  fueron de la siguiente manera:  $PDE_{60,5} = 10.45 \pm 0.08 \mu\text{m}$ ;  $PDE_{80,5} = 8.99 \pm 0.06 \mu\text{m}$ ;  $PDE_{100,5} = 8.02 \pm 0.15 \mu\text{m}$  y  $PDE_{120,5} = 4.63 \pm 0.19 \mu\text{m}$  y estos tamaños medios de las gotas permanecieron prácticamente sin cambios hasta el final de los 76 días de almacenamiento. Se sabe que las emulsiones Pickering evolucionan hacia un equilibrio dinámico, y que el tamaño de la gota se ajusta al estado termodinámicamente estable (Kraft et al., 2010). Gardí et al., (1999) utilizaron cristales para la estabilización de emulsiones logrando obtener emulsiones de 6 a 18  $\mu\text{m}$ , con un tamaño de partícula de cristales de aprox. 1  $\mu\text{m}$ , la utilización de cristales más grandes podría no absorberse efectivamente en la interfase y flocular los cristales libres en la fase continua, con este tamaño podemos ver que las  $SP_T$  de coacervado podrán colocarse en la interfase agua/aceite. Wu et al. (2015), obtuvieron nanopartículas a partir de proteína de suero de leche por medios del entrecruzamiento de proteínas desnaturalizadas a una temperatura de 80 °C por 15 min con un diámetro

---

aproximado de 200-500 nm y con gotas de emulsiones de 1 a 3 mm. El tamaño obtenido para las partículas de coacervado de WPI-GA, son similares a lo reportado a partículas de gránulos de almidón, que van de 1.34 a 3.45  $\mu\text{m}$ , este tipo de partículas han sido ampliamente utilizadas para generar emulsiones Pickering aceite en agua grado alimentario (Timgren et al., 2011).

Según Tsabet y Fradette (2015), mencionaron que hay tres pasos involucrados en el mecanismo de adsorción de las partículas sólidas en las emulsiones Pickering: 1) la partícula se acerca y choca primero con la interfase fluido/fluido; 2) la partícula se adsorbe en una posición inicial; 3) la posición final de la partícula en la interfase es alcanzado después de un tiempo dado. En la figura 7.12 puede observarse un cambio en el  $d_{1,0}$  a través del tiempo de almacenamiento, al día 15 las emulsiones sufren un aumento de  $d_{1,0}$ , este comportamiento puede ser debido a que las partículas aún se encuentran en un periodo de acomodo, seguido de un proceso en el cual las  $\text{SP}_T$  van a ocupar su posición final.

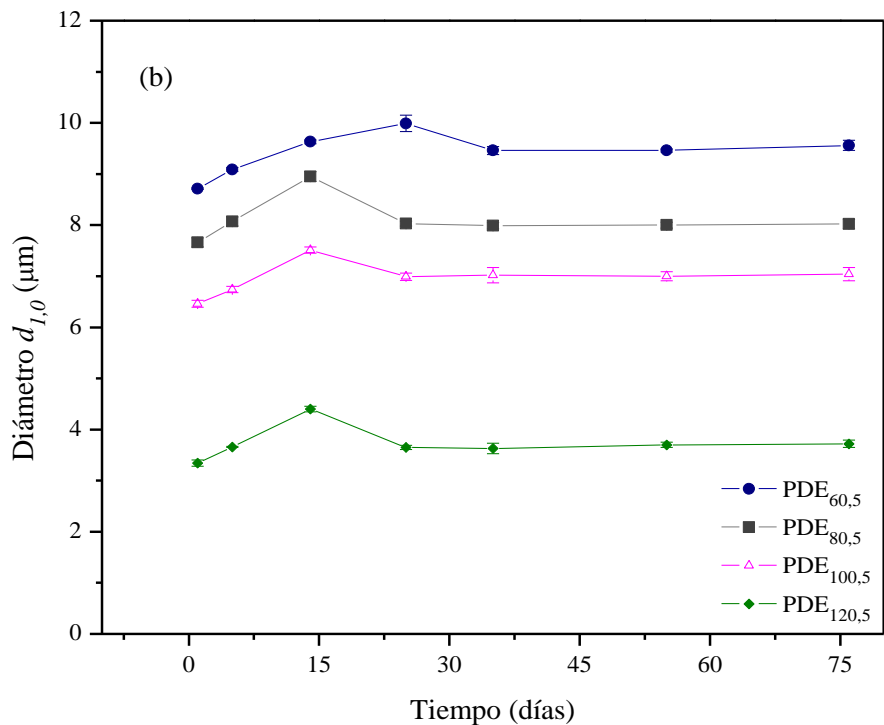


Figura 7.12. Evolución del diámetro medio de las emulsiones dobles  $O_1/W/O_2$  a lo largo del tiempo.

Los estabilizadores de partículas a base de proteína también se pueden formar por coprecipitación con polisacáridos. Aunque a menudo no se considera que estén en la clase de estabilizadores Pickering, los complejos proteína-polisacárido son un grupo de estabilizadores que se están explorando vigorosamente. El interés de utilizar complejos de proteína y polisacáridos como estabilizadores también se ve impulsado por el deseo de identificar materiales biodegradables, biocompatibles y sostenibles para su uso en sistemas de emulsiones. De acuerdo a Benichou et al., (2007), se han utilizado conjugados poliméricos de proteínas y polisacáridos para la estabilización de emulsiones dobles O/W/O. Estos conjugados forman nuevas estructuras en soluciones acuosas que tienen interacciones

específicas de carga hidrofóbica o molecular electrostática, estos estabilizaran las emulsiones actuando como barreras gruesas y eficientes contra la liberación del compuesto atrapado en el núcleo de las gotitas de la doble emulsión. Pero estabilizaron la emulsión primaria O/W.

### **7.9.Morfología de las PDE<sub>T,X</sub>**

Las micrografías ópticas (Figura 7.13a-d) corresponden a las PDE<sub>T,X</sub>. Todas las PDE<sub>T,X</sub> exhibieron una morfología de tipo C (Gartí, 1997), es decir, estaban formadas por gotitas de agua esféricas que contenían dentro de ellas un gran número de pequeñas gotas de aceite. Las micrografías ópticas permiten la observación de un borde oscuro y relativamente grueso alrededor de las gotas de agua, que a su vez están rodeadas por partículas sólidas orientadas hacia la fase continua de aceite. El diámetro de las PDE<sub>T,X</sub> disminuyó a medida que aumentaba el tratamiento térmico utilizado para la obtención de las SP<sub>T</sub>. Este comportamiento puede explicarse debido al efecto de la hidrofobicidad de las SP<sub>T</sub>. el tamaño de gota más pequeño fue para la emulsión PDE<sub>120,5</sub>, debiéndose presumiblemente a una hidrofobicidad relativamente alta de las SP<sub>120</sub>, lo cual les permitió adsorberse en el externo (convexo) de las gotas dispersas (Dickinson, 2010), siendo mojado preferencialmente por la fase continua de aceite y dando resultado tamaños de gota más pequeños. Así mismo también es evidente a partir de las micrografías ópticas, con PDE<sub>120,5</sub> (Figura 9d) al mostrar el tamaño medio más pequeño y muestra la distribución de tamaño más estrecha.

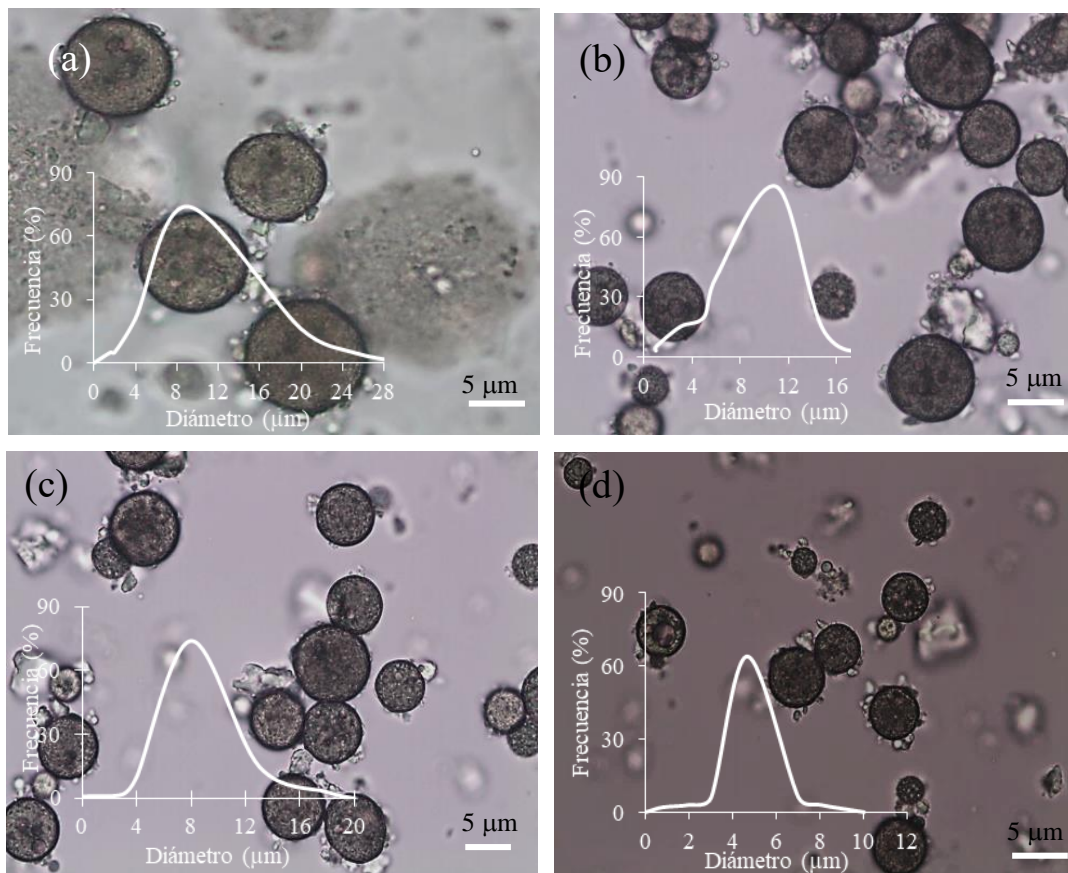


Figura 7.13. Morfología de las gotas de las emulsiones dobles Pickering, de acuerdo a la microscopía óptica para (a)  $SP_{60}$ , (b)  $SP_{80}$ , (c)  $SP_{100}$  y (d)  $SP_{120}$ .

La presencia de gotas de aceite internas dentro de las gotas de agua no puede apreciarse claramente, debido a las limitaciones de resolución de la microscopía óptica. Las figuras 7.14a-d muestran imágenes de microscopía de escaneo láser confocal (CLSM) utilizando isotiocianato de fluoresceína como agente de tinción. El tinte forma un complejo con grupos amina y sulfhídrido, que están presentes en proteínas tales como WPC. Por lo tanto, CS y  $SP_T$  fluorescen y se observan como estructuras verdes que estabilizan las emulsiones tanto interna como a la emulsión doble, respectivamente, mientras que la zona oscura observada es la fase oleosa. Se observan los CS alrededor de las gotitas internas de  $O_1$ , mientras que las  $SP_T$  se

ubican alrededor de las gotitas de agua de las  $PDE_{T,X}$  y también se dispersan a través de la mayor parte de la fase continua de aceite. Es interesante observar que un amplio rango de partículas de  $SP_T$  se adsorbieron en la interfase o se dispersaron en la mayor parte de la fase continua, y que el número de partículas adsorbidas en la interfase aumentó a medida que aumentaba la hidrofobicidad de las partículas. Un mayor número de partículas en la interfase y la formación de agregados en la fase continua, podrían promover la estabilidad de las  $PDE_{T,X}$ , ya que se produjo un ensamblaje de partículas más eficiente (Horozov y Binks, 2006; Yussoff y Murray, 2011).

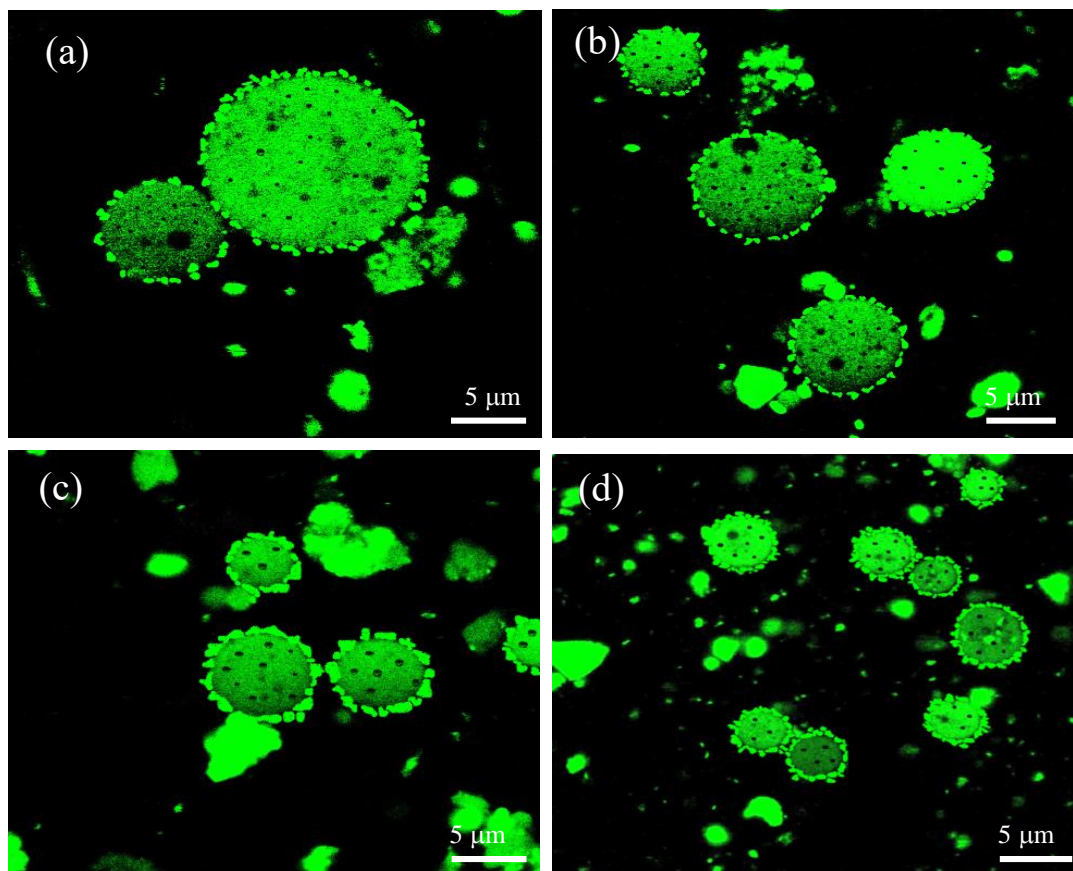


Figura 7.14. Microscopia confocal láser de barrido (CLSM) utilizando isotiocianato de fluoresceína como agente de tinción para (a)  $SP_{60}$ , (b)  $SP_{80}$ , (c)  $SP_{100}$  y (d)  $SP_{120}$ .

Según Dickinson (2012), para considerar una partícula como emulsionante/estabilizante de emulsiones Pickering, debe permanecer insoluble e intacta a lo largo de la vida útil del sistema de la emulsión. En la figura 7.15 pueden observarse las microscopías ópticas al final del tiempo de almacenamiento (día 76) para las  $PDE_{T,X}$ , donde puede observarse en la interfase externa de las  $PDE_{T,X}$  la presencia de las  $SP_T$  y de aquellas dispersos en la mayor parte de la fase oleosa preservando su integridad durante todo el período de almacenamiento y así poder ser consideradas las  $SP_T$  como buenos emulsionantes/estabilizantes.

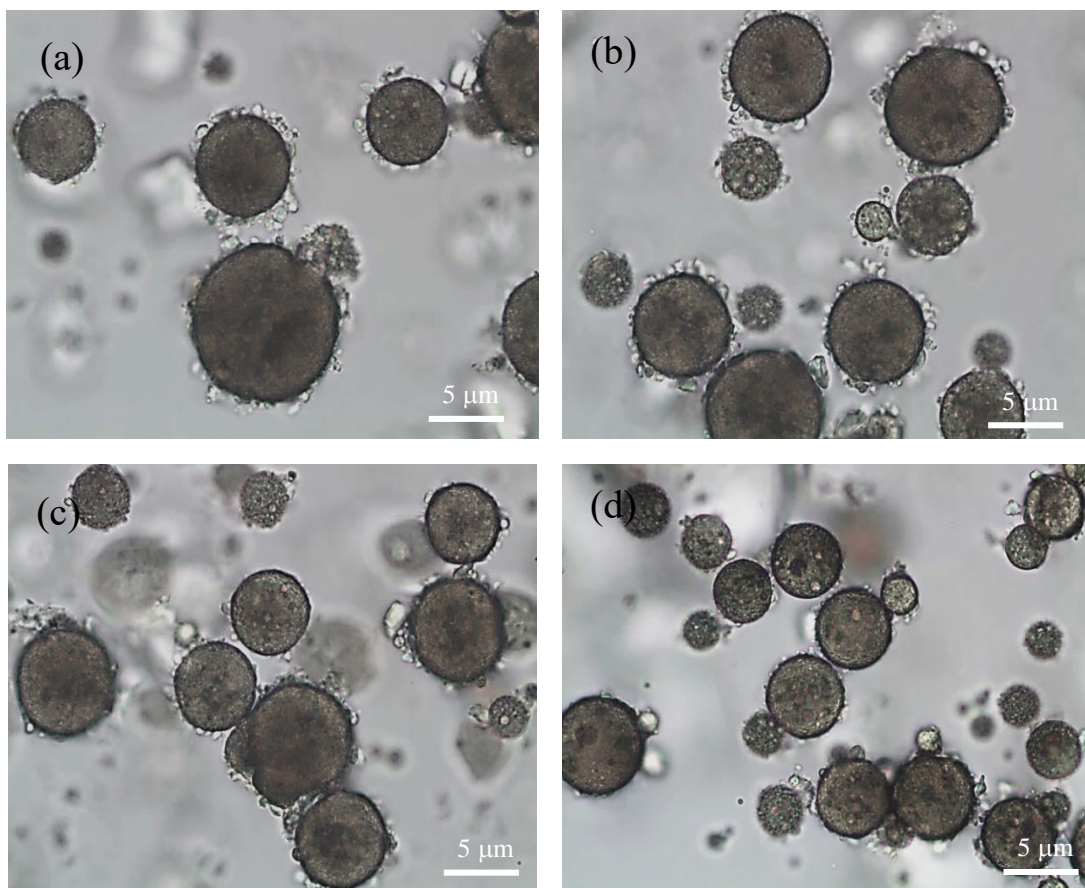


Figura 7.15. Microscopia óptica de; (a)  $DPE_{60,5}$ , (b)  $DPE_{80,5}$ , (c)  $DPE_{100,5}$  y (d)  $DPE_{120,5}$  al haber transcurrido 76 días de almacenamiento.

## 8. Conclusiones

En este trabajo se presenta una metodología simple para obtener complejos solubles e insolubles entre concentrado de proteína de suero y goma arábica. De esta forma, los complejos hidrofílicos solubles se obtuvieron a pH de 4,0 y 5% en peso de la concentración total de biopolímeros a una relación de concentrado de proteína de suero y goma arábica de 2:1 y se utilizaron para estabilizar la interfase interna de aceite en agua. Las partículas sólidas se fabricaron aplicando sonicación (8 min) a los complejos insolubles, que a su vez se obtuvieron a un pH de 4,0 y 5% en peso de la concentración total de biopolímeros en la proteína de suero de leche con una relación de concentrado de proteína de suero y goma arábica de 3:1 y fueron utilizadas para la estabilización de la interfase exterior de agua en aceite. Además, secando las partículas sólidas de complejos insolubles a diferentes tratamientos térmicos, su hidrofobicidad podría modularse y por lo tanto se tendría la producción de emulsiones dobles Pickering aceite-en-agua-en-aceite con diferentes tamaños medios de gotas que varían de  $10.45 \pm 0.08 \mu\text{m}$  a  $4.63 \pm 0.19 \mu\text{m}$ . Una mayor hidrofobicidad produjo tamaños de gotas medios más pequeños. El tamaño final de gota medio de las emulsiones primarias y doble sólo varió ligeramente después de 76 días de almacenamiento del mostrado por las emulsiones frescas, lo que indica que poseían estabilidad a largo plazo. Por lo tanto, el presente trabajo contribuye al conocimiento para obtener partículas sólidas de grado alimentario para estabilizar eficazmente emulsiones dobles Pickering.



## 9. Referencias

1. Abismaïl, B., Canselier, J.P., Wilhelm, A.M., Delmas, H., and Gourdon, C. (1999). Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. *Ultrasonics Sonochemistry*, 6, 75-83.
2. Alberini, F., Dapelo, D., Enjalbert, R., Crombrugge, Y.V., Simmons, M.J.H. (2017). Influence of DC electric field upon the production of oil-in-water-in-oil double emulsions in upwards mm-scale channels at low electric field strength. *Experimental Thermal and Fluid Science*, 81, 265-276.
3. Aranberri, I., Binks, B.P., Clint, J.H., Flercher, P.D.I. (2006). Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensoactivos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 7(3), 211-231.
4. Aryee, F.N.A., & Nicerson, M.T. (2012). Formation of electrostatic complexes involving mixtures of lentil protein isolates and gum Arabic polysaccharides. *Food Research International*, 48, 520-527.
5. Aveyard, R. Binks, B.P., Clint, J.H. (2003). Emulsions stabilized by colloidal particles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 100-102, 503-546.
6. Bai, L., Huanm S., Li, Z., McClements, D.J. (2016). Comparison of emulsifying properties of food-grade polysaccharides in oil-in-water emulsions: Gum Arabic, beet pectin, and corn fiber gum. *Food Hydrocolloids*, 10.1016/j.foodhyd.2016.12.019.
7. Bancroft, W.D. (1913). The Theory of Emulsification. *The Journal of Physical Chemistry*, 17, 501-519.
8. Bhatia, N., Pandit, S., Agrawal, S., & Gupta, D. (2013). A review on multiple emulsions. *International Journal of Pharmaceutical Erudition*, 3(2), 22-30.

9. Benichou, A., Aserin, A., & Garti, N. (2007). W/O/W double emulsions stabilized with WPI-polysaccharide complex. *Colloids and Surface A*, 294, 20-32.
10. Benichou, A., Aserin, A., & Garti, N. (2004). Double emulsions stabilized with hybrids natural polymers for entrapment and slow release of active matters. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108–109, 29–41
11. Bel Haaj, S., Magnin, A, Pétrier, C., & Boufi, S. (2013). Starch nanoparticles formation via high power ultrasonication. *Carbohydrate Polymers*, 92, 1625-1632. Cameron, D. G., & Moffatt, D. J. (1984). Deconvolution, derivation, and smoothing of spectra using Fourier transforms. *Journal of Testing and Evaluation*, 12(2), 78–86.
12. Binks, B. P., Boa, A. N., Kibble, M. A., Mackenzie, G., & Rocher, A. (2011). Sporopollenin capsules at fluid interfaces: particle stabilized emulsions and liquid marbles. *Soft Matter*, 7, 4017-4024.
13. Bouaouina, H., Desrumaux, A., Loisel, C., Legrand, J. (2006). Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment. *International Dairy Journal*, 16, 275-284.
14. Capitanni, C., Pérez, O.E., Pacheco, B., Teresa, M., Pilosof, A.M.R. (2007). Influence of complexing carboxymethylcellulose on the thermostability and gelation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 21, 1344-1354.
15. Carrillo-Navas, H., Fouconnier, B., Vernon-Carter, E.J., & Alvarez-Ramirez, J. (2013). Shear rheology of water/glycerol monostearate crystals in canola oil dispersions interfaces. *Colloids & Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 436, 215-224.

16. Chanphai, P., & Tajmir-Riahi, H.A. (2016). Trypsin and trypsin inhibitor bind PAMAM nanoparticles: Effect of hydrophobicity on protein-polymer conjugation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 461, 419-424.
17. Charoen, R., Jangchud, A., Jangchud, K., Harnsilawat, T., Naivikul, O., & McClements, D. J. (2011). Influence of Biopolymer Emulsifier Type on Formation and Stability of Rice Bran Oil- in- Water Emulsions: Whey Protein, Gum Arabic, and Modified Starch. *Journal of Food Science*, 76(1), 165-172
18. Chevalier, Y., Bolzinger, M.A. (2013). Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 439, 23-43.
19. Dardelle, G., Erni, P. (2014). Three-phase interactions and interfacial transport phenomena in coacervate/oil/water systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 206, 79-91.
20. Destribats Mathieu, Martine Rouvet, Cécile Gehin-Delval, Christophe Schmitt and Bernard P. Binks, (2014). Emulsions stabilized by whey protein microgel particles: towards food-grade Pickering emulsions. *Royal Society of Chemistry*, 10, 6941- 6954.
21. Dickinson, E. (2012). Use of nanoparticles and microparticles in the formation and stabilization of food emulsions. *Food Science and Technology*, 24, 4-12.
22. Dickinson, E. (2011). Mixed biopolymers at interfaces: Competitive adsorption and multilayer structures. *Food Hydrocolloids*, 25, 1966-1983.
23. Dickinson E. (2010). Double emulsions stabilized by food biopolymers. *Food Biophysics*, 6, 1-11.

24. Dickinson E. (2009). Hydrocolloids and Emulsion Stability, Chap. 2, in: Handbook of Hydrocolloids (Second Edition), Edited by G. O. Phillips and P. A. Williams, CRC Press.
25. Dickinson, E. (2008). Interfacial structure and stability of food emulsions as affected by protein–polysaccharide interactions. *Soft Matter*, 4, 932-942.
26. Dickinson, E. Golding, M. (1998). Influence of calcium ions on creaming and rheology of emulsions containing sodium caseinate. *Colloids and Surface A: physicochemical and Engineering Aspects*, 144, 167-177.
27. Eastoe, J. (2005). Surfactant Aggregation and Adsorption At interfaces, Chap. 4, in: Colloid Science: Principles, Methods and Applications, Editado por Terence Cosgrove, Blackwell Publishing Ltd.
28. Esfanjani, A.F., Jafari, S.M., Assadpour, E., & Mohammadi, A. (2015). Nano-encapsulation of saffron extract through double-layered multiple emulsions of pectin and whey protein concentrate. *Journal of Food Engineering*, 165, 149-155.
29. Esfanjani, A.F. Jafari, S.M., & Assadpour, E. (2017). Preparation of multiple emulsion based on pectin-whey protein complex for encapsulation of saffron extract nanodroplets. *Food Chemistry*, 221, 1962-1969.
30. Espinosa-Andrews, H., Enríquez-Ramírez, K.E., García-Márquez, E., Ramírez-Santiago, C., Lobato-Calleros, C., & Vernon-Carter, E.J. (2013). Interrelationship between the zeta potential and viscoelastic properties in coacervates complexes. *Carbohydrate Polymers*, 95, 161-166.

31. Evans, M., Ratcliffe, I., & Williams, P. A. (2013). Emulsion stabilization using protein-polysaccharide complexes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 18, 272-282.
32. Feng Yiming, Youngsoo Lee. (2015). Surface modification of zein colloidal particles with sodium caseinate to stabilize oil-in-water pickering emulsion. *Food Hydrocolloids*, 10.1016/j.foodhyd.2015.12.030
33. De Folter Julius W.J de, Marjolein W.M. van Rujiven, and Krassimir P. Velikov. (2012). Oil-in-water Pickering emulsions stabilized by colloidal particles from the water-insoluble protein zein. *Soft Matter*, 8, 6807 – 6815.
34. Frelichowska, J., Bolzinger, M.A., Chevalier, Yves. (2009). Pickering emulsions with bare silica. *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 343, 70-74.
35. Garti, N. (1997). Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food applications. *LWT – Food Science and Technology* 30, 222– 235.
36. Ghasemi, S., Jafari, S.M., Assadpour, E., & Khomeiri, M. (2017). Production of pectin-whey protein nano-complex as carriers of orange peel oil. *Carbohydrate Polymers*, 177, 369-377.
37. Ghosh, A.K., Bandyopadhyay, P. (2012). Polysaccharide-Protein Interactions and Their Relevance in Food Colloids. *The Complex World of Polysaccharides*. Chapter 14. <http://dx.doi.org/10.5772/50561>.
38. Gonzenbach, T., Studart, A.R., Tervoort, E., Gauckler, L. (2006). Ultrastable particle-stabilized foams. *Angewandte Chemie Int*, 45, 3526-3530.

39. Gould, J., Vieira, J., & Wolf, B. (2013). Cocoa particles for food emulsions stabilization. *Food and Function*, 4, 1369-1375.
40. Gulão, E. da S., de Souza, C.J.F., Andrade, C.T., & Garcia-Rojas, E.E. (2016). Complex coacervates obtained from peptide leucine and gum arabic: Formation and characterization. *Food Chemistry*, 194, 680-686.
41. Hernández-Marín, N. Y., Lobato-Calleros, C., & Vernon-Carter, E.J. (2013). Stability and rheology of water-in-oil-in-water multiple emulsions made with protein-polysaccharide soluble complexes. *Journal of Food Engineering* 119, 181-187.
42. Hernández-Rodríguez, L., Lobato-Calleros, C., Ramírez-Santiago, C., Rodríguez-Huezo, M.E., & Meraz, M. (2017). Microstructure and rheology of yogurt added with protein-*L.platarum*-polysaccharide coacervate and stevia in substitution of milk-fat and sucrose. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 1, 77-89.
43. Hong, Y.H., McClements, D.J. (2007). Formation of Hydrogel Particles by Thermal Treatment of  $\beta$ -Lactoglobulin-Chitosan Complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5653-5660.
44. Horozov, T.S., & Binks, B.P. (2006). Particle-stabilized emulsions: A bilayer or a bridging monolayer? *Angewandte Chemie International*, 45, 773-776.
45. Hunter, T.N., Pugh, R.J., Franks, G.V., Jameson, G.J. (2008). The role of particles in stabilizing foams and emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 137, 57-81.
46. Jiménez-Alvarado, R., Beristain, C.I., Medina-Torres, L., Román-Guerrero, A., & Vernon-Carter, E.J. (2009). Ferrous bisglycinate content and release in  $W_1/O/W_2$  multiple emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes. *Food Hydrocolloids*, 23, 2425-2433.

47. Jiménez-Colmenero, F. (2013). Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. *Food Research International*, 52, 64-74.
48. Jovanović, S., Barać, M., Maćej, O. (2005). Whey proteins-properties and Possibility of Application. *Mljekarstvo*, 55 (3) 215-233
49. Kabalnov, A.S., Shchukin, E.D. (1992). Ostwald ripening theory: applications to fluorocarbon emulsion stability. *Advances in Colloid and Interface Science*, 38, 69 - 97.
50. Kato, Y., Watanabe, K., Sato, Y. (1981). Effect of Maillard reaction on some physical properties of ovalbumin. *Journal of Food Science*, 6 (46), 1835- 1839.
51. Kralova, I., & Sjöblom, J. (2009). Surfactants used in food industry: a review. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 30(9), 1363-1383.
52. Klarenbeek, G. (1984). Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 67, 2701-2710.
53. Klein, M., Aserin, A., Ishai, P. B., & Garti, N. (2010). Interactions between whey protein isolate and gum Arabic. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79(2), 377-383.
54. Kpogbemabou, D., Lecomte-Nana, G., Aimable, A., Bienia, M., Niknam, V., Carrion, C. (2014). Oil-in-water Pickering emulsions stabilized by phyllosilicates at high solid content. *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 463, 85-92.
55. Kraft, D.J., Luigjes, B., de Folter, J.W.J., Philipse, A.P., & Kegel, W.K. (2010). Evolution of equilibrium pickering emulsion—a matter of time scales. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114, 12257-12263.

56. Kurukji, D., Pichot, R., Spyropoulos, F., & Norton, I. T. (2013). Interfacial behavior of sodium stearylactylate (SSL) as an oil-in-water Pickering emulsion stabilizer. *Journal of Colloid and Interface Science*, 409, 88–97.
57. Lam, S., Velikov, K.P., Velev, O.D. (2014). Pickering stabilization of foams and emulsions with particles of biological origin. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 19, 490-500.
58. Lee, M.N., Chan, H.K., Moharaz, A. (2011). Characteristics of Pickering Emulsion Gels Formed by Droplet Bridging, *Langmuir*, 28, 3085-3091.
59. Li, J.L., Zhu, Y., Teng, C., Xiong, K., Yang, R., & Li, X. (2017). The effects of biomacromolecules on the physical stability of W/O/W emulsions. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 54 (2), 469-480.
60. Liu, S., Cao, Y. L., Ghosh, S., Rousseau, D., Low, N. H., & Nickerson, M. T. (2010). Intermolecular interactions during complex coacervation of pea protein isolate and gum Arabic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 552-556.
61. Liu, J., Shim, Y.Y., Shen, J., Wang, Y., & Reaney, M.J.T. (2017). Whey protein isolate and flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) gum electrostatic coacervate; Turbidity and rheology. *Food Hydrocolloids*, 64, 18-27.
62. Lobato-Calleros, C., Rodriguez, E., Sandoval-Castilla, O., Vernon-Carter, E.J., & Alvarez-Ramirez, J. (2006). Reduced-fat white fresh cheese-like products obtained from W<sub>1</sub>/O/W<sub>2</sub> multiple emulsions: Viscoelastic and high-resolution image analyses. *Food Research International*, 39, 678-685.



63. Maestro, A., Rio, E., Drenckhan, W., Langevin, D., & Salonen, A. (2014). Foams stabilized by mixtures of nanoparticles and oppositely charged surfactants: relationship between bubble shrinkage and foam coarsening. *Soft Matter*, 10, 975–6983.
64. Mallamace, F., Corsaro, C., Mallamace, D., Vasi, D., Vasi, C., & Dugo, D. (2015). The role of water in protein's behavior: The two dynamical crossovers studied by NMR and FTIR techniques. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 13, 33 – 37.
65. Malvern (2014). Polydispersity – what does it mean for DLS and chromatography? <http://www.materials-talks.com/blog/2014/10/23/polydispersity-what-does-it-mean-for-dls-and-chromatography/>.
66. Mehrnia, M.A., Jafari, S.M., & Makhmal-Zadeh, B.S. (2017). Rheological and release properties of double nano-emulsions containing crocin prepared with Angum gum, Arabic gum and whey protein. *Food Hydrocolloids*, 55, 259-267.
67. Milanovic', J., Petrovic', L., Sovilj, V., Katona, J. (2014). Complex coacervation in gelatin/sodium caseinate mixtures. *Food Hyhrocolloids*, 37, 1-7.
68. Mohammad, K., & Kavehpour, H.P. (2015). Dynamics of spreading on ultra-hydrophobic surface. *Journal of Coatings Technology and Research*, 5, 959-964.
69. Mohammadi, A., Jafari, S.M., Assadpour, E., & Esfanjani, A.F. (2016). Nano-encapsulation of olive leaf phenolic compounds through WPC-pectin complexes and evaluating their release rate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 816-822.
70. Müller, R.H., Rühl, D., Lück, M., & Paulke B.R. (1997). Influence of fluorescent labelling of polystyrene particles on phagocytic uptake, surface hydrophobicity, and plasma protein adsorption. *Pharmaceutical Research*, 14, 18-24.

71. McClements, D.J. (2009). Biopolymers in Food Emulsions. Department of Food Science, University of Massachusetts, Amherst, Massachusetts, USA. Chapter 4, ISBN: 978-0-12-374195-0
72. McClements, D.J., Weiss, J. (2005). Lipid Emulsions. Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Sixth Edition, Six Volume Set. Edited by Fereidoon Shahidi. Copyright # 2005 John Wiley & Sons, Inc.
73. McClements, D.J. (1999). Food Emulsions. Principles, Practice and Techniques. CRC Press.
74. Muschiolik, G. (2007). Multiple emulsions for food use. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 12, 213–220.
75. Murray Brent S., Kalpana Durga, Anida Yusoff, Simeon D. Stoyanov. (2011). Stabilization of foams and emulsions by mixtures of surface active food-grade particles and proteins. *Food Hydrocolloids*, 25, 627 – 638.
76. Ozturk, B., & McClements, D. J. (2016). Progress in natural emulsifiers for utilization in food emulsions. *Current Opinion in Food Science*, 7, 1-6.
77. Pawar Amar B., Marco Caggioni, Roja Ergun, Richard W. Hartelb and Patrick T. Spicer. (2011). Arrested coalescence in Pickering emulsions. *Soft Matter*, 7, 7710-7716.
78. Pérez-Orozco, J.P., Beristain, C.I., Espinosa-Paredes, G., Lobato-Calleros, C., & Vernon-Carter, E.J. (2004). Interfacial shear rheology of interacting carbohydrate polyelectrolytes at the water-oil interface using an adapted conventional rheometer. *Carbohydrate Polymers*, 57, 45-54.
79. Pimentel-González, D.J., Campos-Montiel, R.G., Lobato-Calleros, C., Pedroza-Islas, R., & Vernon-Carter, E.J. (2009). Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double

- emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 42, 292-297.
80. Ramírez-Santiago, C., Lobato-Calleros, C., Espinosa-Andrews, H., & Vernon-Carter, E.J. (2012). Viscoelastic properties and overall sensory acceptability of reduced-fat Petit-Suisse cheese made by replacing milk fat with complex coacervate. *Dairy Science and Technology*, 92, 383-398.
81. Ridel, L., Bolzinger M.A., Gilon-Delepine, N., Dugas, P.Y., & Chevalier, Y. (2016). Pickering emulsions stabilized by charged nanoparticles. *Soft Matter*, 12, 7564-7576.
82. 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.
83. Rousseau, D. (2000). Fat crystal and emulsion stability – a review. *Food Research International*, 33, 3-14.
84. Rousseau, D. (2013). Trends in structuring edible emulsions with Pickering fat crystals. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 18, 283-291.
85. Sánchez, M., Sciré, A., Tanfani, F., & Ausili, A. (2015). The thermal unfolding of the ribosome-inactivating protein saporin-S6 characterized by infrared spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1854, 1357-1364.
86. Schmidt, U.S., Bernewitz, R., Guthausen, G. & Schuchmann, H.P. (2015). Investigation and application of measurement techniques for the determination of the encapsulation efficiency of O/W/O multiple emulsions stabilized by hydrocolloid gelation. *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 475, 55-61.

87. Schmidts, T., Dobler, D., Nissing, C. & Runkel, F. (2009). Influence of hydrophilic surfactants on the properties of multiple W/O/W emulsions. *Journal of Colloids and Interface Science*, 338, 184-192.
88. Schmitt, V., Destribats, M., Backov, R. (2014). Colloidal particles as liquid dispersion stabilizer: Pickering emulsions and material thereof. *Comptes Rendus Physique*, 15, 761-774.
89. Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S., Hardy, J. (1998). Polyphenol interactions with whey protein isolate and whey protein isolate-pectin coacervates. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38 (8), 689-753.
90. Sharma, T., Kumar, G. S., Chon, B. H., & Sangwai, J. S. (2015). Thermal stability of oil-in-water Pickering emulsion in the presence of nanoparticle, surfactant, and polymer. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 22, 324-334.
91. Sivapriya, S., Daisy, P.A., Bobby, J.G., Praveen Raj, R., Noby Thomas, & Betty Carla. (2016). Multiple emulsions a comprehensive review. *World Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 2(5), 83-88.
92. Song Xiaoyan, Yaqiong Pei, Mingwu Qiao, Fenglian Ma, Hongtao Ren. (2015). Preparation and characterization of Pickering emulsions stabilized by hydrophobic starch particles. *Food Hydrocolloids*, 45, 256 – 263.
93. Stamkulov, N.Sh., Mussabekov, K.B., Aidarova, S.B., Luckham, P.F. (2009). Stabilisation of emulsions by using a combination of an oil soluble ionic surfactant and water soluble polyelectrolytes. I: Emulsion stabilisation and Interfacial tension measurements. *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 335, 103-106.

94. Tan, Y., Niu, C., Lui, C., Li, Y., Wang, P. (2014). Triglyceride/water emulsions stabilised by starch-based nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 36, 70-75
95. Tavernier, I., Wijaya, W., Van der Meeren, P., Dewettinck, K., & Patel, A.R. (2016). Food-grade particles for emulsion stabilization. *Trends in Food Science & Technology*, 50, 159-174.
96. Taylor, P. (1995). Ostwald ripening in emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 99, 175-185.
97. Tcholakova, S., Denkov, N.D., Ivanov, I.B., Campbell, B. (2006). Coalescence stability of emulsions containing globular milk proteins. *Advances in Colloid and Interface Science*, 123-126, 259-293.
98. Thongkaew, C., Gibis, M., Hinrichs, J., Wiess, J. (2014). Polyphenol interactions with whey protein isolate and whey protein isolate-pectin coacervates. *Food Hydrocolloids*, 41, 103-112.
99. Timilsena, Y.P., Wang, B., Adhijari, R., & Adhikari, B. (2016). Preparation and characterization of chia seed protein isolate-chia seed gum complex coacervates. *Food Hydrocolloids*, 52, 554-563.
100. Timgren, A., Rayner, M., Sjöö, M., & Dejmeek, P. (2011). Starch particles for food based Pickering emulsions. *Procedia Food Science*, 1, 95-103.
101. Tsabet, E., & Fradette, L. (2015). Effect of the properties of oil, particles, and water on the production of Pickering emulsions. *Chemical Engineering Research and Design*, 97, 9-17.
102. Tyowua, A.T., Yiase, S.G., & Binks, B.P. (2017). Double oil-in-oil-in-oil emulsions stabilized solely by particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 488, 127-134.

103. Tzoumaki, M.V., Moschakis, T., Kiosseoglou, V., Biliaderis, C.G. (2011). Oil-in-water emulsions stabilized by chitin nanocrystal particles. *Food Hydrocolloids*, 25, 1521-1529.
104. Uruakpa F.O., Arntfiel. (2006). Surface hydrophobicity of commercial canola proteins mixed with k-carrageenan or guar gum. *Food Chemistry*, 95, 255 – 263.
105. Ven, C., Muresan, S., Gruppen, H., Bont, D.B.A., Merck, K.B., Voragen, A.G.J. (2002). FTIR Spectra of Whey and Casein Hydrolysates in Relation to Their Functional Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6943-6950.
106. Wang, L.J., Yin, S.W., Wu, L.Y., Qi, J.R., Guo, J., & Yang, X.Q. (2016). Fabrication and characterization of Pickering emulsions and oil gels stabilized by highly charged zein/chitosan complex particles (ZCCPs). *Food Chemistry*, 213, 462-469.
107. Weinbreck, F., Rollema, H.S., Tromp, R.H. & Kruif, C.G. (2004). Diffusivity of whey protein and gum Arabic in their coacervates. *Langmuir*, 20, 6389-6395.
108. Wie-Jian Shi, Chuan-He Tang, Shou-Wie Yin, Yan Yin, Xiao-Quan Yang. (2016). Development and characterization of novel chitosan emulsion films via pickering emulsions incorporation approach. *Food Hydrocolloids*, 52, 253 – 264.
109. Wu Jiande, Mengxuan Shi, Wei Li, Luhai Zhao, Ze Wang, Xinzhong Yan. (2015). Pickering emulsions stabilized by whey protein nanoparticles prepared by thermal cross-linking. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 127, 96 – 104.
110. Xiao, Y., & Wiesner, M.R. (2012). Characterization of surface hydrophobicity of engineered nanoparticles. *Journal of Hazardous Material*, 215-216, 148-151.
111. Xiao, J., Lua, X., & Huang, Q. (2017). Double emulsion derived from kafirin nanoparticles stabilized Pickering emulsion: Fabrication, microstructure, stability and *in vitro* digestion profile. *Food Hydrocolloids*, 62, 230-238.

112. Yan, C., Zhang, W. (2014). Coacervation Processes. Microencapsulation in the Food Industry. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-404568-2.00012-1>
113. Yang, J., & Suya Han, L.L. (2017). Preparation of octyl-grafted alginate-amide gel particle and its application in Pickering emulsion. *Colloids and Surface A*, 529, 320-327.
114. Yusoff, A., & Murray, B.S. (2011). Modified starch granules as particle-stabilizers of oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 25, 42-55.
115. Zou, Y., Wan, Z., Guo, J., Wang, J., Yin, S., & Yang, X. (2016). Modulation of the surface properties of protein particles by a surfactant for stabilizing foams. *RSC Advances*, 70, 66018–66026.

**ANEXOS:**

Publicación:

Stabilization of oil-in-water-in-oil (O1/W/O2) Pickering double emulsions by soluble and insoluble whey protein concentrate-gum Arabic complexes used as inner and outer interfaces.

A.G. Estrada-Fernandez, A. Roman-Guerrero, R. Jimenez-Alvarado, C. Lobato-Calleros, J. Alvarez-Ramirez, E.J. Vernon-Carter.

Journal of Food Engineering, (2018), 221, 35 – 44

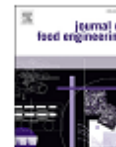




Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Food Engineering

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jfoodeng](http://www.elsevier.com/locate/jfoodeng)



## Stabilization of oil-in-water-in-oil ( $O_1/W/O_2$ ) Pickering double emulsions by soluble and insoluble whey protein concentrate-gum Arabic complexes used as inner and outer interfaces



A.G. Estrada-Fernández<sup>a</sup>, A. Román-Guerrero<sup>a</sup>, R. Jiménez-Alvarado<sup>b</sup>,  
C. Lobato-Calleros<sup>c</sup>, J. Alvarez-Ramirez<sup>d</sup>, E.J. Vernon-Carter<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixo 186, Vicentina, Ciudad de México 09340, México

<sup>b</sup> Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Av. Rancho Universitario s/n Km. 1, Tulancingo, Hidalgo, 43600, México

<sup>c</sup> Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5, Carretera México-Teacoco, 56230 Teacoco, México

<sup>d</sup> Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixo 186, Vicentina, Ciudad de México 09340, México

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 August 2017

Received in revised form

7 October 2017

Accepted 10 October 2017

Available online 12 October 2017

#### Keywords:

Oil-in-water-in-oil Pickering double emulsions

Protein-polysaccharide complexes

Particles hydrophobicity

Droplet size analysis

Morphology by confocal laser scanning

microscopy

### ABSTRACT

Soluble (SC) and insoluble (IC) complexes were obtained from interacting whey protein concentrate-gum Arabic, at pH of 4.0, using biopolymer mass ratios of 2:1 and 3:1, respectively. Particles (SP<sub>1</sub>) were produced from IC and dried at different temperatures. Higher temperatures induced a higher contact angle, modified the protein secondary structure to a greater extent, and decreased the interfacial tension to lower values. The  $O_1/W$  primary emulsion and the  $O_1/W/O_2$  double emulsions were stabilized with SC and SP<sub>1</sub>, respectively. The mean droplet size of the fresh primary emulsion and of the double emulsions increased to from 0.62 to 0.66  $\mu\text{m}$  and from (9.34–4.35 to 10.45–4.63  $\mu\text{m}$ ) after 76 days of storage, respectively. Confocal micrographs permitted to observe the inner oil droplets surrounded by SC, and the double emulsion water droplets by SP<sub>1</sub>. Hydrophobic particles obtained from IC represent a viable alternative for substituting the use of synthetic surfactants in  $W/O_2$  interfaces.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Double emulsions are complex polydispersed multiphase systems consisting of an emulsion in which the dispersed droplets are themselves an emulsion (Bhatia et al., 2013; Schmidt et al., 2015). They are promising in many fields due to their compartmentalized structure which endow them with the potential for separating, encapsulating, protecting and facilitating sustained release and transport of bioactives (Schmidt et al., 2015; Sivapriya et al., 2016). Double emulsions can also be used in the development of low calorie and reduced fat products (Lobato-Calleros et al., 2006), lowering the oil content of conventional oil-in-water (O/W) or water-in-oil (W/O) food emulsions by replacing it with an equivalent  $W_1/O/W_2$  or  $O_1/W/O_2$  emulsion of similar

perceived fat content, while maintaining the texture and mouth feel of conventional products (Hernández-Rodríguez et al., 2017; Mehrnia et al., 2017). Most of the recent research has centered on the design, formation, structure and properties of double emulsions in an attempt to understand the role of several variables influencing their stability during manufacture, storage and usage (Jiménez-Colmenero, 2013). This is not a simple issue in the case of double emulsions targeted for direct human consumption, as there is a limited choice of emulsifiers that can be employed in their formulation due to legislation and consumer demands (Schmidt et al., 2015; Esfanjani et al., 2015). The major problem as regards the stability of double emulsions is the presence of two thermodynamically unstable interfaces. Traditionally two different low molecular weight emulsifiers are used for their stabilization: one with a low hydrophile-lipophile balance (HLB) for the  $W_1/O$  interface and a second one with a high HLB for the  $O/W_2$  interface (Schmidts et al., 2009). Progress in the development of stable double emulsions for food use is dependent on replacing

\* Corresponding author.

E-mail address: [jvc@sanum.uam.mx](mailto:jvc@sanum.uam.mx) (E.J. Vernon-Carter).

<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.10.006>

0260-8774/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Casa abierta al tiempo  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

### ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00195  
Matrícula: 2141800831

MODULACIÓN DE LAS PROPIEDADES DEL CONCENTRADO DE PROTEÍNA DE SUERO Y LA GOMA ARÁBIGA PARA SU AUTOENSAMBLAJE Y USO EN LA ESTABILIZACIÓN DE EMULSIONES PICKERING DOBLES ACEITE-AGUA-ACEITE.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 9:00 horas del día 23 del mes de febrero del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. FRANCISCO CRUZ SOSA  
DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO  
DRA. LANDY HERNANDEZ RODRIGUEZ  
DR. BENOIT AUGUSTE ROGER FOUCONNIER



ANA GUADALUPE ESTRADA FERNANDEZ  
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

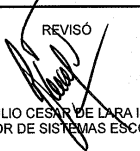
DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA  
DE: ANA GUADALUPE ESTRADA FERNANDEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

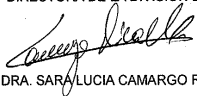
Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ




LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS



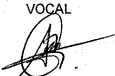
DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE



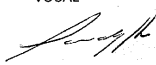
DR. FRANCISCO CRUZ SOSA

VOCAL




DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO

VOCAL



DRA. LANDY HERNANDEZ RODRIGUEZ

SECRETARIO



DR. BENOIT AUGUSTE ROGER FOUCONNIER