



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE CAFEÍNA EN EMULSIONES MÚLTIPLES
ESTABILIZADAS POR COMPLEJOS SOLUBLES BINARIOS Y TERNARIOS DE
CARBOXIMETILCELULOSA, PROTEÍNAS DE SUERO Y PÉPTIDOS**

TESIS

para obtener el grado de Doctora en Biotecnología

PRESENTA

M. C. Nancy Yared Hernández Marín

CoDirección

Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter

Dra. Consuelo Silvia Oliva Lobato Calleros

Asesora

Dra. Angélica Román Guerrero

México, D.F.

Mayo/2015



“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466”

México D.F. a 22 de Mayo del 2015

Iztapalapa, D.F. a 22 de Mayo del 2015

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

**CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE CAFEÍNA EN EMULSIONES MÚLTIPLES
ESTABILIZADAS POR COMPLEJOS SOLUBLES BINARIOS Y TERNARIOS DE
CARBOXIMETILCELULOSA, PROTEÍNAS DE SUERO Y PÉPTIDOS**

Que presentó

Nancy Yared Hernández Marín

Comité Tutorial:

Codirector: Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter

Codirectora: Dra. Consuelo Silvia Oliva Lobato Calleros

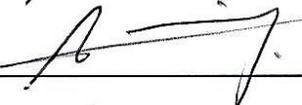
Asesor: Dra. Angélica Román Guerrero

Jurado:

Presidente: Dra. Angélica Román Guerrero



Secretario: Dr. Rubén Jiménez Alvarado



Vocal: Dra. María Eva Rodríguez Huevo



Vocal: Dra. Ma. Del Carmen Hernández Jaimes



Dedicado a...

A mis padres Blanca y Fausto, grandes pilas tras de mi vida y porque en cualquier situación, siempre he sentido que están conmigo.

A Angel, por la sonrisa y confianza, porque hemos caminado día a día y hemos aprendido a valorar el gran amor que nos unió desde el primer día.

A Pancho y a Dalía, porque desde que nacieron hemos estado juntos a pesar de nuestras diferencias.

A mi Gus, porque juntos hemos logrado hacer los mejores complejos gracias por tu tiempo, espacio y disposición. Gracias por permitirme amar de nuevo.

A Dios, porque me dio la oportunidad de cumplir con tan anhelados sueños y sobre todo por haberme dado la oportunidad de vivir a lado de tan hermosa familia.

Agradecimientos:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo financiero otorgado durante la realización de mis estudios de posgrado, hasta la conclusión de esta tesis.

Al Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter por brindarme todas las facilidades para trabajar bajo su dirección y por sus sabios y oportunos consejos. Sinceramente agradezco su confianza y paciencia.

A la Dra. Consuelo Lobato Calleros por su inigualable confianza y compañía durante mi estancia profesional. Su interminable ayuda y trabajo siempre da frutos y este es uno de ellos, muchas gracias.

Al Dra. Angélica Román Guerrero por sus excelentes aportaciones a esta tesis y por brindarme su apoyo y asesoría en momentos especiales.

A la Biol. Yolanda Hornelas Orozco investigadora del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología por su apoyo incondicional en el análisis de microestructura.

A la Universidad Autónoma Metropolitana y a la Universidad Autónoma Chapingo por haberme permitido realizar cada uno de los experimentos que conformaron la presente tesis.

A mis compañeros y amigos por sus asesorías y por haber hecho un ambiente de trabajo agradable.

“CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE CAFEÍNA EN EMULSIONES MÚLTIPLES ESTABILIZADAS POR COMPLEJOS SOLUBLES BINARIOS Y TERNARIOS DE CARBOXIMETILCELULOSA, PROTEÍNAS DE SUERO Y PÉPTIDOS”

RESUMEN

Emulsiones múltiples (EM's) agua-en-aceite-en-agua conteniendo cafeína fueron desarrolladas para su aplicación como sistemas de liberación controlada, mediante el diseño de películas interfaciales formadas por complejos binarios y ternarios solubles (proteína de lactosuero (W), péptidos de lactosuero (P) y carboximetilcelulosa (C)).

El tamaño de gota de aceite de todas las emulsiones múltiples no cambió significativamente a lo largo de 21 días de almacenamiento, pero el tamaño de gota inicial, las propiedades viscoelásticas y las tasas de liberación de cafeína dependieron de la composición de los complejos solubles. El peso molecular de la fracción de proteína predominante en los complejos solubles proteína-polisacárido fue un factor determinante de las propiedades de las emulsiones múltiples. Cuando la proteína de suero predominó en los complejos solubles, en oposición a los péptidos del suero, el tamaño de gota fue más pequeño, las propiedades viscoelásticas fueron más elevadas y la cinética de liberación de cafeína fue más lenta al ser determinada mediante el modelo de Korsmeyer-Peppas.

Palabras clave: cinética de liberación, proteína y péptidos de lactosuero, carboximetilcelulosa, emulsiones múltiples, reología.

**“CAFFEINE RELEASE KINETICS FROM MULTIPLE EMULSIONS STABILIZED BY
BINARY AND TERNARY SOLUBLE COMPLEXES OF
CARBOXYMETHYLCELLULOSE, WHEY PROTEINS AND PEPTIDES”**

ABSTRACT

Water-in-oil-in-water multiple emulsions (ME's) containing caffeine were developed for controlled release application, by designing interfacial layers made of binary and ternary soluble complexes (whey protein (W), whey peptides (P) and carboxymethylcellulose (C)).

Droplet oil size of all the ME's did not vary significantly over 21 days of storage, but initial droplet size, viscoelastic properties, and caffeine release rates depended on soluble complexes composition. The molecular weight of the protein fraction predominating in the protein-polysaccharide soluble complex was a key factor in determining the ME's properties. When W predominated in the soluble complexes, as opposed to P, droplet size was smaller, the viscoelastic properties higher, and the caffeine release kinetics slower as determined by the Korsmeyer-Peppas model.

Keywords: release kinetics, whey protein and peptides, carboxymethylcellulose, multiple emulsions, rheology.

ÍNDICE

RESUMEN	a
ABSTRACT	b
ÍNDICE	c
ÍNDICE DE TABLAS	f
ÍNDICE DE FIGURAS	g
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Alimentos funcionales	4
2.2. Cafeína	5
2.2.1. Propiedades físico-químicas y sensoriales de la cafeína	5
2.2.2. Propiedades farmacológicas de la cafeína	6
2.2.3. Consumo de la cafeína	8
2.2.4. Metabolismo de la cafeína	8
2.2.5. Concentración de cafeína en algunos alimentos comerciales	11
2.3. Emulsiones	12
2.3.1. Clasificación de las emulsiones	13
2.3.2. Emulsiones múltiples (W₁/O/W₂)	13
2.3.3. Mecanismos de desestabilización	15
2.3.4. Estabilidad de las emulsiones	17
2.3.5. Emulsificantes y estabilizantes	18
2.3.5.1. Tensoactivos	18
2.3.5.2. Biopolímeros	21
2.3.5.3. Complejos biopoliméricos	23
2.3.6. Potencial Zeta (ξ)	24

2.3.7. Turbidimetría	25
2.4. Propiedades reológicas y clasificación de fluidos	25
2.5. Yogur	28
2.6. Cinética de liberación de compuestos bioactivos	31
2.6.1. Condiciones gastrointestinales	33
3. JUSTIFICACIÓN	36
4. OBJETIVOS	37
4.1. Objetivo general	37
4.2. Objetivos particulares	37
5. HIPÓTESIS	37
6. MATERIALES Y MÉTODOS	38
6.1. Materiales	38
6.2. Metodología	39
6.2.1. Determinación del peso molecular de los péptidos	40
6.2.2. Determinación de los valores de Potencial Zeta (ζ) de los biopolímeros como función del pH	40
6.2.3. Evaluación de la formación de complejos W-C y P-C	41
6.2.4. Preparación de la emulsión primaria (EP)	41
6.2.5. Variaciones y preparación de emulsiones múltiples (EM)	42
6.2.6. Determinación del tamaño de gota de las emulsiones y su variación con el tiempo	43
6.2.7. Análisis reológico de las EM's	43
6.2.8. Método usado para la cuantificación de cafeína	44
6.2.9. Eficiencia de encapsulación de la cafeína	44

6.2.10. Preparación de los yogures	45
6.2.11. Análisis químico proximal de los yogures	46
6.2.12. Cinética de liberación de cafeína durante el almacenamiento del yogur	46
6.2.13. Cinética de liberación de la cafeína bajo condiciones gastrointestinales simuladas	47
6.2.14. Microestructura del yogur	47
6.2.15. Análisis de datos	48
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
7.1. Peso molecular de los péptidos de hidrolizado de proteína de lactosuero	49
7.2. Valores de ξ de W, P y C como función del pH	49
7.3. Efecto del pH y la $R_{P:S}$ sobre la formación de complejos W-C Y P-C	51
7.4. Tamaño de gota de las emulsiones primarias y su variación con el tiempo de almacenamiento	53
7.5. Tamaño de gota de las emulsiones múltiples y su variación con el tiempo	56
7.6. Propiedades reológicas de las EM's	58
7.7. Eficiencia de encapsulación de la cafeína	61
7.8. Composición química y sinéresis de los yogures	62
7.9. Cinética de liberación de la cafeína	63
7.10. Microestructura del yogur	67
8. CONCLUSIONES	69
9. REFERENCIAS	70
ANEXOS	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Cantidad de cafeína por producto comercial (Juliano y Griffiths, 2005).	12
Tabla 2.2. Usos de tensoactivos de acuerdo al valor de su HLB (Muñoz <i>et al.</i> , 2007).	19
Tabla 2.3. Valores del HLB de algunos tensoactivos comerciales (Muñoz <i>et al.</i> , 2007).	20
Tabla 2.4. Composición y características de las principales proteínas de lactosuero (Zydney, 1998).	22
Tabla 2.5. Principales modelos matemáticos empleados para describir la liberación de compuestos bioactivos a partir de emulsiones múltiples (Korsmeyer <i>et al.</i> , 1983; Higuchi, 1963; Jiménez-Alvarado <i>et al.</i> , 2009; Andretta, 2003).	33
Tabla 6.1. Composición de la fase acuosa externa de las EM's.	42
Tabla 7.1. Valores de diámetro hidrodinámico (\pm DE) de las EP's.	53
Tabla 7.2. Valores de diámetro volumétrico-superficial ($d_{3,2}$) (\pm DE) de las emulsiones múltiples.	57
Tabla 7.3. Valores medios de G' y G'' (\pm DE) de emulsiones múltiples en la Región Viscoelástica Lineal.	60
Tabla 7.4. Eficiencia de encapsulación en W_1 (\pm DE) de las EM's.	61
Tabla 7.5. Composición química, acidez y sinéresis (\pm DE) de los yogures	63
Tabla 7.6. Liberación de cafeína en W_2 (\pm DE) de los yogur con EM's.	63
Tabla 7.7. Parámetros del modelo de Korsmeyer y Peppas (\pm DE) para la liberación de cafeína a partir de las emulsiones múltiples incorporadas a los yogures.	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Estructura molecular de la xantina y cafeína.	6
Figura 2.2. Efectos nocivos por consumo elevado de cafeína.	8
Figura 2.3. Metabolismo de la cafeína en el hígado por enzimas oxidasas del citocromo P450, específicamente las lisozimas 1A2 (o CYP1A2).	10
Figura 2.4. Estructura molecular de la cafeína y adenosina.	11
Figura 2.5. Procedimiento para la elaboración de emulsiones múltiples.	14
Figura 2.6. Morfologías de las emulsiones múltiples caracterizadas por el número de gotas de la fase interna.	15
Figura 2.7. Mecanismos de inestabilidad de una emulsión (Rao y McClements, 2011).	17
Figura 2.8. Dispersión de biopolímeros individuales (a); formación de complejos insolubles (b) y solubles (c).	25
Figura 2.9. Clasificación de los fluidos en función de su comportamiento de flujo.	27
Figura 2.10. Bacterias ácido lácticas (BAL): <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subs. <i>Bulgaricus</i> (a) y <i>Streptococcus salivarius</i> subs. <i>Thermophilus</i> (b).	29
Figura 2.11. Velocidad de crecimiento de flora termófila (% ácido láctico) en función del tiempo (Tamime. 1991).	30
Figura 2.12. Principales mecanismos de liberación de compuestos bioactivos a partir de sistemas dispersos.	31
Figura 6.1. Diagrama experimental.	39
Figura 6.2. Curva de calibración de cafeína para HPLC.	45
Figura 7.1. Perfil de distribución de pesos moleculares de MPM (marcador de peso molecular) y 0.15 mg de P en gel SDS-PAGE 20%.	49
Figura 7.2. Cambios en ξ de dispersiones de C (0.5 % p/p), W (2.0 % p/p) y P (2.0 % p/p) como función del pH.	50
Figura 7.3. Turbidez como una función de pH para: (a) mezclas de W y C y (b) mezclas de P y C a diferentes $R_{P:S}$.	52

Figura 7.4. Variaciones del dh de las emulsiones primarias como función de ϕ_1 y $R_{L:R}$ a 1 (a) y 7 días (b) de almacenamiento.	54
Figura 7.5. Microfotografías de las EP's: (a) EP_{0.4, 0.13:0.87}; (b) EP_{0.4, 0.5:0.5}; (c) EP_{0.5, 0.13:0.87} y (d) EP_{0.5, 0.5:0.5}. Amplificación 100x; barra de escala = 5 μm.	55
Figura 7.6. Microfotografías de las EM's en el primer día de elaboradas: (a) EM_{W:C}; (b) EM_{W:C:P} y (c) EM_{P:C} y a los 21 días de su elaboración: (d) EM_{W:C}; (e) EM_{W:C:P} y (f) EM_{P:C}. Amplificación 100x; barra de escala = 5 μm.	56
Figura 7.7. Variaciones del diámetro $d_{3,2}$ de las EM's con el tiempo de almacenamiento.	58
Figura 7.8. Variaciones de G' y G'' de las emulsiones múltiples elaboradas a 1 día (a) y 21 días (b) de elaboradas como función de la deformación.	60
Figura 7.9. Perfil de liberación de cafeína de las EM's ($\pm\text{DE}$) bajo condiciones de almacenamiento (a), ácidas (b) y sales biliares (c).	66
Figura 7.10. Micrografías de YC. Magnitud y barra de escala: a) 5000x: 5μm, b)2500x: 10μm y c)1000x: 10μm.	67
Figura 7.11. Micrografías de Y_{W:C}. Magnitud y barra de escala: a) 5000x: 5μm, b)2500x: 10μm y c)1000x: 10μm.	68
Figura 7.12. Micrografías de Y_{W:C:P}. Magnitud y barra de escala: a) 5000x: 5μm, b)2500x: 10μm y c)1000x: 10μm.	68
Figura 7.13. Micrografías de Y_{P:C}. Magnitud y barra de escala: a) 5000x: 5μm, b)2500x: 10μm y c)1000x: 10μm.	68

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 6.1. Turbidez.	41
Ecuación 6.2. Eficiencia de encapsulación de cafeína.	46
Ecuación 6.3. Concentración de cafeína en el tiempo.	64
Ecuación 6.4. Logaritmo de la concentración de cafeína en el tiempo.	64

1. INTRODUCCIÓN

Avances en el campo de la Biotecnología han permitido el descubrimiento de numerosos compuestos bioactivos con beneficios potenciales importantes para la salud del ser humano; siendo señalada la ruta oral como la forma más conveniente para su administración; esto es, mediante su incorporación a alimentos que actúen como vehículos (Delie y Blanco-Príeto, 2005). La cafeína es un estimulante del sistema nervioso central y ha sido considerada como un ingrediente importante de varias bebidas energéticas usadas como vehículos, con el fin de incrementar el estado de alerta del consumidor. Ingestas moderadas de cafeína (37.5 a 250 mg día⁻¹) han sido asociadas con beneficios máximos y riesgos mínimos para la función cognitiva, estado de ánimo, rendimiento físico e hidratación (Michael *et al.*, 2008; Ruxton, 2008). Por lo tanto, un tema de investigación actual es el del diseño apropiado de sistemas de encapsulación para la liberación controlada de cafeína (Matoušková *et al.*, 2012) con la finalidad de la impartición de un nivel deseado de estado de alerta. En este sentido, los sistemas coloidales, como las emulsiones, constituyen una alternativa promisoría (Velikov y Pelan, 2008).

Las emulsiones múltiples agua-en-aceite-en-agua ($W_1/O/W_2$) (EM) consisten de pequeñas gotas de agua (W_1) contenidas en gotas de aceite más grandes (O) que se encuentran dispersas en una fase acuosa continua (W_2) (Murillo *et al.*, 2011). Especial interés ha sido puesto en estos sistemas con objeto de aprovechar la ventaja que representa su estructura constituida por múltiples compartimentos (Leal-Calderon *et al.*, 2007). Los bioactivos pueden ser encapsulados dentro de la fase acuosa interna, la fase oleosa intermedia o la fase acuosa externa, haciendo posible el desarrollo de un solo sistema de liberación conteniendo múltiples componentes funcionales, los cuales pueden ser liberados en sitios específicos, tales como la boca, el estómago o el intestino delgado (Weiss *et al.*, 2006). Otra razón estratégica para considerar las emulsiones múltiples para aplicaciones alimentarias se relaciona con el desarrollo de alimentos reducidos en grasa más saludables, buscando disminuir el contenido de aceite de una emulsión alimenticia convencional O/W, mediante su reemplazo con una EM que provoque la percepción de un contenido graso similar (Lobato *et al.*, 2008; Dickinson, 2011).

El desarrollo de emulsiones alimenticias usualmente incluye el uso de dos o más biopolímeros para aumentar sus propiedades funcionales individuales (Ramírez-Santiago *et al.*, 2012). El uso combinado de proteínas y polisacáridos, hace posible aprovechar la habilidad emulsificante de las primeras (debida a su actividad superficial), y la actividad estabilizante de los polisacáridos (debida a modificaciones en la viscosidad de los sistemas y a su capacidad de formar estructuras tipo gel) (Lobato-Calleros *et al.*, 2009). Proteínas y polisacáridos cargados opuestamente pueden formar complejos inter-biopoliméricos, los cuales presentan la capacidad para formar y estabilizar emulsiones efectivamente (Ruíz-Ramos *et al.*, 2006). Existen diversas formas en las cuales los biopolímeros pueden interactuar a nivel molecular, por lo que es importante determinar los parámetros que influyen en la formación de los complejos y su efecto sobre las principales propiedades funcionales que dichos complejos imparten a los sistemas a los que son incorporados (Espinosa-Andrews *et al.*, 2008; Schmitt y Turgeon, 2010). Las interacciones superficiales de los complejos proteína:polisacárido en las gotas de una emulsión dependerán de la forma en la que las moléculas de proteína y polisacárido se adsorban en la interfase (Bergenståhl, 1995). Así, la interfase puede surgir mediante dos rutas: (i) adsorción de agregados de complejos proteína-polisacárido solubles preformados o alternativamente (ii) formación de una película interfacial de proteína, seguida de la complejación interfacial de sus moléculas con moléculas de polisacárido. La composición superficial y estructura serán determinadas por un balance dinámico de procesos competitivos y cooperativos. Las propiedades funcionales mejoradas resultantes de los complejos proteína-polisacárido, en comparación con aquellas de las proteínas y los polisacáridos individuales, pueden ser atribuidas a la estructura de sus complejos. Jiménez-Alvarado *et al.* (2009) informaron que la cinética de liberación de bioactivos a partir de las EM's fue más lenta conforme el peso molecular del polisacárido fue más alto. Así, el factor que probablemente afectó más la funcionalidad global fue el grosor del complejo adsorbido alrededor de las gotas de aceite de la EM.

Por otra parte, las proteínas nativas están constituidas por fragmentos específicos o péptidos encriptados e inactivos, los cuales presentan actividad después de haber sido liberados por hidrólisis (acción enzimática). Se ha demostrado que los péptidos derivados de la leche ejercen bioactividad de tipo antihipertensiva, antimicrobiana, inmunomoduladora, antialérgica, probiótica y de gran influencia sobre el metabolismo, la presión arterial y las glándulas de excreción, el sueño, aprendizaje, memoria, dolor,

comportamiento sexual, apetito y estrés (Baró *et al.*, 2001; Kilara y Panyam, 2003; Torruco-Uco, *et al.* 2008; Wróblewska y Troszyńska, 2005 y Meisel, 2001). En la industria alimentaria existe una tendencia hacia la producción de alimentos funcionales conteniendo péptidos bioactivos (Darewicz *et al.*, 2006). Las proteínas de lactosuero son buenos emulsificantes debido a su habilidad para adsorberse en la interfase aceite-agua y a su buena solubilidad en agua (Girard *et al.*, 2002). Los péptidos producidos por proteólisis son más pequeños, presentan menor estructura secundaria que las proteínas, por lo que se espera muestren diferente comportamiento en las interfases aceite-agua (Gauthier *et al.*, 1993). La propiedad de formación de emulsiones de péptidos de lactosuero puede ser inferior, comparable o superior a aquella de proteínas intactas, dependiendo de varios factores, tales como su solubilidad, hidrofobicidad, peso molecular, estabilidad conformacional, entre otros (Smulders, 2000). Las propiedades emulsificantes de las proteínas de lactosuero han sido incrementadas mediante su complejación con polisacáridos, en particular carboximetilcelulosa, proporcionando una protección más efectiva a las gotas de aceite contra coalescencia en comparación con aquella conferida por las proteínas de lactosuero solas (Girard *et al.*, 2002). En contraste, las propiedades emulsificantes de complejos péptidos de lactosuero-polisacáridos son todavía desconocidas, por lo que un mejor conocimiento acerca de ellas puede llevar a un uso más eficiente de los péptidos de lactosuero. Por otro lado, para asegurar la efectividad de las EM como sistemas de liberación, se requieren estudios sobre sus propiedades de liberación *in vitro* y de su efecto sobre las propiedades mecánico-sensoriales de sistemas alimenticios a las que sean incorporadas.

Con base en lo expuesto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la cinética de liberación de cafeína a partir de emulsiones múltiples estabilizadas por complejos solubles binarios y ternarios de carboximetilcelulosa, proteínas de lactosuero y péptidos de lactosuero.

2. ANTECEDENTES

2.1. Alimentos funcionales

Según (Ashwell, 2002), los alimentos funcionales contienen agentes bioactivos específicos que afectan positivamente funciones específicas del organismo humano, ayudan a mejorar el estado de salud y permiten reducir el riesgo de padecer ciertas enfermedades. Los alimentos funcionales pueden contribuir con ciertas ramas de la fisiología humana, como: las defensas en contra del estrés oxidativo, la fisiología gastrointestinal, la fisiología cardiovascular, el desarrollo temprano del cuerpo y crecimiento, la regulación de procesos metabólicos básicos, el desarrollo cognitivo mental y el desempeño físico. Por otro lado, los alimentos funcionales deben demostrar su efecto en cantidades que normalmente se esperaría que se consuman en una dieta normal. No son píldoras o cápsulas y son parte de un patrón normal de alimentos.

Se ha observado recientemente que el mercado mundial de los alimentos y bebidas funcionales presenta un crecimiento importante en la industria de los alimentos, debido a sus efectos benéficos sobre la salud humana. Se estima que este mercado alcanzará una ganancia económica de \$130 mil millones de dólares para el año 2015 en Estados Unidos de América (EUA) (Global Industry Analysts, Inc., 2012). De la misma forma se ha identificado que en los países desarrollados existen patrones dietéticos de la población, dando prioridad a una alimentación orientada a la salud, donde las recomendaciones van dirigidas a la disminución de la ingesta de alimentos con altos contenidos de grasa, azúcar, colesterol y sodio, lo que ha provocado un gran auge en el consumo de productos funcionales, con el fin de mantener una buena salud y reducir el riesgo de padecer ciertas enfermedades como la obesidad. En México, más de la mitad de la población presenta sobrepeso y más del 15 % obesidad, acentuándose en los niños, ya que uno de cada cuatro niños de 4 a 10 años de edad tiene sobrepeso o presenta obesidad. Se ha informado que en el año 2010 cerca de 287 millones de niños padeció obesidad y que para el 2015 la población obesa podría incrementarse a 700 millones (Fausto-Guerra *et al.*, 2006). Lo anterior ha llevado a la búsqueda de alternativas que permitan aumentar la biodisponibilidad de alimentos funcionales, con alta calidad mecánico-sensorial que permitan mejorar la calidad de la dieta humana y aporten beneficios a la salud.

El yogur se considera como un alimento funcional de alto consumo a nivel mundial, porque además de aportar energía y nutrimentos, se le han atribuido efectos terapéuticos y probióticos, debido a que fortalece el sistema inmune, tiene actividad anticancerígena y reduce el colesterol en sangre; estas propiedades son derivadas de bacterias probióticas, péptidos bioactivos, ácido linoleico conjugado y esfingolípidos (estos tres últimos actúan como agentes anticancerígenos) (Dalton y Takehara, 2012).

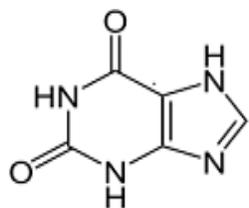
La formulación de un yogur bajo en grasa láctea mediante sistemas coloidales, como las EM's, puede permitir la incorporación y la liberación controlada de ingredientes funcionales como los péptidos bioactivos y la cafeína, ofreciendo así una alternativa para diversificar el área de los alimentos y al mismo tiempo contribuir a mejorar el estado de salud y reducir el riesgo de padecer ciertas enfermedades de sus consumidores.

2.2. Cafeína

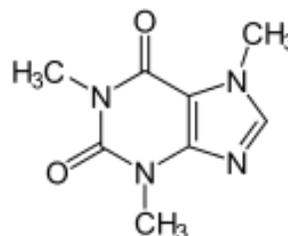
La cafeína es una sustancia natural presente en más de 60 especies de plantas. Se encuentra en la dieta diaria a través de bebidas como el café o el té, el chocolate y algunos refrescos. Las especies económicamente más importantes de café son la *Coffea arabica* (café arábigo) y la *Coffea canephora* (café robusta) que suponen el 80-90 % y el 10-20 % de la producción mundial, respectivamente (Barreda-Abascal *et al.*, 2012).

2.2.1. Propiedades físico-químicas y sensoriales de la cafeína

La cafeína es un polvo inodoro, incoloro y amargo, es clasificado como alcaloide de la familia de las xantinas, tiene tres grupos metilo en tres nitrógenos de los anillos de purina y su nombre sistemático es *1,3,7-trimetilxantina* ó *3,7-dihidro-1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6-diona* (Figura 2.1). La cafeína presenta un peso molecular de $194.191 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, un punto de fusión de $227\text{-}228 \text{ }^\circ\text{C}$ y de $234\text{-}235 \text{ }^\circ\text{C}$ para sus formas anhidra y monohidratada, respectivamente y un punto de ebullición de $178 \text{ }^\circ\text{C}$, lo cual lo hace un compuesto termorresistente; presenta un pK_a de -0.13 a -1.22 y su grado de solubilidad en agua es bajo, tan solo de 21.7 mg/mL a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, de 180 mg/mL a 80°C y de 670 mg/mL a 100°C (Heckman *et al.*, 2010).



Xantina



Cafeína

Figura 2.1. Estructura molecular de xantina y cafeína.

2.2.2. Propiedades farmacológicas de la cafeína

Barreda-Abascal *et al.*, (2012) y Ruxton (2008) señalaron que ingestas moderadas de cafeína consideradas menores a los 400 mg/día, pueden generar efectos positivos psicoestimulantes, metabólicos y del sistema nervioso central, respiratorios, músculo-esqueléticos y cardiovasculares. La cafeína es utilizada tanto recreacionalmente, como médicamente para reducir la fatiga física, aumentar el estado de alerta, el flujo de pensamiento, la atención y la coordinación corporal. Una vez en el cuerpo, actúa a través de diferentes mecanismos, según el medicamento con el que se encuentre asociado, como analgésicos, antigripales y descongestivos. Entre los mecanismos fisiológicos y farmacológicos de la cafeína se encuentran los siguientes:

- Inhibición competitiva de las adenosín monofosfato cíclico-fosfodiesterasas (AMPC-FDE) que convierten el AMPc en las células a su forma no cíclica, lo que permite que el AMPc se acumule en las células. El AMPc participa en la activación de la proteína quinasa A (PKA) y comienza la fosforilación de enzimas específicas usadas en la síntesis de la glucosa (Goodman y Gilman, 1997).
- Relajación de diversos músculos lisos, siendo la acción más importante en este sentido su facultad para relajar los músculos de los bronquios, particularmente si estos han sufrido constricción por un espasmo o debido a asma (Goodman y Gilman, 1997).
- Estimulación del sistema nervioso central, presentando un efecto antagónico de los receptores de adenosina A1 y A2. Las personas que ingieren cafeína o bebidas que la contienen casi siempre muestran menos somnolencia o fatiga y muchas muestran un flujo de ideas más rápido y claro (Fredholm *et al.*, 1999).
- Acción diurética, ya que incrementa la producción de orina, teniendo efectos directos en la concentración de calcio y hierro (Nehlig y Debry, 1994).

- Bloqueo de los receptores GABA y liberación de Ca^{++} intracelular en dosis elevada (Fredholm *et al.*, 1999).
- Vasoconstricción de los vasos pericraneales dilatados, por lo que se puede utilizar en el tratamiento de la migraña (Smith, 2002).
- Reducción de los factores de riesgo implicados con los síndromes metabólicos, incluyendo la diabetes mellitus tipo 2 y la obesidad (Westerterp-Plantenga *et al.*, 2006; Hino *et al.*, 2007).
- Corrección de latidos irregulares en recién nacidos, por lo que se usa en el tratamiento de apnea.

Por otra parte, el consumo excesivo de cafeína considerado entre 600-750 mg/día (Figura 2.2), puede provocar dependencia, nerviosismo, insomnio, irritabilidad y ansiedad, vasoconstricción de los vasos craneanos, taquicardia o irregularidad de los latidos del corazón, extrasístole, disminución del umbral de fibrilación ventricular y aumento en los niveles de glucosa en sangre; reducción de la eficiencia o presión del esfínter esofágico, produciendo reflujo y síntomas de acidez e incluso diarreas; aumenta la secreción ácida gástrica y provoca ulceraciones en la mucosa gástrica, aumenta los niveles de lípidos y lipoproteínas séricas, disminuye la retención de líquidos vía urinaria y por tanto existe pérdida de calcio y magnesio, reduce la absorción de hierro intensificando los síntomas del síndrome premenstrual y finalmente el consumo excesivo de cafeína en dosis mayores a 1000 mg/día es considerada como tóxica y más de 5000 mg/día como letal (Osad *et al.*, 2008).

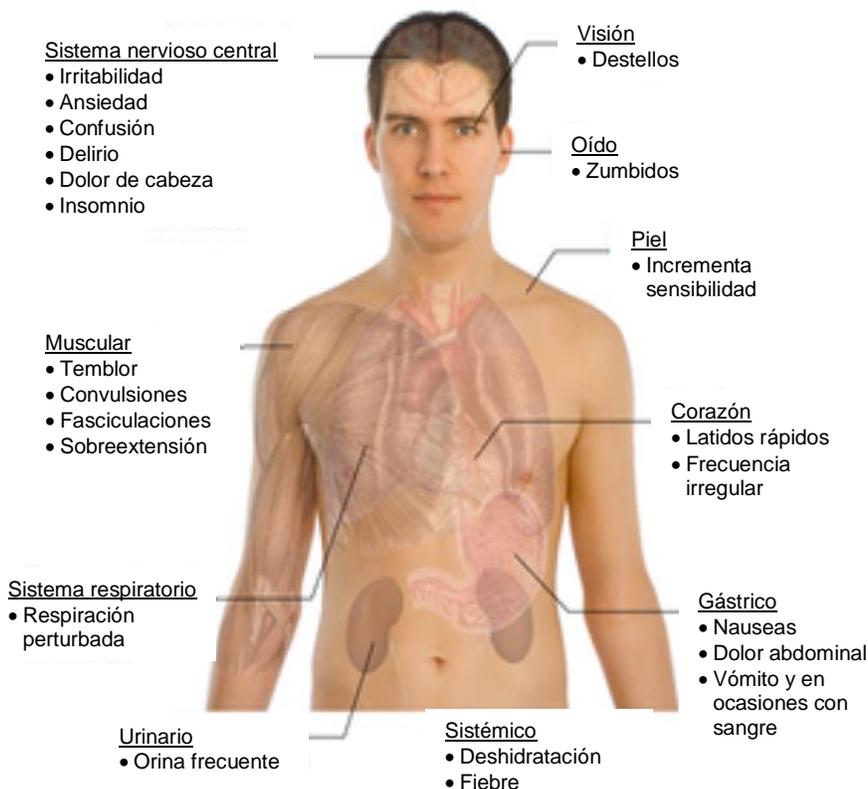


Figura 2.2. Efectos nocivos por consumo elevado de cafeína.

2.2.3. Consumo de cafeína

La cafeína puede considerarse como la sustancia psicoactiva o estimulante de mayor consumo y la más aceptada socialmente a nivel mundial, debido a que organismos, como la FDA (Food and Drugs Administration), la AMA (American Medical Association) y diversas autoridades sanitarias de los diferentes países, después de investigar el perfil de seguridad de la cafeína, concluyeron que un consumo de ésta de hasta 400 mg/día para la población general de adultos sanos, es seguro. Por lo anterior, la cafeína fue incluida desde 1958 en la categoría de alimentos seguros. Sin embargo, el uso de la cafeína en productos alimenticios está reglamentado y su presencia debe ser claramente indicada, según la Norma Oficial Mexicana (NOM-SSA1- 218-2011) en el rubro de alimentos y/o bebidas adicionados con cafeína que contengan más de 20 mg de cafeína/100 mL de producto (Barreda-Abascal *et al.*, 2012).

El café como infusión, es el principal aporte de cafeína en la dieta del adulto. El 80 % de la población adulta consume entre 200-300 mg de cafeína por día (dos a tres tazas de

café); en menores de 18 años, la ingesta media es de 1 mg/kg/día y las principales fuentes de cafeína son los refrescos y el chocolate. En el mundo, se consumen alrededor de 2 500 millones de tazas de café al día y en promedio, los mexicanos consumimos de 800 a 1400 g anuales de café, es decir un consumo de 2.6 tazas al día de la infusión (Barreda-Abascal *et al.*, 2012).

2.2.4. Metabolismo de la cafeína

Fukuda *et al.*, (2010) señalan que las propiedades hidrofóbicas de la cafeína permiten a ésta pasar a través de las membranas biológicas celulares, esto indica una unión limitada a las proteínas del plasma (uniéndose a la albúmina plasmática en un 30 %) y por tanto pasa libre a las células sanguíneas, donde los niveles entre 65-85 % de cafeína en plasma son considerados como confiables o seguros. Asimismo la cafeína se distribuye en todos los líquidos corporales, bilis, semen, líquido céfalo raquídeo, inclusive en sudor. Su volumen de distribución se modifica de acuerdo al peso, pero no por los hábitos como el fumar o consumo de bebidas alcohólicas o la existencia de patología hepática, que influyen sobre otros parámetros farmacocinéticos.

La cafeína es absorbida en el estómago y el intestino delgado a los 45 minutos después de ser ingerida y su eliminación total del organismo es en 4 horas por lo que no se acumula en el cuerpo. Los resultados de Charles *et al.*, (2008) muestran una cinética de primer orden y reflejan que el 50% del consumo fue desechado en las primeras dos horas y el 90% a las 3.5 horas, esta liberación dependerá de factores como la edad, función hepática, embarazo, algunas drogas concurrentes y el nivel de enzimas en el hígado necesarias para el metabolismo de la cafeína (Fukuda *et al.*, 2010).

Barreda-Abascal *et al.*, (2012), señalan que la cafeína es metabolizada en el hígado por la isoenzima del citocromo P-450 (CYP), subfamilia 1A, gen 2 (CYP1A2) por desmetilación de cafeína (95 %), transformándola en paraxantina (85 %), teobromina (10 %) y teofilina (5 %) (Figura 2.3), excretándose sólo el 1% como cafeína inalterada a través de la orina. Estos metabolitos son transformados finalmente en derivados de ácido úrico y cada uno posee sus propios efectos en el cuerpo:

1. Paraxantina: Incrementa la lipólisis induciendo el incremento de niveles de glicerol y ácidos grasos libres en el plasma sanguíneo para ser utilizados como fuente de combustible por el músculo.
2. Teobromina: Dilata los vasos sanguíneos, incrementa la cantidad de oxígeno y el flujo de nutrientes al cerebro y los músculos y aumenta el volumen de orina.
3. Teofilina: Relaja el músculo liso de los bronquios y actúa como cronotrope e inotropo incrementando la frecuencia cardíaca y su eficiencia; por tanto es usada en el tratamiento del asma.

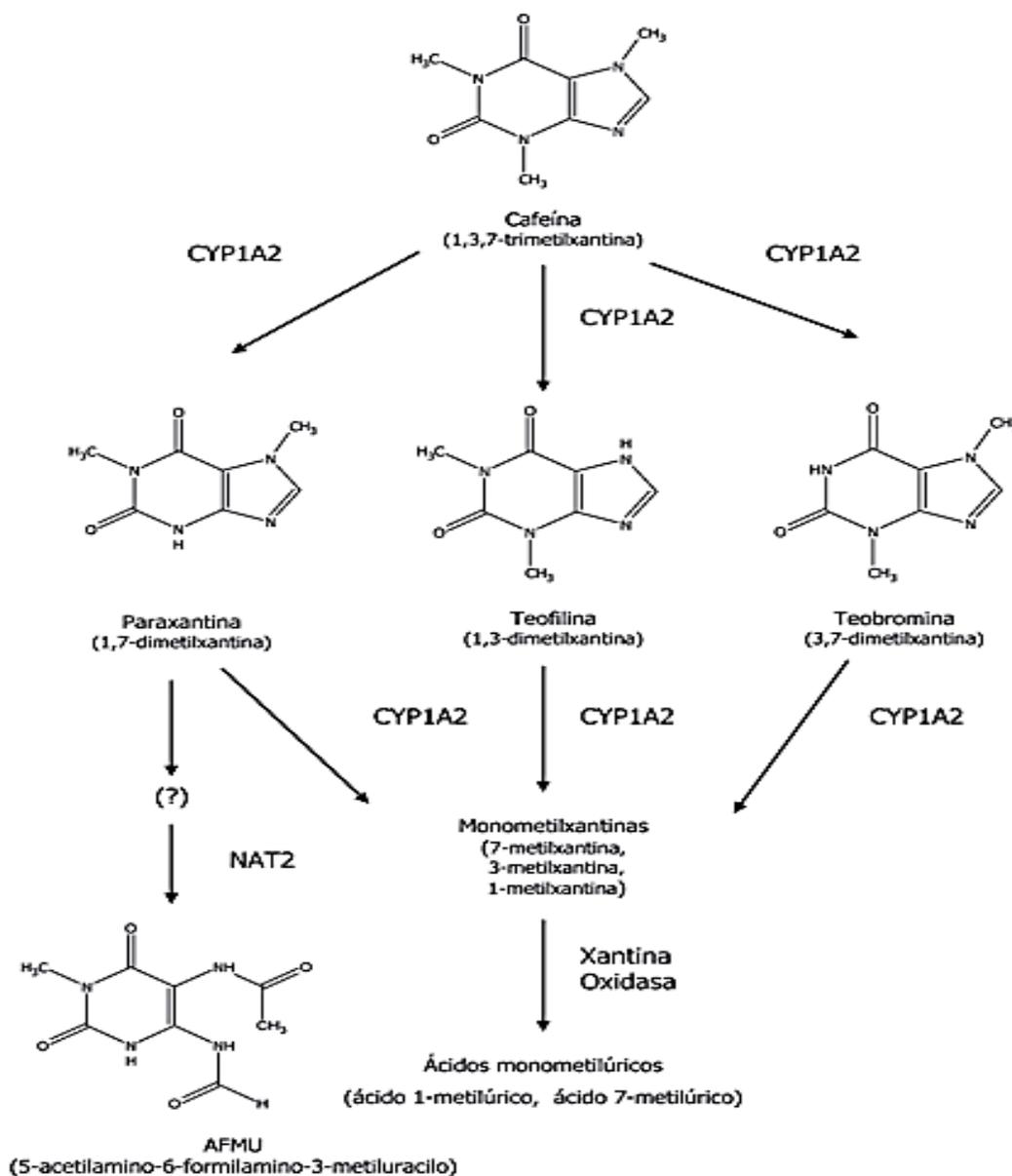


Figura 2.3. Metabolismo de la cafeína en el hígado por enzimas oxidasas del citocromo P450, específicamente las lisozimas 1A2 (o CYP1A2).

Fredholm *et al.*, (1999) señalan que la cafeína cruza fácilmente la barrera hematoencefálica que separa a los vasos sanguíneos del encéfalo. Una vez en el cerebro, el principal modo de acción es como un antagonista no selectivo del receptor de adenosina, por la similitud de sus estructuras, como se muestra en la Figura 2.4. Entonces, tenemos que la cafeína actúa como un inhibidor competitivo.

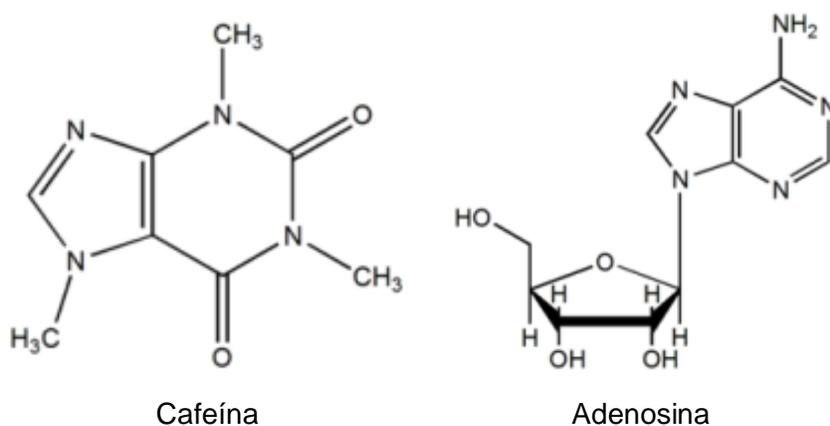


Figura 2.4. Estructura molecular de la cafeína y adenosina.

La adenosina se encuentra en casi cualquier parte del cuerpo, debido a que desempeña un papel fundamental en el metabolismo energético relacionado al ATP, pero en el cerebro, la adenosina desempeña funciones especiales. Existen evidencias que indican que las concentraciones de adenosina cerebral se ven aumentadas por varios tipos de estrés metabólico, entre los cuales citamos: Hipoxia e isquemia. La evidencia indica también que la adenosina cerebral actúa protegiendo al cerebro mediante la supresión de la actividad neuronal y también mediante el incremento del flujo sanguíneo a través de los receptores A_{2A} y A_{2B} ubicados en el músculo liso vascular. Al contrarrestar a la adenosina, la cafeína reduce el flujo cerebral de reposo en 22 a 30 %. Lo anterior se traduce en una constricción de vasos sanguíneos, lo que disminuye el dolor de cabeza y mantiene una posición alerta del sistema nervioso (Fredholm *et al.*, 1999).

2.2.5. Concentración de cafeína en algunos alimentos comerciales:

La cafeína se consume con mayor frecuencia en bebidas como el café (71 %), refrescos (16 %) y té (12 %) y su concentración se muestra en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Cantidad de cafeína por producto comercial (Juliano y Griffiths, 2005).

Producto	Cafeína (mg/250mL)
Café instantáneo	60-100
Café descafeinado	2-4
Café espresso	200-250
Bolsa de té	28-44
Chocolate amargo	150-200
Chocolate clásico	50-70
Chocolate blanco	10-7
Colas light, clásicas y zero	25-27
Bebidas energéticas	88.2-85

Con la revisión anterior, resulta interesante la incorporación de la cafeína en alimentos funcionales, de tal forma que se minimice su sabor amargo mediante su encapsulación en sistemas coloidales, evitando con esto afectar sensorialmente a los alimentos utilizados como vehículo y permitiendo su liberación controlada en el cuerpo, aumentando su tiempo de transición y por tanto sus efectos positivos, sin tener la necesidad de sobrepasar la dosis recomendada al día y provocar efectos adversos al cuerpo.

2.3. Emulsiones

Una emulsión es una dispersión coloidal de dos líquidos inmiscibles y está constituida por tres regiones, las cuales presentan propiedades físico-químicas diferentes: la fase dispersa, la fase continua y la interfase. Todas las moléculas o ingredientes de la emulsión se distribuyen según su concentración y polaridad a lo largo de las regiones mencionadas anteriormente (Aranberri *et al.*, 2006). Las moléculas que constituyen una emulsión tienden a moverse de una región a otra, alterando de esta forma las condiciones físicas y químicas de la misma. Este movimiento, así como la concentración e interacciones entre sus constituyentes tienen una influencia significativa en las propiedades fisicoquímicas, de textura y de aplicación de estos sistemas dispersos (McClements, 2005). La fase dispersa se obtiene al romper uno de los líquidos por medios mecánicos en pequeñas gotas entre 0.1 y 100 μm , las cuales se distribuyen en la fase continua o dispersante. Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables,

pero pueden convertirse en cinéticamente meta-estables en presencia de agentes tensoactivos (emulsificantes) que se adsorben en las superficies de las gotas y reducen la tensión interfacial. Una emulsión meta-estable es aquella que no muestra cambios notables en el tamaño y la forma de sus gotas, en su estado de agregación o en el arreglo espacial, a través de un tiempo de almacenamiento establecido (Aranberri, 2006). Las emulsiones permiten regular la liberación controlada de compuestos bioactivos y protegerlos contra su oxidación ante la luz u oxígeno o la reacción con otros compuestos presentes en el alimento (Lopretti *et al.*, 2007).

2.3.1. Clasificación de las emulsiones

Las emulsiones se clasifican de acuerdo a la organización espacial relativa de su fase continua o dispersante; de esta manera existen dos tipos de emulsiones sencillas en función de su fase dispersa: aceite-en-agua (O/W), en la cual el aceite es disperso en forma de gotas en la fase continua que es el agua y viceversa para las emulsiones agua-en-aceite (W/O). Las emulsiones múltiples (EM) agua-en-aceite-en-agua ($W_1/O/W_2$) y aceite-en-agua-en-aceite ($O_1/W/O_2$) son denominadas “emulsiones de emulsiones”, debido a que son sistemas de emulsión en donde las gotas de la fase dispersa contienen dentro de ellas otras gotas pequeñas dispersas. Cada glóbulo disperso en las EM’s forma una estructura vesicular en la cual se pueden encapsular compuestos bioactivos, haciendo posible el desarrollo de un solo sistema de liberación conteniendo múltiples compuestos bioactivos, los cuales pueden ser liberados en un sitio específico, como la boca, estómago o intestino delgado (Weiss *et al.*, 2006; Hernández-Marín *et al.*, 2013).

2.3.2. Emulsiones múltiples $W_1/O/W_2$

Para la preparación de una EM, primero se forma una emulsión primaria (EP; W_1/O) (Figura 2.5) mediante el uso de emulsificantes de bajo peso molecular, en cuya fase acuosa u oleosa se encuentra solubilizado el principio activo. Posteriormente, la EM es obtenida a través de la dispersión de la EP en una dispersión acuosa de biopolímeros con actividad superficial, tales como las proteínas y/o algunas gomas y polisacáridos con propiedades estabilizantes. La eficiencia, estabilidad, tamaño y distribución de gota de las EM’s dependen de la concentración y características estructurales del polímero en la fase continua y de los emulsificantes usados para la formación de la EP.

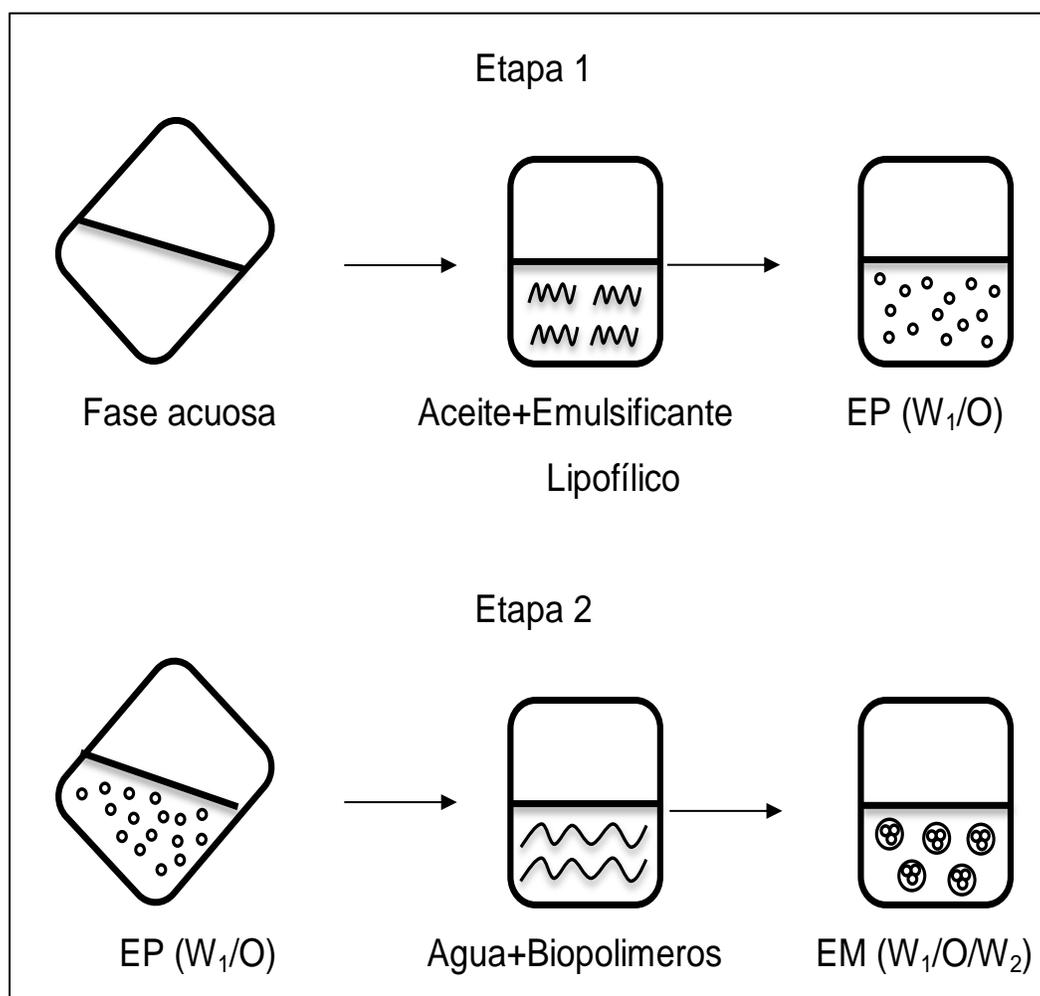


Figura 2.5. Procedimiento para la elaboración de emulsiones múltiples.

La morfología de las EM's es variada y suelen presentarse morfologías de tipo A, en las que las gotas de la emulsión múltiple contienen una sola gota de fase interna; del Tipo B, cuyas gotas presentan un número pequeño de gotas internas, y del tipo C, en las que las gotas contienen varias gotas internas, las que por lo general se encuentran floculadas y cercanamente empacadas (Figura 2.6). De acuerdo a la aplicación de la emulsión múltiple es el tipo de morfología que se prefiere; por ejemplo, si se desea tener un mejor control para la liberación de una especie, se prefiere la del tipo C, pues presenta mayor área de transferencia; si sólo se desea encapsular y proteger algún compuesto, pueden emplearse las del tipo B o A (Garti, 1997).

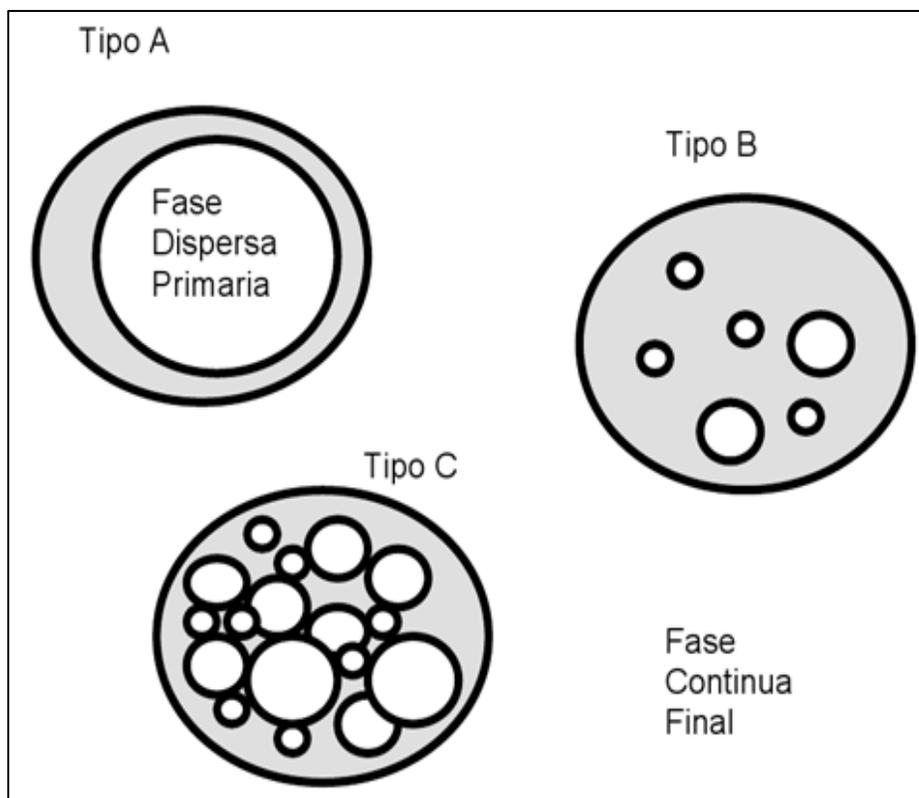


Figura 2.6. Morfologías de las emulsiones múltiples caracterizadas por el número de gotas de fase la interna.

2.3.3. Mecanismos de desestabilización

Existen varios factores que afectan la estabilidad de una EM, algunos de ellos son: la gran área superficial que presentan las gotas de las emulsiones, la migración del emulsificante lipofílico de la emulsión interna (W_1/O) a la fase acuosa externa (W_2); la inversión de fases debido al uso elevado de emulsificante hidrofílico en la fase interna (Sela *et al.*, 1995) y la migración de agua entre la fases W_1 y W_2 , provocada por las magnitudes de los gradientes de presión osmótica entre ambas fases (Ozer *et al.*, 2000).

Aranberri (2006) y McClements (2005) mencionan que el proceso de desestabilización de las emulsiones (Figura 2.7) puede ocurrir mediante los siguientes mecanismos:

Separación gravitacional: Se trata de un mecanismo de inestabilidad física causado por la acción de la gravedad y de un gradiente de densidades relativas entre las fases que causan su separación vertical, sin variar la distribución del tamaño de las mismas y puede llevarse a cabo por cremado o sedimentación.

El cremado describe el movimiento de las gotas hacia la parte superior del sistema, esto es debido a que la densidad de la fase dispersa es menor que la de la fase continua. Mientras que en la sedimentación las gotas migran hacia la parte inferior. Se puede inhibir o prevenir la separación gravitacional por medio de tres enfoques: el primero consiste en hacer coincidir la densidad de las fases dispersa (aceite) y continua (acuosa); en segundo lugar, por la reducción del tamaño de las gotas de la emulsión, ya que la velocidad de formación de crema es proporcional al tamaño de las gotas al cuadrado (Ley de Stoke); es decir, si las gotas son lo suficientemente pequeñas, entonces los efectos de movimiento Browniano dominarán y el sistema se mantendrá estable; en tercer lugar, por el aumento de la viscosidad de la fase acuosa; por ejemplo, mediante la adición de agentes espesantes. Este enfoque no siempre puede ser viable, ya que influirá también en la textura y sensación en la boca del producto final (Piorkowski y McClements, 2013).

Agregación de las gotas: Este mecanismo de inestabilidad depende del equilibrio de fuerzas atractivas y repulsivas que operen entre las gotas y de las propiedades físico-químicas de las fases dispersa, continua e interfacial (índice de refracción, pH, fuerza iónica, presión osmótica, temperatura, etc.). Las interacciones de van der Waals ejercen fuerzas atractivas; en contraste, las interacciones estéricas y electrostáticas son generalmente de fuerza repulsiva. En este sentido, las interacciones de van der Waals operarán entre gotas y ocurrirá una agregación si no hay fuerzas de repulsión opuestas. Para contrarrestar esto, se pueden incorporar emulsificantes que pueden generar una repulsión estérica suficientemente fuerte; estas fuerzas repulsivas superarán a las fuerzas atractivas de van der Waals y con ello se puede estabilizar el sistema frente a la agregación (Piorkowski y McClements, 2013). Las dos formas principales de agregación de gotas en emulsiones son la floculación y la coalescencia.

La floculación es la adhesión o agregación de las gotas dispersas sin fusionarse, debido a las colisiones provocadas por el movimiento Browniano, sin existir variación en la distribución de tamaño de gotas. Este proceso es reversible y está controlado por un equilibrio global entre las fuerzas de atracción electrostáticas, de van der Waals, repulsivas, de tipo estérico y de hidratación. La floculación es generalmente perjudicial para la calidad de la emulsión debido a que acelera la velocidad de la separación gravitatoria reduciendo así su vida útil.

La coalescencia es la colisión o fusión irreversible de las gotas dispersas para crear gotas más grandes, este proceso involucra la eliminación parcial o total de la interfase. Este cambio irreversible requeriría un aporte extra de energía para restablecer la distribución de tamaño de partícula original.

El engrosamiento de gotas (Maduración de Ostwald) se define como un mecanismo de coalescencia donde el crecimiento de las gotas más grandes se da a costa de las más pequeñas, hasta que estas últimas prácticamente desaparecen. Este proceso ocurre a una velocidad que es función de la solubilidad de la fase dispersa en la fase continua y se debe a la presión interna de las gotas (presión de Laplace), la cual es mayor en las gotas más pequeñas.

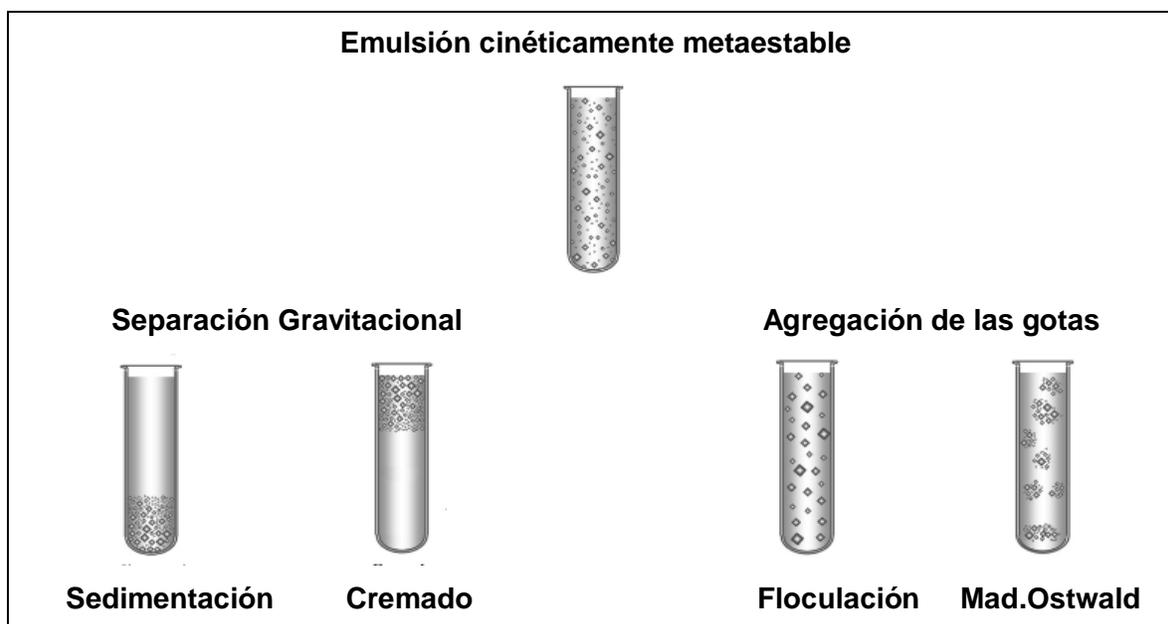


Figura 2.7. Mecanismos de inestabilidad de una emulsión (Rao y McClements, 2011).

2.3.4. Estabilidad de las emulsiones

Para contrarrestar la inestabilidad de las emulsiones se emplean diferentes tipos de materiales. Los factores que determinan la estabilidad de una emulsión son: una barrera energética que es eléctrica en origen y que influye sobre la tasa de floculación y la distancia entre gotas, que en términos finales, separa a las gotas, y una barrera mecánica alrededor de las gotas de la fase dispersa, cuya estructura y propiedades afectan su resistencia a la ruptura y consecuentemente a la tasa de coalescencia (Ozer *et al.*, 2000).

Los factores físicos pueden ser modulados por carga superficial de tipo electrostática, estérica o una combinación de ambos: electroestérica, mediante el uso de moléculas emulsificantes capaces de adsorberse superficialmente y de formar películas interfaciales alrededor de las gotas de la emulsión, de tal forma que sus grupos no polares se orientan hacia la fase oleosa y los grupos polares hacia la fase acuosa, formando una barrera física contra los procesos de desestabilización. El efecto estabilizante sobre la emulsión se ve reflejado sobre las características reológicas o viscoelásticas y de grosor de la película interfacial (Dalglish, 2006; Patel y Velikov, 2011). Estas propiedades viscoelásticas dependen de las propiedades de la fase continua, el tamaño promedio de gota de la emulsión, la relación entre la fase continua y la fase dispersa y la tensión superficial de la gota. Por lo anterior, en la formulación de una emulsión, es importante considerar el tipo, la cantidad y la calidad de los emulsificantes y estabilizantes, y la relación y el orden en que se añaden los ingredientes de la emulsión (Mc Clements, 2005; Dalglish, 2006).

2.3.5. Emulsificantes y estabilizantes

Los emulsificantes son compuestos con actividad superficial y pueden ser clasificados en función de su peso molecular como: tensoactivos (de bajo peso molecular) y gomas y proteínas (de alto peso molecular); por su parte, los estabilizantes son compuestos de alto peso molecular que no presentan actividad superficial pero que son capaces de absorber agua y aumentar la viscosidad del medio en el que se encuentran. Ambos compuestos pueden ser utilizados en la estabilización de emulsiones (Mc Clements, 2005).

2.3.5.1. Tensoactivos

Los tensoactivos son compuestos químicos o mezclas de compuestos de bajo peso molecular que promueven la formación y la estabilización de las emulsiones debido a que permiten disminuir la tensión interfacial y son capaces de formar sistemas finamente dispersos, a partir de fases no miscibles como consecuencia de su actividad anfifílica; así mismo permiten la formación de capas mono o multi moleculares en la interfase de naturaleza líquido-cristalina, que aumenta la viscoelasticidad de la interfase, favoreciendo el procesado y estabilidad de las emulsiones e impidiendo la aglutinación, separación y/o coalescencia de las gotas (Tesch y Schubert, 2002).

Muñoz *et al.*, (2007) indicaron que un concepto importante para la selección de un tensoactivo o una mezcla de estos es el balance hidrofílico o lipofílico (HLB). Estos compuestos anfifílicos muestran una mayor o menor tendencia a solubilizarse en medio oleoso o acuoso, dependiendo de la proporción de sus grupos hidrofílicos (cabezas polares o grupos etoxilados) e hidrofóbicos (cadenas hidrocarbonadas largas, $C \geq 12$) y pueden clasificarse de acuerdo a su valor de HLB (Tabla 2.2). Si el tensoactivo es soluble en agua, será útil para la preparación de emulsiones O/W y si es soluble en medio oleoso será útil para la formación de emulsiones W/O.

Tabla 2.2. Usos de tensoactivos de acuerdo a su valor de HLB (Muñoz *et al.*, 2007).

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

Otra clasificación importante de los tensoactivos se basa en su carga eléctrica: aniónicos (con compuestos iónicos y ácidos carboxílicos); catiónicos (con sales de aminas cuaternaria), anfóteros o zwitteriónicos (como las lecitina) y no iónicos (como el monoacilglicerol, ésteres de ácidos grasos de sacarosa y octanol). También existen tensoactivos sintéticos, derivados de la industria del petróleo (dodecilsulfato de sodio y alcoholes grasos polietoxilados) o tensoactivos derivados de materias primas alternativas (fosfolípidos a partir de lecitinas de soya y de huevo, monoglicéridos a partir de grasas, aceites interesterificados con glicerol, ésteres de sacarosa, ésteres de sorbitán y polisorbatos). Algunos tensoactivos comerciales se muestran en la Tabla 2.3. Cabe destacar que en la industria de alimentos el uso de tensoactivos es restringido, debido a que pueden presentar características toxicológicas, por lo que su uso se limita a tres grupos: las lecitinas y los mono y diglicéridos y sus ésterificaciones. El ricinoleato de propilenglicol (Grindsted PGPR) es una mezcla de mono y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de poliglicerol y estearato de potasio en glicerol con agua y propilenglicol. Por su parte, la lecitina es una mezcla de fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina y fosfatidil inositol; los dos primeros de carácter catiónico y aniónico al mismo tiempo, y el tercero es un ácido relativamente fuerte de tipo aniónico (Krog, 1997).

Tabla 2.3. Valores del HLB de algunos tensoactivos comerciales (Muñoz *et al.*, 2007).

Emulsificante	HLB
Ácido oleico	1.0
Monoglicéridos acetilados (ACETEM)	1.5
Trioleato de sorbitán (Span 85)	1.8
Triestearato de sorbitán (Span 65)	2.1
Monoestearato de propilenglicol	3.4
Monoestearato de glicerol (Monestriol GE)	3.8
Monooleato de sorbitán (Span 80)	4.3
Ricinoleato de propilenglicol (Grindsted PGPR)	4.3
Monoestearato de sorbitán (Span 60)	4.6
Hexadecil éter dietoxilado (Brij 52)	5.3
Monoestearato de diglicérido	5.5
Monopalmitato de sorbitán (Span 40)	6.7
Monoestearato de triglicerol	7.0
Ésteres del ácido acetyl tartárico (Panodan DATEM)	8.0
Lecitina	8.0
Monopalmitato de lactoilo	8.1
Monolaurato de sorbitán (Span 20)	8.6
Dioleato de hexaglicerol	9.0
Lauril éter polietoxilado (Brij 30)	9.7
Gelatina (Farmagel B)	9.8
Trioleato de sorbitán y polioxietileno (Tween 85)	10.5
Metilcelulosa (Metocel 15cps)	10.5
Triestearato de sorbitán y polioxietileno (Tween 65)	10.9
Oleil éter polietoxilado (Brij 97)	12.4
Monoglicérido etoxilado	13.0
Monooleato de decaglicerol	14.0
Monooleato de sorbitán polietoxilado (Tween 80)	15.0
Monopalmitato de sorbitán polietoxilado (Tween 40)	15.6
Monolaurato de sorbitán polietoxilado (Tween 20)	16.7

2.3.5.2. Biopolímeros

Los biopolímeros son macromoléculas que comprenden a las proteínas, gomas y polisacáridos y se utilizan generalmente en la estructuración de alimentos y como agentes emulsificantes-estabilizantes de emulsiones (Jafari *et al.*, 2008).

Las proteínas y algunas gomas pueden participar como agentes emulsificantes debido a que presentan actividad superficial; durante la homogeneización se adsorben en la interfase aceite-agua, lo que conduce a una reducción en la tensión interfacial, facilitando así la lejanía entre gotas. Las más utilizadas en la microencapsulación de ingredientes alimentarios son: gluten, caseinatos, proteínas de lactosuero, grenetina, proteína de soya y albúmina, debido a su alta solubilidad en agua.

Los polisacáridos son conocidos como agentes estabilizantes o espesantes, debido a que aumentan la viscosidad de la fase acuosa; los más utilizados en la microencapsulación son: pectina, almidones nativos y modificados, alginatos, carragenina, maltodextrinas, jarabes de maíz, ciclodextrinas y derivados, sacarosa, quitosano, gomas vegetales, carboximetil-celulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, nitrocelulosa y acetilcelulosa, debido a su carácter insípido, su fácil dispersión en agua y su bajo costo (Jafari *et al.*, 2008).

En la mayoría de los sistemas alimenticios, tanto las proteínas como los polisacáridos se encuentran mezclados bajo condiciones que influyen directamente en su interrelación y formación de complejos biopoliméricos; ejemplo de ello es el pH, la fuerza iónica, la concentración total y la proporción en peso entre los biopolímeros (Benichou *et al.*, 2002). La carga eléctrica en biopolímeros depende de la naturaleza de los grupos iónicos a lo largo de la cadena, así como de las condiciones de la solución (pH y la composición iónica). Algunos biopolímeros son neutros (almidón, celulosa), algunos son aniónicos (alginato), algunos son catiónicos (quitosano) y algunos son anfóteros (gelatina).

Proteína de lactosuero

La proteína de lactosuero (W) está constituida fundamentalmente por las proteínas solubles en el suero lácteo después de la precipitación de las caseínas a un pH 4.6 y 20

°C, representan alrededor del 20 % del total de las proteínas de la leche. Su composición se presenta en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Composición y características de las principales proteínas de lactosuero (Zydney, 1998, Farrel *et al.*, 2004).

	Porcentaje (%)	Peso molecular (kDa)	Punto isoeléctrico (pI)
β-lactoglobulina (β-Ig)	50-60	18.36	5.35
α-lactoalbúmina (α-La)	12-16	14.15	4.5-4.8
Inmunoglobulinas (IgG)	5-8	150 y 21	5.5-8.3
Albúmina sérico-bovina (BSA)	3-5	69	4.7-4.9
Lactoferrina (Lf)	<1	78	9.0

Estas proteínas se consideran termosensibles debido a que una temperatura superior a 65 °C provoca el desdoblamiento de su estructura globular y exposición de sus grupos sulfhidrilo e hidrofóbicos. A temperaturas mayores a 70–80 °C, sus moléculas comienzan a agregarse y a aglomerarse (Khwaldia *et al.*, 2004). Una limitante para el uso de W en el desarrollo de sistemas coloidales alimentarios, lo constituye su sensibilidad a las condiciones de temperatura, pH y fuerza iónica.

Biopéptidos de lactosuero

Los biopéptidos de proteína de lactosuero (P) son fracciones proteínicas liberadas por hidrólisis enzimática; presentan actividad biológica de tipo antioxidante, antimicrobiana, antihipertensiva, antiinflamatoria, antitumoral e incluso adelgazante, cuya actividad superficial estará definida en función del nivel y el tipo de hidrólisis (Korhonen y Pihlanto, 2003). El hidrolizado de W es un producto obtenido por filtración e hidrólisis enzimática para la producción de una mezcla de péptidos y aminoácidos libres con mayor aporte nutricional y médico, éste presenta en general una distribución de pesos moleculares del siguiente orden: > 20 kDa: 17 %, 5-20 kDa: 15.6 %, 1-5 kDa: 26.7 % y < 1kDa: 40.5 %. Las ventajas que presenta el hidrolizado de W se relaciona con una alta solubilidad, digestibilidad y estabilidad al calor, por lo que su uso y aplicación es de tipo universal, desde alimentos y bebidas, hasta productos farmacológicos (Korhonen y Pihlanto, 2003; Baró *et al.*, 2001).

Carboximetilcelulosa (C)

La carboximetilcelulosa (C) es un polisacárido aniónico lineal obtenido por hidrólisis ácida y posterior alcalinización de la celulosa; su solubilidad incrementa en función del grado de sustitución. Contiene grupos cargados negativamente a valores de pH neutros, por lo que actúa como intercambiador catiónico, tiene un valor de pKa de 4.0, por lo que puede ser usada para solubilizar proteínas de lactosuero a valores de pH ácidos o para recubrir compuestos a través de la formación de películas elaboradas con complejos insolubles (Girard *et al.*, 2002). C está compuesta por subunidades de glucosa unidas por enlaces β -(1-4) y sus propiedades pueden variar dependiendo del peso molecular, grado de polimerización e interacción con el resto de los ingredientes de los alimentos. La incorporación de C permite aumentar la viscosidad de las dispersiones y está relacionada inversamente a la temperatura del medio; es así, como exposiciones prolongadas a altas temperaturas pueden degradar irreversiblemente su estructura y afectar su viscosidad en el enfriamiento. La viscosidad producida por C también puede ser afectada por el pH; es decir, condiciones ácidas ($\text{pH} < 3$) permiten el incremento de la viscosidad y precipitación de los radicales ácidos libres de C. La C es usada ampliamente en la industria de alimentos, forma dispersiones claras, se disuelve rápidamente en agua fría o caliente, actúa como ligante de humedad, estabiliza emulsiones y mejora la viscosidad y textura de muchos productos. En adición, C es un producto no calórico usado para desarrollar alimentos dietéticos, permite la formación de complejos con proteínas debido a su carácter aniónico y evita la precipitación de éstas durante el tratamiento térmico o almacenamiento, por lo que es de gran utilidad en la elaboración de yogur para beber (usando un 0.5 % (p/p) a un pH de 4.3-4.4) (Tamime y Robinson, 1999).

2.3.5.3. Complejos biopoliméricos

Los complejos biopoliméricos usados en la formulación de emulsiones, se forman mediante la interacción entre dos o más biopolímeros, uno con capacidad emulsificante o actividad superficial (proteína) y otro con propiedades estabilizantes o espesantes (polisacárido) (Schmitt y Turgeon, 2010). Se ha informado que el uso de polielectrolitos con cargas opuestas da origen a la formación de complejos interpoliméricos con interacciones fuertes o débiles (enlaces covalentes) o no específicas (iónicas, dipolo-

dipolo, van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, etc.). Dichas interacciones son determinadas por las características fisicoquímicas de cada biopolímero (densidad de carga y masa molar), su concentración, relación en peso y condiciones de disolución (pH, fuerza iónica y tipo de iones) (Mekhloufi *et al.*, 2005; Schmitt y Turgeon, 2010; Weinbreck *et al.*, 2004). Este tipo de interacciones da como resultado la obtención de complejos solubles e insolubles capaces de formar y estabilizar emulsiones a través de la estructuración de películas interfaciales gruesas y propiedades viscoelásticas tales que contribuyan al diseño de nuevos productos con estructura, textura y funcionalidad deseada (Turgeon *et al.*, 2003; Benichou *et al.*, 2002; Lobato-Calleros *et al.*, 2004).

Hernández-Marín *et al.* (2013) demostró a partir de técnicas como medición de potencial ξ y turbidimetría, la formación de complejos biopoliméricos solubles e insolubles elaborados a partir de carboximetilcelulosa (C) y proteína de lactosuero (W), los cuales fueron útiles para la estabilización de emulsiones múltiples. Gauthier *et al.* (1993) demostraron que la hidrólisis enzimática (tripsina) de W, permitió mejorar las propiedades superficiales de sus proteínas, aumentando su capacidad de adsorción superficial, debido al rompimiento de su estructura secundaria y conservación de su capacidad emulsificante.

2.3.6. Potencial Zeta (ξ)

El potencial zeta (ξ) se define como la distancia desde la superficie de las gotas por debajo del cual los contra-iones permanecen firmemente unidos a la gota cuando se mueve en un campo eléctrico. Prácticamente es una medida que representa la magnitud de repulsión o atracción entre partículas o potencial eléctrico entre el volumen de solución y el plano de deformación alrededor de la partícula. Cabe destacar que la determinación de ξ en un barrido de pH para cada biopolímero, permite obtener los intervalos de pH en los que podemos encontrar las distintas interacciones entre estos para formar complejos insolubles o solubles. El intervalo de pH en el que existe la máxima diferencia estequiométrica o la máxima diferencia entre cargas de signo opuesto de los biopolímeros, será el que promueva una máxima interacción entre biopolímeros, y por tanto la formación de complejos insolubles, también llamados coacervados complejos. Mientras que valores de pH cercanos al pI de las proteínas, permitirán interacciones electrostáticas limitadas entre biopolímeros, causando la formación de complejos solubles, útiles para la estabilización de emulsiones (Weinbreck *et al.*, 2004).

2.3.7. Turbidimetría

La turbidimetría es una evaluación espectrofotométrica usada para detectar la presencia de sólidos en suspensión, es decir, en soluciones biopoliméricas nos permite evaluar la formación de complejos solubles e insolubles a partir del análisis la distintas fases de la suspensión como se puede observar en la Figura 2.8 (Savant y Torres, 2000). La formación del precipitado lechoso es atribuida a la formación de complejos coacervados, cuya insolubilización se debe a la neutralización de las cargas eléctricas (Espinosa-Andrews *et al.*, 2010).

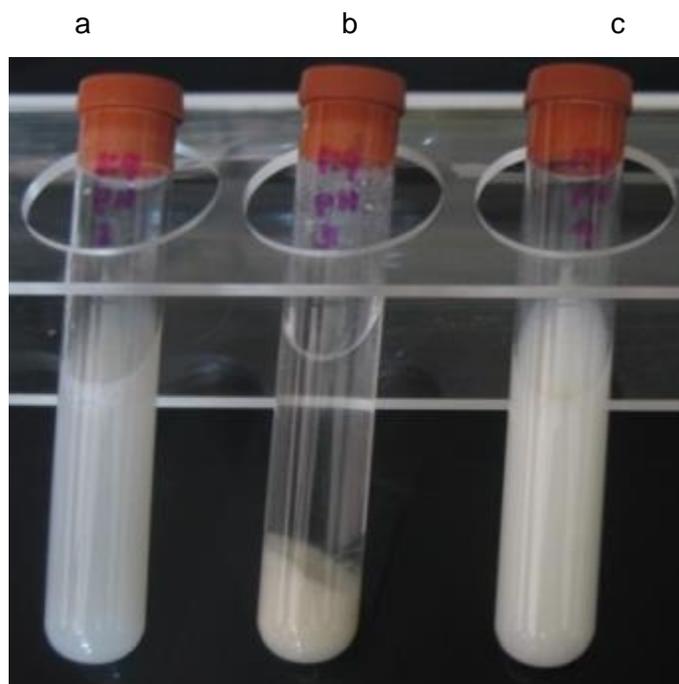


Figura 2.8. Dispersión de biopolímeros individuales (a); formación de complejos insolubles (b) y solubles (c).

2.4. Propiedades reológicas y clasificación de fluidos

La Reología es la ciencia que nos permite medir el grado de deformación y flujo de un material bajo la aplicación de un esfuerzo (Tabilo-Munizaga y Barbosa-Cánovas, 2005). El esfuerzo es la medida de fuerza por unidad de área superficial, expresada en Pascales (Pa). La dirección de la fuerza con respecto a la incidencia sobre el área superficial determina el tipo de esfuerzo. Todo esfuerzo aplicado a un material le produce una deformación relativa a su estado original. El esfuerzo normal (σ) ocurre cuando la fuerza

es perpendicular a la superficie y puede realizarse por tensión o compresión, produciendo deformaciones longitudinales (ϵ), que pueden ser alargamientos o acortamientos. El esfuerzo de corte (τ) es un esfuerzo tangencial y ocurre cuando la fuerza actúa en paralelo a la superficie, se producen deformaciones angulares (γ). La deformación representa la cantidad dimensional de la deformación relativa de un material; la dirección del esfuerzo aplicado con respecto a la superficie del material determina el tipo de deformación; así la deformación normal (ϵ) ocurre cuando el esfuerzo es normal a la superficie de la muestra (Ibarz-Ribas y Barbosa-Cánovas, 2005; Tabilo-Munizaga y Barbosa-Cánovas, 2005).

Debido a la gran diversidad y comportamiento de los materiales, se toman puntos de referencia constituidos por sustancias ideales. Al sólido ideal se le conoce como sólido de Hooke, en memoria de Robert Hooke, descubridor de la elasticidad; mientras que al líquido ideal se le conoce como líquido Newtoniano, en honor a Isaac Newton. De un modo muy general puede hacerse una primera distinción entre fluidos con comportamiento newtoniano y no newtoniano, según si su comportamiento reológico puede describirse mediante la ley de Newton de la viscosidad o no. Los líquidos simples, soluciones verdaderas, disolventes de bajo peso molecular, dispersiones macromoleculares diluidas, soluciones de polímeros que no interaccionan y pastas con bajo contenido de sólidos, presentan comportamiento ideal newtoniano y se caracterizan por que su viscosidad es constante para cualquier valor de esfuerzo tangencial o cortante, de tal forma que su velocidad es proporcional al esfuerzo aplicado. Los fluidos no Newtonianos cuando son sometidos a un esfuerzo cortante, fluyen y se deforman a una velocidad que aumenta al mismo tiempo que el esfuerzo cortante; de esta forma, si su viscosidad es función únicamente del esfuerzo cortante y de la velocidad de deformación se denominan independientes del tiempo, y si su viscosidad depende, no sólo del gradiente de velocidad, sino también del tiempo que actúa dicho gradiente, los fluidos se denominan dependientes del tiempo (Figura 2.9). Los fluidos no newtonianos pueden clasificarse en distintas categorías (Figura 2.9): fluidos de Bingham, fluidos dilatantes, fluidos pseudoplásticos y fluidos plásticos de tipo Casson que están próximos a los pseudoplásticos, pero que requieren de un esfuerzo mínimo de cedencia. Además existen fluidos que presentan conjuntamente comportamiento de fluido viscoso y elástico; es decir, son fluidos viscoelásticos (Ibarz-Ribas y Barbosa-Cánovas, 2005).

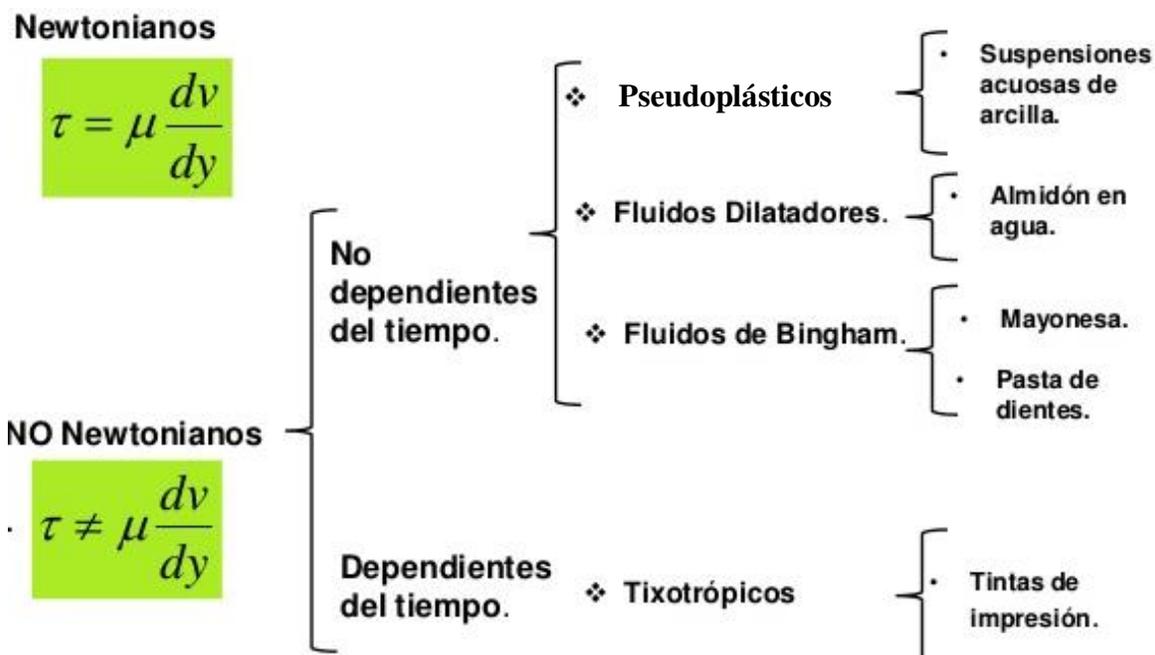


Figura 2.9. Clasificación de los fluidos en función de su comportamiento de flujo.

Pruebas de esfuerzo-deformación son usadas para el estudio del comportamiento de los alimentos y generalmente pueden ser categorizadas en pruebas de pequeños y grandes esfuerzos. Esfuerzos pequeños se usan cuando solamente un pequeño porcentaje de la deformación es requerida para romper la muestra y son usados comúnmente en pruebas fundamentales. Esfuerzos grandes se usan para deformar la muestra hasta el punto de cambio estructural permanente. Entre las pruebas en las que se aplican esfuerzos pequeños se encuentran las oscilatorias, de relajación y de determinación del rendimiento del esfuerzo (Tabilo-Munizaga y Barbosa-Cánovas, 2005).

Existen pruebas reológicas dinámicas para evaluar las propiedades de los sistemas viscoelásticos, a partir de las cuales se obtienen parámetros que permiten definir los distintos comportamientos reológicos de los fluidos en función de la composición química y la estructura de los alimentos; entre ellos podemos mencionar al módulo de almacenamiento (G'), que es una medida de la energía de deformación almacenada en la muestra durante la aplicación de esfuerzos cortantes y representa el comportamiento elástico de la muestra; el módulo de pérdida (G''), que es una medida de la habilidad del alimento para disipar energía, es indicativo de la ruptura de la estructura y representa el carácter viscoso de la muestra. Si G' es mayor que G'' , el material se comportará predominantemente como un sólido; esto es, las deformaciones pueden ser

esencialmente elásticas o recuperables. En contraste, si G'' es mayor que G' , la energía usada para deformar el material es disipada por el flujo y el material se comporta predominantemente como líquido (Tabilo-Munizaga *et al.*, 2005; Steffe, 1996). El factor de cedencia ($\tan \delta = G''/G'$) revela la proporción del comportamiento viscoso al elástico ante la deformación y puede ser igual a cero cuando se observa una respuesta elástica o igual a infinito cuando se trata de una respuesta viscosa. Si el valor es mayor a cero y menor a infinito, el material muestra respuesta viscoelástica (Tabilo-Munizaga y Barbosa-Cánovas, 2005).

La región viscoelástica lineal (RVL) es el intervalo de amplitud en el cual G' y G'' permanecen constantes (al menos tres puntos experimentales) y se puede determinar a través de barridos de esfuerzo o deformación. Al aumentar los esfuerzos y deformaciones la RVL llega hasta un punto de inflexión al cual se le considera como región viscoelástica no lineal (n-RVL), en donde la viscoelasticidad lineal queda fuera, y la muestra es deformada a tal grado que las uniones secundarias de las moléculas son destruidas (Steffe, 1996).

Lobato-Calleros *et al.*, (2009) definen a las características reológicas de un material como el grupo de características físico-mecánicas que surgen de la forma en la cual sus componentes estructurales están arreglados en una macro y microestructura; estas características además están relacionadas a la deformación, la desintegración y el flujo del material bajo una fuerza y se miden objetivamente a través de funciones de masa, tiempo y distancia. De esta forma, los alimentos presentan un amplio rango de atributos mecánico-sensoriales que están ligados a su macro y microestructura, y a la forma en que son percibidos por el consumidor, siendo ésta un parámetro importante para su aceptación o rechazo.

2.5. Yogur

Tamime y Robinson (1999) mencionan que el yogur es considerado un alimento lácteo fermentado producido a partir de uno o más ingredientes lácteos (crema, leche, leche parcialmente descremada y leche descremada) fermentados por bacterias ácido lácticas (BAL) que contienen: *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* y *Streptococcus salivarius* subs. *thermophilus* (Figura 2.10), así mismo mencionan que el yogur antes de la adición

de sabores, debe contener 3.25 % de grasa láctea y no menos de 8.25 % de sólidos no grasos, una acidez por arriba del 0.9 % expresada como ácido láctico. Este producto lácteo deberá llevar un tratamiento térmico antes de la fermentación con el fin de destruir todo microorganismo patógeno viable y proporcionar una larga vida de anaquel al producto. Yogures bajos en grasa y libres de grasa láctea tienen una descripción similar, con contenidos de grasa láctea de 0.5 a 2 % y por debajo de 0.5 %, respectivamente.

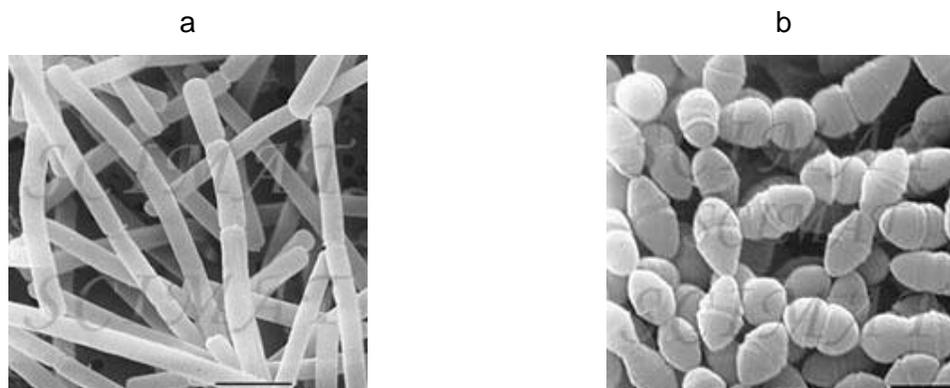


Figura 2.10. Bacterias ácido lácticas (BAL): *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* (a) y *Streptococcus salivarius* subs. *thermophilus* (b).

Los cultivos lácticos liberan factores estimulantes de crecimiento durante el periodo de incubación. *L. bulgaricus* aporta nutrientes esenciales para *S. thermophilus*, por ejemplo, aminoácidos y este último produce compuestos similares al ácido fórmico que estimulan el crecimiento y desarrollo de *L. bulgaricus*; es así como se explica la simbiosis de estas dos bacterias lácticas (BAL) (Figura 2.11). Por otro lado, es relevante que la tasa de producción de ácido láctico por ambas BAL aumente al hacerlo la temperatura de incubación, alcanzándose el máximo entre los 40-45 °C. *S. thermophilus* es inicialmente más activo que *L. bulgaricus* en lo que respecta a la producción de ácido; sin embargo, se recomienda una relación 1:1 entre estas BAL y una incubación a 42 °C utilizando 2 % de inóculo (Tamime y Robinson, 1999).

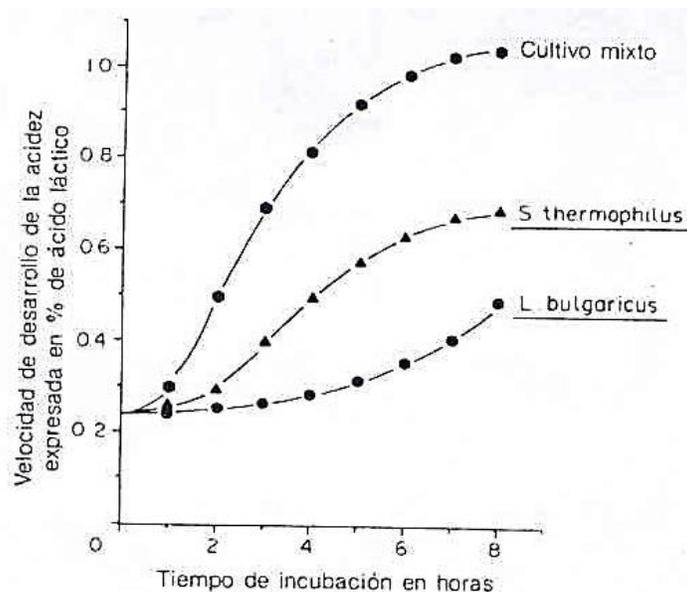


Figura 2.11. Velocidad de crecimiento de flora termófila (% ácido láctico) en función del tiempo (Tamime. 1991).

El yogur se comporta como un fluido no newtoniano dependiente del tiempo (tixotrópico y viscoelástico) y tipo gel, en el que G' es más alto que G'' y su viscosidad, estructura, interacciones físico-químicas intermoleculares y su resistencia a la sinéresis puede variar dependiendo del proceso de elaboración, del tratamiento térmico, del tipo de cultivo, de la cantidad y tipo de proteína (caseína y proteínas de lactosuero) y grasa (saturada e insaturada) y del uso de estabilizantes. No obstante, de forma general un yogur con alto contenido de proteína presenta incremento en su carácter elástico (G'), debido al aumento de interacciones proteína-proteína, las cuales producen menor propensión al rompimiento y evitan la movilidad del agua (sinéresis) (Sandoval-Castilla *et al.*, 2004). Por su parte, el contenido de grasa láctea saturada de los yogures juega un papel importante en la salud del consumidor y en las propiedades mecánico-sensoriales del producto. El consumo de cantidades elevadas de grasas saturadas a través de la dieta, es considerado como un factor de riesgo para las enfermedades del corazón; constituyendo estas últimas la principal causa de muerte en el mundo. Por otro lado, la grasa láctea genera un yogur cremoso, con excelente cuerpo, en comparación con un yogur bajo en grasa; de tal forma que se destaca la importancia de la reducción del contenido de colesterol y grasas saturadas, sin afectar la calidad mecánico-sensorial del producto (Sandoval-Castilla *et al.*, 2004).

Los yogures bajos en grasa exhiben una estructura frágil y propiedades texturales pobres; por ello es común la adición de ingredientes que mejoren su textura y reduzcan la separación de lactosuero, tales como: (a) subproductos de leche (leche descremada en polvo, caseinato de sodio o concentrados de proteína de lactosuero); (b) sustitutos de grasa de naturaleza sacárida o proteínica (Sandoval-Castilla *et al.*, 2004) y (c) emulsiones múltiples (Lobato-Calleros *et al.*, 2009), las cuales permiten el encapsulamiento y liberación controlada de compuestos bioactivos de naturaleza liposoluble e hidrosoluble. En todos los casos el contenido de grasa láctea del yogur fue sólo parcialmente reducido, obteniéndose productos con alguna o varias características mejoradas (sinéresis, firmeza, elasticidad, etc.).

2.6. Cinética de liberación de compuestos bioactivos

La liberación de compuestos bioactivos a partir de distintos sistemas coloidales puede ocurrir a través de uno de los siguientes procesos: (a) disolución, por desorción del ingrediente bioactivo adsorbido a una superficie; (b) difusión a través de la matriz o película interfacial; (c) erosión de la matriz o película interfacial, incluyendo degradación enzimática y (d) una combinación de estos procesos (Soppimath *et al.*, 2001) (Figura 2.12). Lo anterior, a través de un proceso que inicia con la ingestión de las emulsiones e involucra el efecto del jugo gástrico y la digestión de lípidos por acción de la bilis y las enzimas digestivas en el intestino (Rozner *et al.*, 2010).

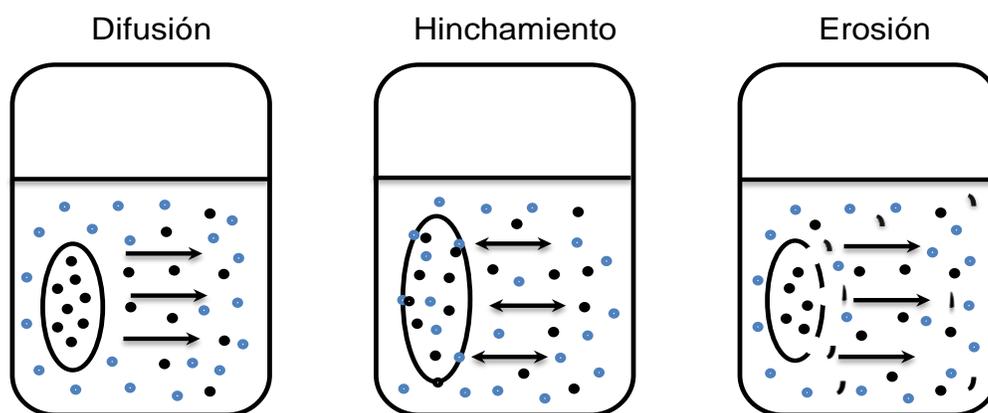


Figura 2.12. Principales mecanismos de liberación de compuestos bioactivos a partir de sistemas dispersos.

Los mecanismos cinéticos más importantes que regulan la velocidad de liberación de un ingrediente son la difusión, el hinchamiento y la erosión. Los mecanismos de difusión pueden ser descritos utilizando la segunda ley de Fick, la cual considera la forma geométrica de la matriz, el sentido del transporte (unidimensional o bidimensional) y la difusividad del sistema o constante de difusión (la cual dependerá o no de la concentración del polímero a partir de un gradiente de concentración). Los fenómenos fisicoquímicos como la disolución en agua, los esfuerzos de cizalla, la temperatura, las reacciones químicas y enzimáticas y los cambios en la presión osmótica, que ocurren durante la liberación controlada de ingredientes activos inician con pequeños gradientes de concentración agua-polímero, dando como resultado una interfase constituida por agua y agua embebida en la matriz, lo que produce cambios en la concentración del polímero y del ingrediente, debido a un incremento en las dimensiones del sistema (hinchamiento); cuando el ingrediente entra en contacto con el agua comienza a disolverse, debido al gradiente de concentración, y se difunde fuera de la matriz expandida aumentando con esto la porosidad del sistema (Andreetta, 2003 y Kalu *et al.*, 2007). Esta liberación puede ser controlada por el grado de difusión, la permeabilidad y la solubilidad de la matriz influyendo directamente en la velocidad de liberación del compuesto; dicho de otra forma, la diferencia de concentraciones entre W_1 y W_2 generará un gradiente de presión osmótica que impulsa la difusión y/o permeación de materiales a través de la membrana oleosa (Bonnet *et al.*, 2009). Por lo anterior el compuesto que se va a difundir debe ser soluble en la matriz; aunque la presión de vapor de sustancias volátiles en cada lado de la matriz puede ser la fuerza que determine la difusión. La selección de una matriz o membrana es importante; la naturaleza química, morfología y temperatura de transición, el grado de hinchamiento y de entrecruzamiento también influyen en la difusión a través de la membrana, aunque pueden disminuir la velocidad de liberación.

Se ha demostrado que los tensoactivos lipofílicos juegan un papel determinante en la liberación del ingrediente activo atrapado, funcionando como transportadores de sustancias a través de la fase oleosa; dicho mecanismo de liberación es conocido como transporte facilitado (Kralj y Brečević, 1998).

Existen en la bibliografía diferentes modelos matemáticos para describir la cinética de liberación de ingredientes activos, cada uno de ellos varía dependiendo del mecanismo de liberación que domine el proceso, la naturaleza de la matriz que contiene a la sustancia

activa, el tamaño de las gotas y la estabilidad de la emulsión (Andreetta, 2003). El procedimiento general consiste en obtener valores experimentales de liberación y posteriormente proponer una serie de modelos matemáticos para interpretar dicho mecanismo (Tabla 2.5); el modelo al que se ajusten mejor los datos experimentales y que explique mejor los resultados experimentales es el que se utilizará para describir el proceso.

Tabla 2.5. Principales modelos matemáticos empleados para describir la liberación de compuestos bioactivos a partir de emulsiones múltiples (Korsmeyer *et al.*, 1983; Higuchi, 1963; Jiménez-Alvarado *et al.*, 2009; Andreetta, 2003).

Modelos	
Orden cero	$(C_{w_2}) = (C_{w_2})_0 - kt$
Primer orden	$\ln(C_{w_2}) = \ln(C_{w_2})_0 - kt$
Segundo orden	$\frac{1}{(C_{w_2})} = \frac{1}{(C_{w_2})_0} + kt$
Korsmeyer y Peppas	$(C_{w_2}) = kt^n$
Higuchi	$(C_{w_2}) = kt^{1/2}$

Donde (C_{w_2}) es la concentración del activo en W_2 al tiempo t ; $(C_{w_2})_0$ es la concentración inicial del activo en W_2 ; k es la constante de velocidad de liberación; n es un exponente que indica el mecanismo de liberación de la cafeína a través de la matriz biopolimérica. El mecanismo de liberación es por difusión Fickiana cuando $n \leq 0.45$, no-Fickiana (anómalo) cuando $0.45 < n < 0.89$ (Chime *et al.*, 2013).

2.6.1. Condiciones gastrointestinales

La vía de administración oral de bioactivos representa grandes ventajas tales como el ser la forma más inocua, cómoda y relativamente barata; sin embargo, se pueden presentar diversos problemas durante la trayectoria de los compuestos bioactivos. Ganong (2010), menciona que las partes del tubo digestivo a donde llega la comida o sus residuos son en orden, boca, esófago, estómago, duodeno, yeyuno, ileón, ciego, colon, recto y ano; de tal

forma los alimentos son descompuestos y mezclados con diversas secreciones originadas tanto en la boca (donde la saliva sirve para hidratar el bolo alimenticio, es hipotónica y presenta un pH alrededor de 7.0), el estómago (mezcla de ácido clorhídrico, moco, pepsina y pepsinógenos) y otras partes del propio tubo digestivo, como en órganos que desembocan en el mismo, como el páncreas (que contiene tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasa A y B que degradan péptidos y proteínas de forma específica, lipasas pancreáticas, ácidos y sales biliares, fosfolipasa A2 que degradan lípidos) y la vesícula biliar (ácidos y pigmentos biliares y otras sustancias disueltas en una solución electrolítica alcalina semejante al jugo pancreático). Todas estas secreciones neutralizan el ácido gástrico, con lo cual se incrementa el pH del contenido duodenal de 6.0 a 7.0. En función del pH, se predice que las sustancias que actúen como ácidos débiles se absorberán mejor en el estómago (pH de 1 a 2), que en el duodeno o yeyuno (secreciones de las mucosas, el jugo pancreático y la bilis; pH de 3 a 6) y sucede lo contrario en el caso de bases débiles (alcalinos). Sin embargo, el epitelio del estómago está revestido por una capa de mucosa gruesa y su área de superficie es pequeña, las vellosidades del duodeno y yeyuno, poseen una enorme área superficial (aproximadamente 200 m²). Por esta razón, la rapidez e índice de absorción de la sustancia activa en el intestino será mayor que en el estómago, incluso si el activo se encuentra predominantemente ionizado en el intestino y no lo está en el estómago (en su mayor parte). Así mismo existe una gran cantidad de flora bacteriana (sobre todo en el colon y en el intestino grueso) que está directamente relacionada con el grado de protección contra las infecciones inducidas por patógenos. Por último, son expulsados del cuerpo los residuos de los alimentos que no pueden absorberse, junto con restos celulares y productos terminales liposolubles del metabolismo que son excretados por la bilis, en vez de hacerlo en la orina. La bilis es la única vía por la cual, el organismo puede eliminar el colesterol, aunque también la bilis tiene funciones transportadoras y metabólicas del hígado.

En lo que se refiere a la ingestión de alimentos, se sabe que la absorción en las vías gastrointestinales es regida por factores tales como el área de superficie de absorción, la corriente sanguínea en el sitio de absorción, el estado físico del alimento (solución, suspensión o producto sólido), la hidrosolubilidad y la concentración del ingrediente activo en el sitio que se absorbe (Goodman y Gilman, 1997).

El tiempo de transición desde que entra la comida hasta llegar al ciego es de aproximadamente 4 h, y todas las porciones no digeridas entran al colon en un lapso de 8 a 9 h. En promedio, los primeros residuos de las comidas atraviesan el primer tercio del colon en 6 h, el segundo tercio en 9 h y llegan a la porción terminal del colon en 12 h, y desde el colon hasta el ano, el transporte es más lento (Ganong, 2010). Lo anterior, nos muestra una idea del porque algunos compuestos activos al ser ingeridos de forma directa presentan su actividad fisiológica en lapsos cortos de tiempo, por lo que el uso alternativo de métodos de encapsulamiento, como las EM estabilizadas con complejos biopoliméricos permite controlar la liberación del compuesto bajo limitadas y específicas condiciones ambientales; de tal forma es posible modular el tipo de encapsulamiento para que el bioactivo se libere en algún sitio específico de acción.

3. JUSTIFICACIÓN

Existe gran interés a nivel mundial por el diseño, el desarrollo y la caracterización de sistemas coloidales multifuncionales novedosos, que preserven la funcionalidad y aseguren la liberación de bioactivos en su sitio activo en cantidad adecuada para ejercer su efecto benéfico, y al mismo tiempo no comprometan los atributos de calidad del alimento al que sean incorporados. Las emulsiones múltiples (EM's) son sistemas coloidales, que presentan como ventajas, por un lado la posibilidad de encapsulamiento de compuestos de naturaleza hidrosoluble y liposoluble simultáneamente y por otro lado, su funcionalidad como sustitutos de grasas saturadas. Sin embargo, la formulación de EM's requiere de la estructuración de películas interfaciales, tales que contribuyan a su estabilidad y aseguren su funcionalidad. En adición, la tendencia actual para la formulación de alimentos se dirige hacia el empleo de ingredientes naturales, de bajo costo y accesibles comercialmente.

Por otra parte, ingestas de cafeína entre 37.5 y 100 mg/día están asociadas con mejoramiento en resistencia física, función cognitiva, estado de alerta y ánimo. La incorporación de la cafeína en forma directa, afecta el sabor de los alimentos, además de que su absorción es rápida y por tanto sus efectos fisiológicos en el cuerpo no perduran durante el tiempo requerido. Asimismo, diferentes efectos sobre la salud han sido atribuidos a los péptidos derivados de proteínas de lactosuero, incluyendo propiedades antimicrobianas, disminución de la presión arterial y de colesterol sanguíneo, actividades antitrombóticas y antioxidantes, aumento de absorción de minerales y efectos inmunomodulatorios, entre otros.

Con base en lo expuesto, resulta entonces interesante evaluar la funcionalidad de EM's formadas y estabilizadas mediante complejos binarios y ternarios de proteína de lactosuero (W), péptidos de lactosuero (P) y carboximetilcelulosa (C), formados a través de interacciones electrostáticas, usando cafeína como bioactivo modelo.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar la cinética de liberación de cafeína a partir de emulsiones múltiples estabilizadas por complejos solubles binarios y ternarios de carboximetilcelulosa (C), proteínas de lactosuero (W) y péptidos de proteínas de lactosuero (P).

4.2. Objetivos particulares

1. Determinar las condiciones óptimas de pH y relación en peso W:C y W:P para la formación de complejos solubles.
2. Determinar la morfología, el tamaño de gota, la estabilidad, las propiedades reológicas y la eficiencia de encapsulamiento de cafeína en las EM's.
3. Evaluar la liberación de cafeína a partir de las EM's incorporadas en yogur bajo en grasa láctea, bajo condiciones de almacenamiento y gastrointestinales simuladas.

5. HIPÓTESIS

EM's ($W_1/O/W_2$) estables, con propiedades viscoelásticas adecuadas para la protección y liberación controlada de cafeína, pueden ser obtenidas mediante la formación de películas interfaciales constituidas por complejos solubles W-C, P-C y W-C-P. En adición, estas EM's pueden representar un potencial promisorio para sustituir la grasa láctea (saturada) del yogur.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Materiales

Como fase oleosa de las emulsiones primarias se utilizó aceite de canola (AC; Maravilla, Aceites, Grasas y Derivados, S.A. de C.V., México). Ésteres de ácidos grasos de poliglicerol y poliricinoleato (R; Grindsted® PGPR 90, Danisco S. A. de C. V., México) y lecitina de soya (L; Alquimia Mexicana, S de R. L. México) se usaron como agentes emulsificantes de las emulsiones primarias. Cafeína (Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V., Toluca, Estado de México, México), se usó como bioactivo modelo. La fase acuosa externa estuvo compuesta por complejos biopoliméricos de concentrado de proteína de lactosuero (W; 83.7 g de proteína/100 g y 6.4 g de grasa/100 g, Hilmar 8000®, Hilmar, CA, EUA); carboximetilcelulosa (C; CMC® CEROL; viscosidad de 50 000 mPa s para una solución de 2g/100g de solución a 60 rpm y 25 °C; Grupo Dermet, S. A. de C. V. México, México) y péptidos o hidrolizado de W (P; 80.5 g proteína/100g y 5.8 g de grasa/100g, 17 g de péptidos mayores a 20 kDa, 15.6 g de péptidos entre 5 y 20 kDa y 67.2 g de péptidos menores a 5 kDa por 100 g, Hilmar 8360®, Hilmar, CA, EUA). En la electroforesis de P se usó un marcador de peso molecular de 3.4 a 100 kDa (Page Ruler Unstained Low Range Protein Ladder, Thermo Scientific, Rockford, IL. USA EUA), dodecil sulfato de sodio, acrilamida, ácido tricloroacético azul de coomassie Brillan Blue R-250 (Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V., México) y metanol y ácido acético glacial (J. T. Baker, S. A. de C. V., México). Para la elaboración de yogur se utilizó leche descremada en polvo (0.01 g de grasa/100 g, Lactomix, DILAC, S. A. de C. V., México), leche entera en polvo (28 g de grasa/100 g, Reny Picot, DILAC, S. A. de C. V., México) y cultivos lácticos liofilizados (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, MY800 LYO Danisco, S. A. de C. V., México). Para el estudio de liberación bajo condiciones gastrointestinales se utilizaron sales biliares de porcino (B8631, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA). Para la examinación de microestructura de yogur se utilizó agar (Bacto-Agar, DIFCO, Detroit MI, EUA), glutaraldehído (25 % v/v, Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Alemania), tetraóxido de osmio (Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V., México), fosfato de sodio mono y dibásico (J. T. Baker, S. A. de C. V., México) y etanol absoluto (Laboratorios Laitz S.A. de C.V., México). Ácido clorhídrico e hidróxido de sodio fueron comprados a J. T. Baker, S. A. de C. V. (México, México). El agua usada en los experimentos fue doblemente destilada y desionizada.

6.2. Metodología

El diseño experimental del presente trabajo se basó en el siguiente diagrama de flujo (Figura 6.1).

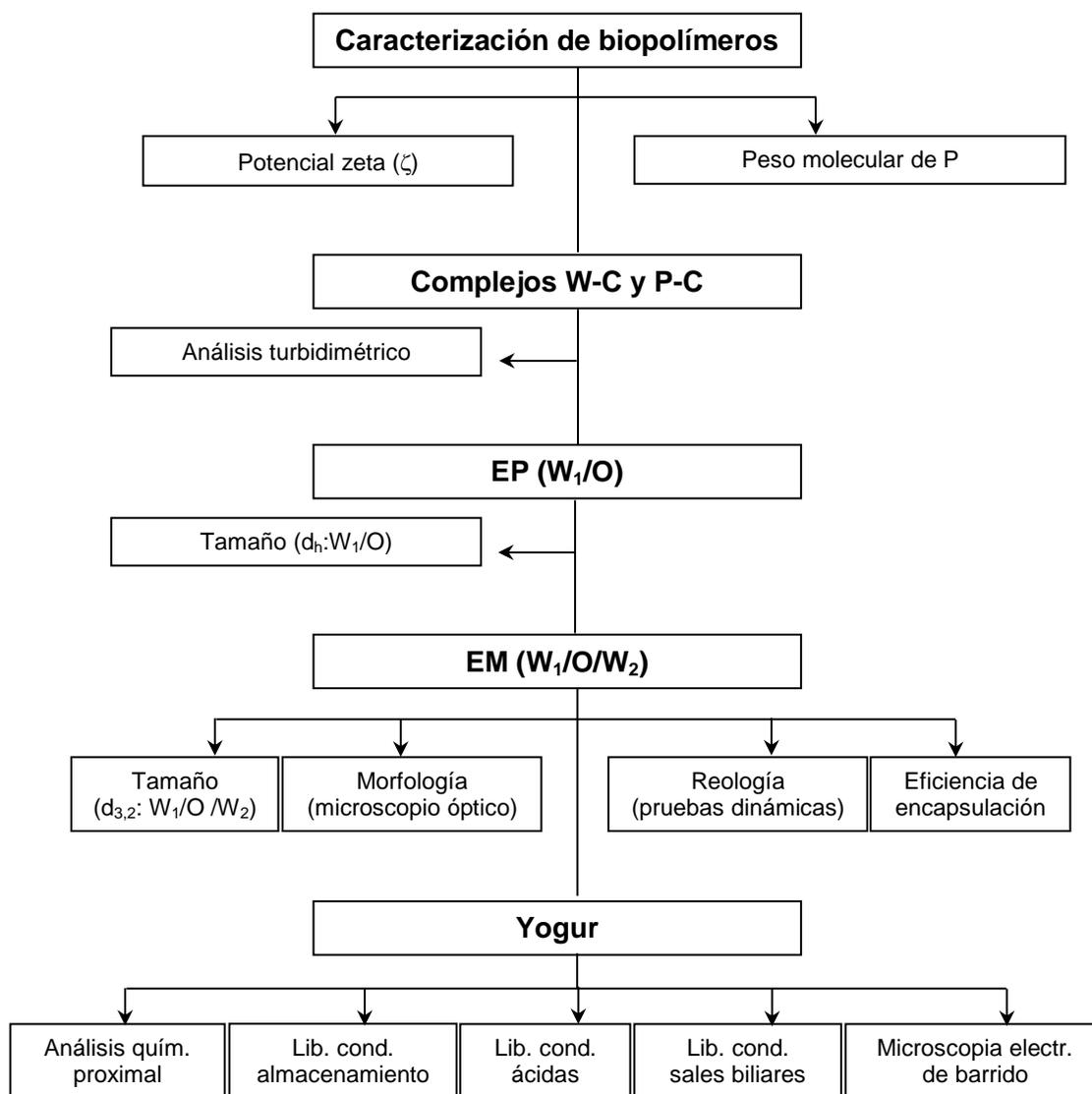


Figura 6.1. Diagrama experimental.

6.2.1. Determinación del peso molecular de los péptidos

La determinación de los pesos moleculares de los péptidos contenidos en P se realizó mediante análisis electroforético, siguiendo la metodología propuesta por Schägger y Von Jagow (1987), usando la unidad de electroforesis BIO–RAD (Equipment Bio–Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA). Para la separación de las subunidades de proteína se combinaron 2 mg de P con 800 μ L de buffer dodecil sulfato de sodio (SDS), la muestra se incubó durante 5 min a $90 \pm 1^\circ\text{C}$ y se centrifugó a 9000 rpm (centrífuga Spectrafuge 24D, Labnet International, Inc. NS. EUA) por 5 min.

En un gel de separación de 20 % v/v de acrilamida, se aplicaron de 13-15 μ L de las disoluciones de P en cada carril y en adición, se colocó un MPM de 3.4 a 100 kDa. La electroforesis se corrió a 45 mA/gel por 4 h; posteriormente los geles se fijaron en una solución de ácido tricloroacético al 12 % v/v, se tiñeron en una solución de azul de Coomassie (2.5 % p/v en una mezcla 50:45:5 de metanol, agua y ácido acético glacial respectivamente), se enjuagaron con agua destilada y finalmente se tomó su imagen en el escáner GS-710 (Calibrated Imaging Densitometry; BioRad Laboratories, CA, EUA).

Los pesos moleculares aproximados de las bandas del gel de electroforesis de P, se estimaron usando como referencia el marcador de peso molecular, para lo cual se calcularon las distancias recorridas de las bandas de cada una de las subunidades de dicho patrón y de P.

6.2.2. Determinación de los valores de potencial zeta (ζ) de los biopolímeros como función del pH

Con la finalidad de determinar el intervalo de pH en el cual los biopolímeros potencialmente interactuarían, se obtuvieron curvas de ζ versus pH. Los valores de ζ de dispersiones acuosas de W (2 g/100g), C (0.5 g/100g) y P (2 g/100g), en un intervalo de pH de 2 a 8, se determinaron con un equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, RU). El pH de las dispersiones de los biopolímeros se ajustó mediante la adición de HCl 0.1 N o NaOH 0.1 N.

6.2.3. Evaluación de la formación de complejos W-C y P-C

Para obtener un panorama general del fenómeno de acomplejamiento entre los biopolímeros (W:C y P:C), se determinó la turbidez generada por la interacción de ambos biopolímeros como función de la relación en peso proteína-polisacárido ($R_{P:S}$) y el pH de interacción (pH_i), siguiendo el procedimiento descrito por Hernández-Marín *et al.* (2013): (a) se prepararon mezclas W:C y P:C, en las cuales se mantuvo constante la concentración de C (0.5 g/100g) y se varió la de W y P. Para el caso de W:C, los valores de la $R_{P:S}$ variaron de 2:1 a 6:1 y para P:C variaron de 6:1 a 10:1; (b) se ajustó el valor de pH de las dispersiones en un intervalo de 2 a 6 con HCl 0.1 N; (c) las mezclas se dejaron reposar 24 h bajo refrigeración ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) para que alcanzaran el equilibrio; (d) las mezclas se centrifugaron a 4500 rpm por 5 min (Centrífuga J600, SOL-BAT, México) y (e) se midió la transmitancia (% T) de los sobrenadantes a 400.5 nm (espectrofotómetro Spectronics Genesys 5 UV/Vis, Spectronic Unicam, Rochester, NY, EUA.), a esta longitud de onda los complejos solubles mostraron la menor transmitancia. La turbidez se calculó a partir de los datos de transmitancia (% T) usando la Ecuación 6.1:

$$\tau = \frac{1}{L} \ln \frac{I_o}{I_t} \quad \text{Ecuación 6.1}$$

Donde: τ : turbidez (cm^{-1}), L: longitud óptica (1 cm), I_t : intensidad de luz transmitida (% T), I_o : intensidad de luz incidente (100) (Skoog *et al.*, 1995).

A partir de los resultados obtenidos de esta fase experimental, se seleccionaron los valores de $R_{P:S}$ y pH_i que proporcionaron la máxima formación de complejos solubles (CS). Estas condiciones fueron posteriormente aplicadas para la formación de las EM's usando CS para su estabilización. El criterio de selección se basó en los valores de turbidez; es decir, a mayor turbidez mayor formación de CS.

6.2.4. Preparación de la emulsión primaria (EP)

Se formularon diez EP's agua-en-aceite (W/O), que variaron en la fracción en peso de la fase acuosa ($\phi_1 = 0.4$ y 0.5) y en la relación en peso de los emulsificantes L y R ($R_{L:R}$), manteniendo una concentración total de 4 g de emulsificantes/100 g de EP. Los valores de $R_{L:R}$ fueron: 0:1, 0.06:0.94, 0.13: 0.87, 0.25: 0.75 y 0.50: 0.50). Las EP's se codificaron como: EP_{x,y}, donde $x = \phi_1$ y $y = R_{L:R}$. Para la preparación de las EP's, las cantidades

correspondientes de L incorporaron a la fase acuosa y R a la fase oleosa respectivamente; posteriormente la fase acuosa se adicionó gota a gota al AC, con ayuda de un homogeneizador (Ultra-turrax® T50 basic IKA Works, Inc. Wilmington, DE, EUA) operado a 6 400 rpm durante 5 min (Lobato-Calleros *et al.*, 2008), manteniendo la temperatura debajo de 30 °C con un baño de hielo. A partir de los resultados de diámetro hidrodinámico (dh) evaluado durante 1 y 7 días de su elaboración (apartado 6.2.6) se seleccionó la EP_{0.4, 0.13:0.87} para la preparación de las EM, debido a que fue la que presentó un menor tamaño de gota y menor variación de éste en el tiempo evaluado.

6.2.5. Variaciones y preparación de emulsiones múltiples (EM)

Todas las EM's se prepararon a temperatura ambiente (20±2°C) usando un procedimiento de emulsificación de dos etapas (Lobato *et al.*, 2008). En la primera etapa, la emulsión primaria (EP) agua en aceite (W₁/O) se obtuvo usando una fracción en peso (ϕ_1) de 0.4. La fase acuosa dispersa se obtuvo a partir de 39.24 g de agua destilada, 0.52 g de lecitina y 0.24 g de cafeína por cada 100 g de EP, esta se añadió gota a gota a la fase oleosa formada por 56.52 g de AC, 3.48 g de R por cada 100 g de EP, usando un homogeneizador Ultra-Turrax® T50 (IKA Works, Inc., Wilmington, DE, EE.UU.) operado a 6400 rpm durante 5 min. En la segunda etapa la EP se re-emulsificó en diferentes soluciones de complejos binarios (W:C y P:C) y ternarios (W:C:P), donde la R_{P:S} (3:1 para W:C, 8:1 para P:C y 1.5:1:4 para W:C:P (resultado expresado en el apartado 7.3)) (Tabla 6.1) y el pH (4.2) fueron seleccionados de acuerdo a la máxima formación de CS, de acuerdo a los resultados obtenidos mediante turbidimetría (Hernández-Marín *et al.*, 2013). La EP fue incorporada gota a gota en una fracción en peso (ϕ_2), de 0.3 a las distintas W₂, con la ayuda del mismo homogenizador operado a 4 000 rpm durante 5 min. Los códigos de las EM's fueron los siguientes: EM_{W:C}, EM_{W:P} y EM_{W:C:P}. Todas la EM's fueron almacenadas a 4 °C hasta su análisis.

Tabla 6.1. Composición de la fase acuosa externa de las EM's.

Emulsión	W (%)	C (%)	P (%)	Concentración total de biopolímeros (%)
EM _{W:C}	1.5	0.5	-	2.0
EM _{W:C:P}	0.75	0.5	2.0	3.25
EM _{P:C}	-	0.5	4.0	4.5

6.2.6. Determinación del tamaño de gota de las emulsiones y su variación con el tiempo

Se determinó el diámetro hidrodinámico medio (d_h) de las EP's después de 1 y 7 días de almacenamiento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$, mediante el equipo Malvern Zetasizer Nano ZS90.

Se evaluó el diámetro volumétrico-superficial medio ($d_{3,2}$) de las EM's después de 1 y 21 días de almacenamiento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$, mediante el equipo Mastersizer 3000 (APA3000; Malvern Instruments, Worcestershire, RU).

Las morfologías de las EP's y las EM's se evaluaron con un microscopio óptico (Olympus BX45, Olympus Optical Co., Tokio, Japón) acoplado a un sistema analizador de imagen (cámara digital Olympus C3030, Olympus América Inc., EUA y paquete Image Pro-Plus versión 4.5, L.P., SilverSpring, EUA). Las micrografías seleccionadas presentan una magnificación de 100x.

6.2.7. Análisis reológico de las EM's

El comportamiento reológico de las EM's se evaluó mediante pruebas oscilatorias usando el reómetro Physica MCR 301 (Physica Meßtechnik GmbH, Stuttgart, Germany) con una geometría cono-plato (CP50-1-SN5550) con 50mm de diámetro y un ángulo de 1° y una distancia gap de 0.05 mm a una temperatura de $5 \pm 1^\circ\text{C}$. Muestras de EM's (~2 mL) se sometieron a barridos de amplitud aplicando una deformación de 0.01 a 100 % a una frecuencia de 1 Hz. Los valores de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') se calcularon mediante el software del equipo (Rheoplus/32 V2.62).

Las gráficas de G' y G'' vs % Deformación se analizaron para determinar las regiones viscoelástica lineal (RVL) y no lineal (n-RVL). La RVL se consideró como la región con al menos tres puntos experimentales iguales y consecutivos de G' durante el aumento de la deformación. Por otra parte se consideró al último punto experimental de la RVL como el punto inicial de la n-RVL. Todas las mediciones reológicas se realizaron después de 1 y 21 días de elaboradas las EM's (Lobato-Calleros *et al.*, 2009).

6.2.8. Método usado para la cuantificación de cafeína

La cuantificación de cafeína se realizó mediante la metodología propuesta por Mumin *et al.* (2006), con ligeras modificaciones, usando un cromatógrafo de alta resolución (HPLC; Agilent Technologies/HP 1100, CA, EUA) y una columna Nucleosil 100 S C(18) (150 x 4.6mm I.D. y tamaño de partícula 5 micras (Agilent HPLC Columns, Zorbax, Alemania). La detección espectrofotométrica se realizó a 273.16 nm, en una fase móvil de agua:acetonitrilo (75:25) (v/v), a un flujo de 1.0 mL/min, midiendo la concentración expresada como área bajo la curva a un tiempo de retención de 2.634 min, correspondiente al pico de la cafeína. La curva de calibración se realizó a partir de siete soluciones de cafeína con concentraciones de 0.01, 0.02, 0.04, 0.05, 0.075, 0.1 y 0.15 µg/mL (Fig. 6.2), de las cuales se inyectó 1 µL y se realizaron tres determinaciones.

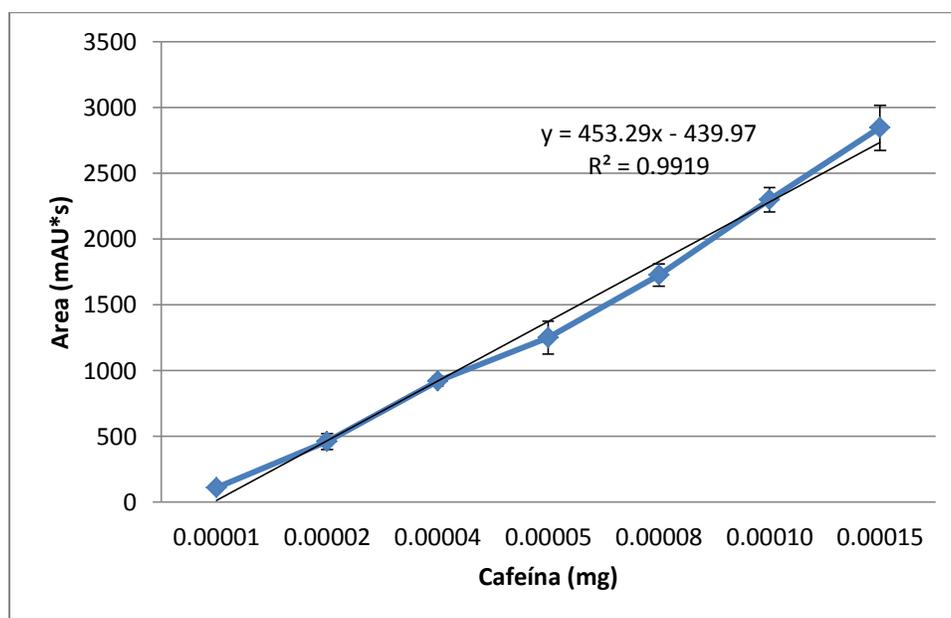


Figura 6.2. Curva de calibración de cafeína para HPLC.

6.2.9. Eficiencia de encapsulación de la cafeína

La eficiencia de encapsulación de la cafeína (EE) en las EM's fue determinada después de 1 día de almacenamiento. EE fue definida como el porcentaje de cafeína atrapada dentro de la fase acuosa interna de las EM's (Ecuación 6.2):

$$\% EE = \frac{TC - NEC}{TC} * 100 \quad \text{Ecuación 6.2}$$

Donde: %EE: Eficiencia de encapsulación de cafeína, TC: cafeína total contenida en toda la EM (mg) y NEC: cafeína no encapsulada presente en la fase acuosa externa (mg).

Muestras de las EM's (10 g) se rompieron mediante calentamiento a 85 °C durante 5 min y sonicación a 70 % de amplitud por 5 min (Ultrasonic Processor, model VCX 130PB 500, Newtown, CT, EUA). El rompimiento de las EM's fue verificado mediante observación directa usando el microscopio. Centrifugación a 4500 rpm durante 5 min permitió la separación de las fases oleosa y acuosa de las EM's rotas. La fase acuosa fue filtrada a través de acrodiscos de 0.45 µm (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, EUA) y entonces la cantidad total de cafeína (TC) liberada a partir de las EM's fue determinada mediante el procedimiento descrito. Por separado 10 g de cada emulsion fueron centrifugados a 1800 rpm durante 10 min para permitir la separación de las gotas de aceite de la fase acuosa externa, la cual fue filtrada a través de acrodiscos de 0.45 µm acrodiscos y entonces la cafeína no atrapada (NEC) fue medida por HPLC.

6.2.10. Preparación de los yogures

Un yogur completo en grasa láctea control (YC) se preparó a partir de leche reconstituida conteniendo 25.0±0.1 g L⁻¹ de grasa láctea y 120±1 g L⁻¹ de sólidos totales. Tres yogures reducidos en grasa láctea, los cuales fueron posteriormente incorporados con las variaciones de las EM's (83.5 g L⁻¹) fueron elaborados a partir de leche rehidratada conteniendo 11.0 ± 0.1 g de grasa láctea L⁻¹ y 120 ± 1 g de sólidos totales L⁻¹, y fueron codificados como: Y_{W:C}, Y_{W:C:P} y Y_{P:C}. Las EM's proporcionaron a los yogures reducidos en grasa: 14 g de aceite de canola L⁻¹ y 200 mg de cafeína L⁻¹.

Se prepararon lotes de un litro de cada variación de yogur, por triplicado, usando un diseño experimental completamente al azar. Leche entera y descremada en polvo se mezclaron para obtener el contenido de grasa deseado y se rehidrataron en agua purificada durante 24 h a 4 ± 1°C, para permitir la completa hidratación de los polvos. Después de este lapso la leche reconstituida se calentó a 40 ± 1°C y se adicionó con 60 g L⁻¹ de azúcar. La leche entonces se pasteurizó a 85 ± 1°C durante 20 min, se enfrió a 45 ±

1°C e inoculó con 0.03 g L⁻¹ de cultivo liofilizado. El proceso de fermentación de los lotes de leche se realizó a 45 ± 1°C hasta alcanzar una acidez de 80 - 85 °D. Los yogures se almacenaron a 4 ± 1°C durante 24 h; después de este periodo cada una de las EM's (83.5 g L⁻¹) se añadió a los geles de los yogures reducidos en grasa respectivos, aplicando un batido suave con ayuda de un mezclador mecánico (Caframo, RZR1, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, EUA) a 500 rpm durante 1 minuto. El yogur completo en grasa control también se batió usando las mismas condiciones (Sandoval-Castilla *et al.*, 2010). Las variaciones de yogures se almacenaron a 4 ± 1°C hasta su análisis.

6.2.11. Análisis químico proximal de los yogures

Después de 7 días de elaborados, los yogures se analizaron en función del contenido de proteína por el método Kjeldahl, grasa por el método de Gerber, acidez por el método de titulación y humedad por secado en estufa (AOAC, 1995).

6.2.12. Cinética de liberación de cafeína durante el almacenamiento de los yogures

La cinética de liberación de cafeína contenida en el yogur durante su almacenamiento fue determinada a partir de la cuantificación de cafeína en W₂, mediante la metodología mencionada, después de 1, 7, 14 y 21 días de almacenamiento. Muestras (10 g) de cada yogur fueron centrifugadas a 1800 rpm durante 10 min para permitir la separación de las gotas de aceite de la fase acuosa externa, la cual fue filtrada a través de microdiscos de 0.45 µm y entonces la cafeína liberada fue cuantificada por HPLC. El porcentaje de cafeína liberada durante el almacenamiento (% CL_{almacenamiento}) fue calculado como la relación entre cafeína liberada y cafeína atrapada ×100. Las curvas % cafeína liberada contra tiempo se ajustaron a los modelos de liberación de Orden cero, Primer y Segundo orden, Korsmeyer-Peppas y Higuchi, considerando como criterio de selección el grado de ajuste (R²) (Korsmeyer *et al.*, 1983, Higuchi, 1963, Jiménez-Alvarado *et al.*, 2009; Andretta, 2003).

6.2.13. Cinética de liberación de la cafeína bajo condiciones gastrointestinales simuladas

La liberación de cafeína a partir de las EM's contenidas en los yogures (almacenados 1 día) bajo exposición a condiciones ácidas y biliares fue estudiada separadamente. Muestras de cada yogur (100 g) se colocaron en matraces erlenmeyer conteniendo 100 mL de solución gástrica simulada (pH 2.3) con 0.1 N HCl (Pimentel-González *et al.*, 2009). Las muestras se incubaron a 37 °C por 3 h en un Precision Scientific 360 orbital shaker bath (Cole Parmer, Chicago, IL, EUA). Muestras de 10 g fueron tomadas cada 30 min y centrifugadas a 1800 rpm por 10 min. El sobrenadante fue filtrado a través de acrodiscos de 0.45 µm acrodisks, y la cafeína fue cuantificada por HPLC.

Para evaluar el efecto de las sales biliares sobre la liberación de cafeína, 100 g de yogur fueron adicionados a 100 mL de una solución de sales biliares (0.3 g/100 mL, pH 6.8), y la mezcla fue incubada 2.5 h a 37 °C con agitación constante de 100 rpm (Sandoval-Castilla *et al.*, 2010). Muestras de 10 g se tomaron cada 30 min y se procesaron como ya se mencionó. Los porcentajes de cafeína liberada bajo condiciones ácida (% CR_{ácidas}) y sales biliares (% CR_{sales biliares}) se calcularon como se indicó.

Las curvas % de cafeína liberada contra tiempo obtenidas fueron ajustadas a los modelos de liberación siguiendo el mismo procedimiento descrito en la sección 6.2.12.

6.2.14. Microestructura del yogur

El estudio de la microestructura de los yogures se realizó mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Muestras de yogur (~0.3 g) con 7 días de almacenamiento se extrajeron de aproximadamente 1 cm por debajo de la superficie y se colocaron en una dispersión acuosa de agar (3 % p/v) a 45 ± 1°C; se dejó solidificar la mezcla a 20 ± 1°C y se cortó en cubos de aproximadamente 1 cm³, los cuales se colocaron en una disolución de glutaraldehído al 2 % v/v en buffer de fosfatos (0.1 M, pH 7.2) a 4 °C por 24 h para fijar las proteínas. Después de este tiempo, las muestras se retiraron del glutaraldehído, se enjuagaron con la disolución de buffer de fosfatos (0.1 M, pH 7.2) y se sumergieron en disolución de tetraóxido de osmio al 1 % p/v en buffer de fosfatos por 3 h, para estabilizar los lípidos. Las muestras se lavaron con la disolución de buffer de fosfatos y se deshidrataron mediante su inmersión en soluciones de etanol (30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90

% v/v), permaneciendo 1 h en cada una de ellas y su inmersión en etanol absoluto por 24 h. Posteriormente, las muestras se secaron a punto crítico en un equipo Technics CPA II Critical Point Dryer (Tousimis, Rockville, MD, EUA), se montaron en soportes de aluminio, con cinta adhesiva doble, usados para MEB y se cubrieron con oro en un equipo Fine Coat Jeol-JFC-1100 (Jeol Ltd., Akishima, Japón). La microestructura de las muestras se examinó con un microscopio electrónico de barrido de alto vacío (Jeol JSM-035 (Jeol Ltd., Akishima, Japón) a 20 kV y magnificaciones de 1000x, 2500x y 5000x (Sandoval-Castilla *et al.*, 2004).

6.2.15. Análisis de datos

Todas las mediciones se realizaron por triplicado y se reportaron valores medios \pm desviación estándar. Los valores de tamaño de gota y propiedades reológicas de las EM's, así como la composición química del yogur se sometieron a Análisis de Varianza (ANOVA) de Clasificación Simple, aplicando en los casos pertinentes una comparación de medias mediante la prueba de diferencia mínima significativa (LSD; por sus siglas en inglés Least Significant Difference) para determinar la posible existencia de diferencias significativas entre las medias. El nivel de significancia se estableció en $p \leq 0.05$ y para el análisis se utilizó el paquete Statgraphics Plus software (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc., Cambridge, MA).

Los datos experimentales de la liberación de cafeína durante el almacenamiento y bajo condiciones gastrointestinales simuladas fueron ajustados a distintos modelos de liberación: Orden cero, Primero y Segundo orden, Korsmeyer-Peppas y Higuchi y el mejor ajuste se determinó mediante la estimación del coeficiente de correlación R^2 .

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Peso molecular de los péptidos de hidrolizado de proteína de lactosuero

El análisis electroforético en gel SDS-PAGE al 20 % de acrilamida reveló que el carril de P presenta bandas correspondientes a 82, 10, 8, 5 y 3.4 kDa (Figura 7.1) y al menos el 60.3 ± 1.1 % de las proteínas son péptidos con pesos moleculares menores a 5 kDa, lo cual se aproxima a la ficha técnica del producto, en el cual se reportan 32.6 % de péptidos mayores a 5 kDa y 67.2 % de péptidos menores a 5 kDa. Lo anterior comprueba que el trabajo se está realizando con fracciones peptídicas, las cuales pueden presentar actividad biológica.

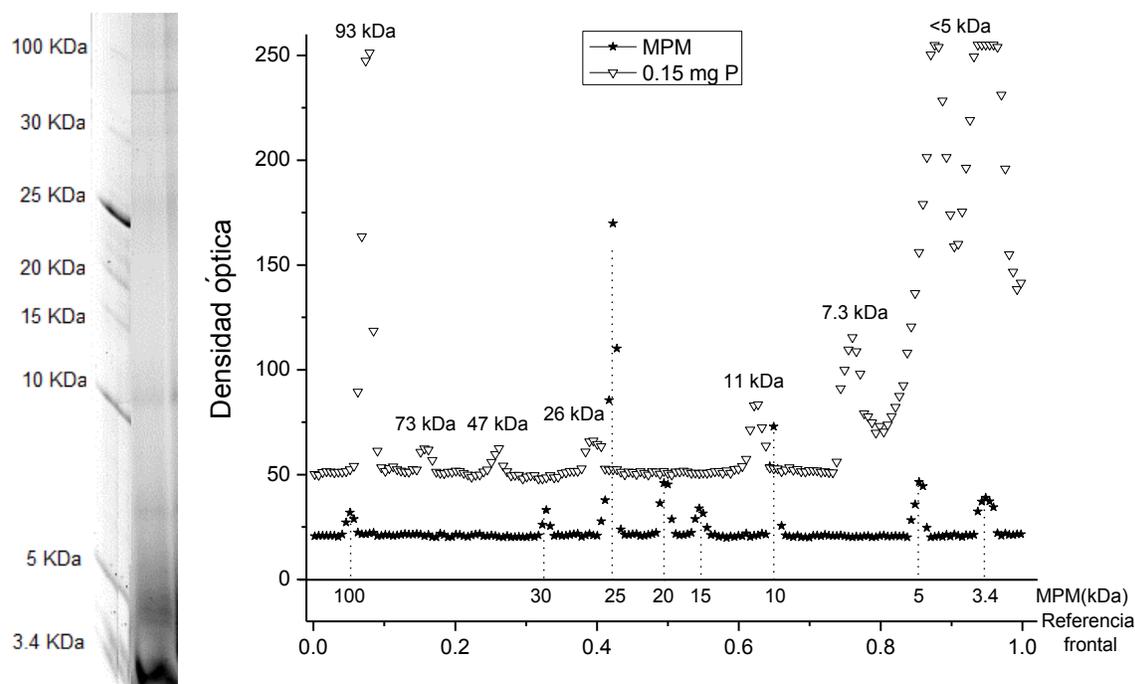


Figura 7.1. Perfil de distribución de pesos moleculares de MPM y 0.15 mg de P en gel SDS-PAGE 20% v/v.

7.2. Valores de ξ de W, P y C como función del pH

Los valores de ξ vs pH (Figura 7.2) de las dispersiones de C fueron negativos en todo el intervalo de pH estudiado, variando de -6.06 ± 1.8 mV a pH = 2 hasta -105.0 ± 3.3 mV a pH = 6, los valores de ξ de C se redujeron con incrementos en la acidez de sus dispersiones, debido a la ionización (protonación) de sus grupos carboxilato ($-\text{COO}^-$) en

grupos carboxílico (-COOH) (Hernández-Marín *et al.*, 2013 y Koupantsis y Kiosseoglou, 2009). Por su parte, W y P presentaron valores de ζ que variaron de 21.7 ± 6.5 mV y 21.7 ± 10.4 mV respectivamente en pH = 2 a -24.6 ± 5.7 mV y -29.3 ± 5.6 mV respectivamente en pH=8. Ambos, W y P, presentaron un valor estimado de $\zeta = 0.0$ a un pH de 4.2 ± 0.2 , pH indicativo de su punto isoeléctrico (pI). Se ha informado que el pI de W se encuentra en el intervalo de 4.2 a 5.2 en función de la composición y puntos isoeléctricos de sus proteínas (Zydney, 1998; Weinbreck *et al.*, 2004). A valores de pH superiores a 4.2, las cadenas peptídicas de W y P exhibieron carga negativa, como consecuencia de la desionización de sus grupos amonio (-NH₃⁺) en grupos amino (-NH₂); en contraste, a valores de pH menores a 4.2, las cadenas peptídicas de W y P adquirieron carga positiva como resultado de la ionización de sus grupos carboxilato (-COO⁻) en grupos carboxílico (-COOH). Los valores de ζ indican que existe una mayor diferencia estequiométrica entre los biopolímeros en un intervalo de pH de 2.5 a 3.5, obteniendo complejos insolubles o coacervados, incapaces de interactuar en la interfase aceite-agua de la EM, por lo que se sugiere un pH de 4.2 en donde podemos encontrar grupos con carga positiva que permiten su interacción con grupos negativos de C (Vinayahan *et al.*, 2010), permitiendo la formación de complejos solubles cercanos al pI, dichos complejos tienen la capacidad de interactuar con el resto de la dispersión y permitirán la estabilización de las EM's (Hernández-Marín *et al.*, 2013; Jiménez-Alvarado *et al.*, 2009 y Koupantsis y Kiosseoglou, 2009).

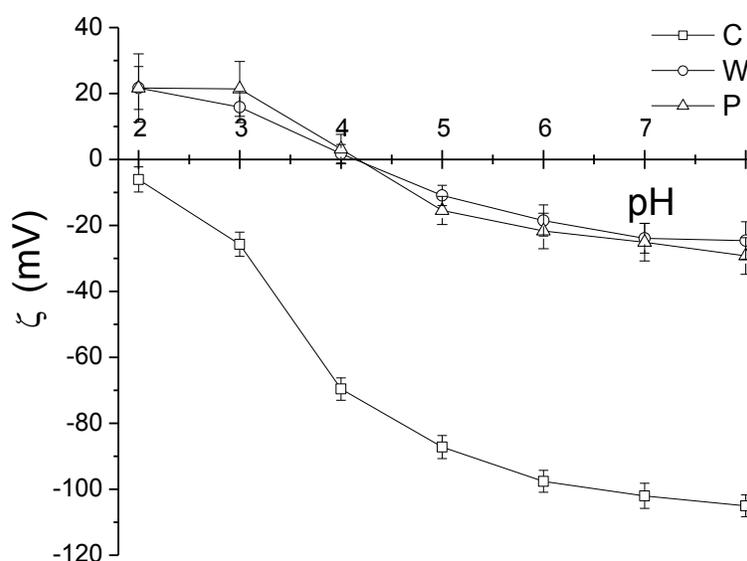


Figura 7.2. Cambios en ζ de dispersiones de C (0.5 % p/p), W (2.0 % p/p) y P (2.0 % p/p) como función del pH.

7.3. Efecto del pH y la $R_{P:S}$ sobre la formación de complejos W-C y P-C

La turbidez de una solución surge principalmente del cambio en masa y tamaño de agregados en solución; así cambios en turbidez pueden indicar la progresiva complejación entre biopolímeros, dando lugar a complejos biopoliméricos solubles e insolubles (Ru *et al.*, 2012). Soluciones con mayor turbidez poseen una mayor cantidad de macromoléculas dispersas que soluciones translúcidas. Entonces, soluciones translúcidas son un indicativo de la formación de coacervados complejos debido a su presipitación (Hernández-Marín *et al.*, 2013). Las Figuras 7.3a y 7.3b muestran los perfiles de turbidez *versus* pH entre W:C y P:C (a diferentes $R_{P:S}$), respectivamente. Todos los perfiles presentaron tendencias similares, caracterizadas por 4 regiones: una región (a) de lecturas de turbidez relativamente elevadas en un intervalo de pH aproximado entre 6.0 y 4.7 debido a la co-existencia de moléculas individuales de W, P y C, las cuales empiezan a interactuar conforme el pH disminuye. Una región (b) caracterizada por una meseta de lecturas de turbidez máximas debidas a la presencia principalmente de complejos biopoliméricos solubles, la cual ocurrió entre valores de pH de 4.7 a 4.2. Las lecturas de turbidez para W:C en estas mesetas fueron las mismas a partir de una $R_{P:S}$ de 3:1, indicando con ello que el máximo enlace entre estos dos biopolímeros fue logrado a partir de esta relación. Estos resultados también indican que incrementos en la $R_{W:C}$ no incrementan la cantidad de enlaces entre los biopolímeros. Para el caso de P:C, se obtuvo una meseta de lecturas máximas de turbidez a una $R_{8:1}$ o más elevada, no existiendo diferencias significativas entre ellas respecto a la máxima formación de complejos solubles. Por lo anterior se determinó que una $R_{3:1}$ entre W:C y $R_{8:1}$ para P:C fueron las idóneas para elaborar las EM's. Una región (c) con lecturas de turbidez bajas en un intervalo de pH de 2.5 a 3.5, por debajo del punto isoeléctrico ($pI \sim 4.2$), como resultado de la precipitación de los complejos insolubles o coacervados, los cuales son incapaces de mantenerse dispersos debido a que ocurre una fuerte interacción electrostática entre moléculas de biopolímeros con la consecuente neutralización de sus cargas y (d) un aumento de la turbidez a valores de pH menores a 2.25, atribuida a un desacomplejamiento entre W:C y P:C. Ru *et al.* (2012) mencionaron que cuando el pH decrece a valores debajo del pK_a del polisacárido, los coacervados de proteína-polisacárido se pueden disociar en complejos solubles o aún más en moléculas individuales de proteína y polisacárido, debido a cargas bajas de las cadenas de polisacárido y fuerte repulsión entre las proteínas cargadas positivamente.

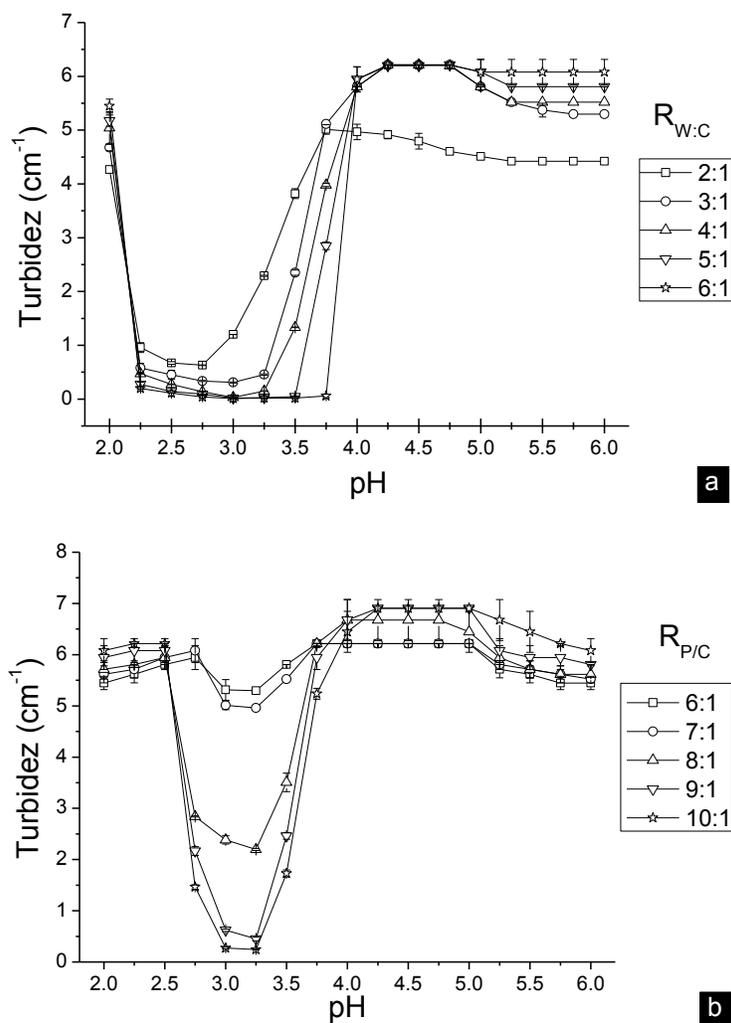


Figura 7.3. Turbidez como una función de pH para: (a) mezclas de W y C y (b) mezclas de P y C a diferentes $R_{P:C}$.

Con base en lo expuesto, las EM's se estabilizaron con: (a) complejos solubles P-C formados a una $R_{P:C}$ de 8:1 (4.0 g de P:0.5 g de C) por 100 g de W_2 ; (b) complejos solubles W-C obtenidos a una $R_{W:C}$ de 3:1 (1.5 g de W: 0.5 g de C por 100 g de W_2) y (c) complejos solubles W-C-P elaborados a partir de una $R_{W:C:P}$ de 1.5: 1: 4.0 (0.75 g de W: 0.5 g de C: 2.0 g de P) por 100 g de W_2 ; esto es, las cantidades relativas de W y P se redujeron a la mitad, debido a que su perfil de ξ fue muy cercano (Figura 7.2) con respecto a las cantidades utilizadas en los complejos W-C y P-C. Todos los complejos solubles se formaron a un pH_i de 4.2, debido a que los resultados de turbidimetría indicaron que a este pH existió interacción débil entre las proteínas y péptidos de W y P con C. Lo anterior, atribuido a la existencia de segmentos con carga positiva en las

moléculas de W y P, capaces de interactuar con los segmentos de C poseyendo carga negativa. Lo anterior se puede explicar con base en los distintos pl de las moléculas que componen tanto a W como a P (Zydney, 1998; Khwaldia *et al.*, 2004).

7.4. Tamaño de gota de las emulsiones primarias y su variación con el tiempo de almacenamiento

En la Tabla 7.1 se muestran los valores de diámetro hidrodinámico (d_h) de las EP's, después de 1 y 7 días de almacenamiento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$, se observó que la variación en la fracción dispersa (ϕ_1) y la $R_{L:R}$ afectó significativamente el tamaño de las gotas dispersas ($p < 0.05$) y que la EP elaboradas a partir de 4 % de emulsificantes con una $\phi_1 = 0.4$ y una $R_{R:L}$ de 0.13:0.87 presentó el un d_h menor y que éste no varío durante el tiempo de almacenamiento ($p < 0.05$). Por lo que debe existir un equilibrio entre los emulsificantes de tal forma que resulte en un HLB que favorezca el proceso de estabilidad de las emulsiones e impida la aglutinación, separación y/o coalescencia de las gotas. En este caso aumentos en el tamaño de gota y mayor polidispersidad.

Tabla 7.1. Valores de diámetro hidrodinámico (\pm DE) de las EP's.

Código de la emulsión	d_{hi} (inicial)	d_{hf} (final)	Relación diámetros $\frac{d_{hi} - d_{hf}}{d_{hi}} * 100$
	1 d (μm)	7 d (μm)	
EP _{0.4, 0:1}	0.45 \pm 0.03 ^{dA}	0.50 \pm 0.01 ^{bcA}	-11.19
EP _{0.4, 0.06:0.94}	0.36 \pm 0.01 ^{eA}	0.38 \pm 0.01 ^{dB}	-8.01
EP_{0.4, 0.13:0.87}	0.27\pm0.01^{fA}	0.28\pm0.01^{eA}	-5.82
EP _{0.4, 0.25:0.75}	0.35 \pm 0.03 ^{eA}	0.44 \pm 0.04 ^{cdB}	-25.84
EP _{0.4, 0.5:0.5}	0.79 \pm 0.04 ^{bA}	0.99 \pm 0.05 ^{aB}	-24.26
EP _{0.5, 0:1}	0.62 \pm 0.01 ^{cB}	0.55 \pm 0.01 ^{bA}	10.29
EP _{0.5, 0.06:0.94}	0.39 \pm 0.02 ^{eA}	0.38 \pm 0.03 ^{dA}	4.48
EP _{0.5, 0.13:0.87}	0.38 \pm 0.01 ^{eA}	0.36 \pm 0.02 ^{dA}	5.24
EP _{0.5, 0.25:0.75}	0.50 \pm 0.03 ^{dA}	0.43 \pm 0.04 ^{cdA}	14.11
EP _{0.5, 0.5:0.5}	1.22 \pm 0.05 ^{aB}	1.03 \pm 0.06 ^{aA}	15.11

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

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

El efecto del valor de $R_{L:R}$ sobre el tamaño de gota después 1 y 7 días de almacenamiento se puede apreciar claramente en la Figuras 7.4a y 7.4b, respectivamente. Aumentos en la fracción de L de 0 a 0.13 ocasionaron la disminución en el tamaño de gota; en contraste, incrementos en la fracción de L de 0.25 a 0.5 provocaron aumentos en el tamaño de gota y mayor polidispersidad. Así el menor tamaño de gota se obtuvo cuando $R_{L:R} = 0.13:0.87$, para ambos valores de ϕ_1 (0.4 y 0.5). En la Figura 7.5, se pueden observar las microfotografías de las EP's con valores de $R_{L:R} = 0.13:0.87$ y $R_{L:R} = 0.5:0.5$ a valores de $\phi_1 = 0.4$ y 0.5, las cuales confirman la variación en el tamaño de las gotas de agua como resultado del efecto de estos factores de preparación.

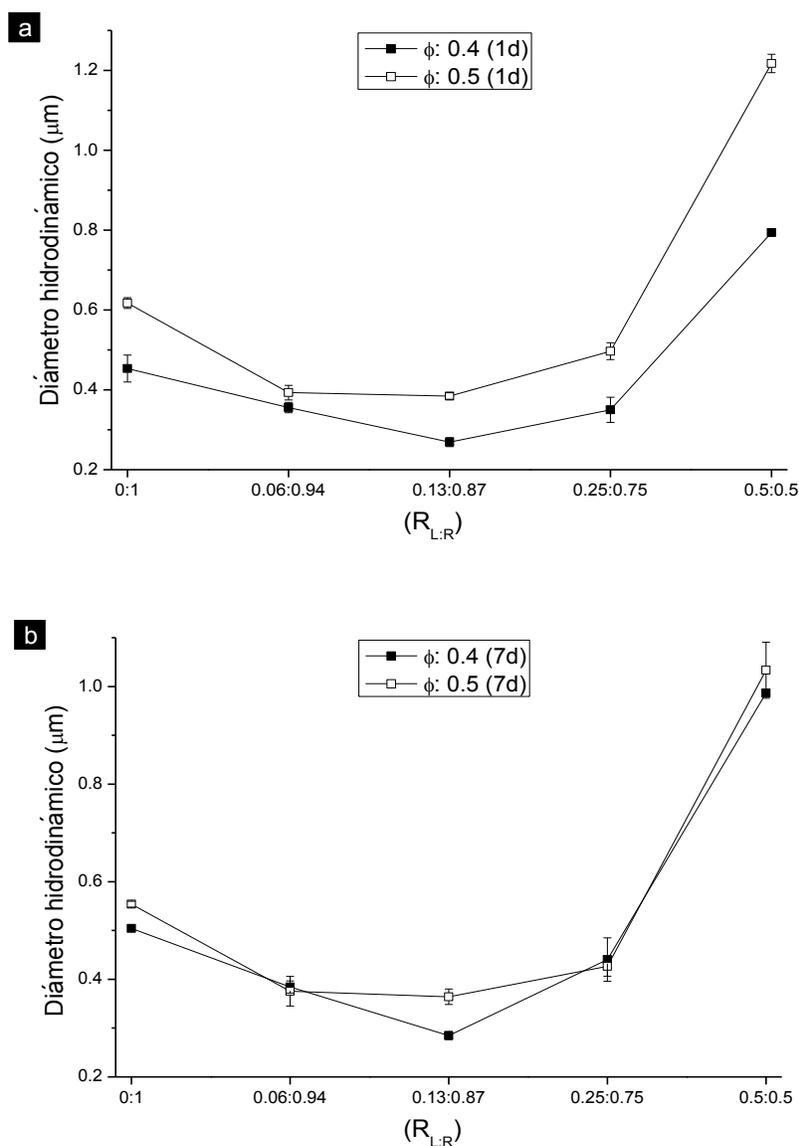


Figura 7.4. Variaciones del d_h de las emulsiones primarias como función de ϕ_1 y $R_{L:R}$ a 1 (a) y 7 días (b) de almacenamiento.

Estos resultados indican que es necesario un balance entre los emulsificantes hidrofílico (L) y lipofílico (R) para obtener tamaños de gota pequeños en las EP's, siendo mayor la fracción requerida de R que aquella de L debido a que se trata de EP's de tipo W/O (es decir, tienen una mayor cantidad de aceite) requiriéndose principalmente tensoactivos de carácter lipofílico para su estabilización. Lo anterior debido a que las moléculas liposolubles de R, con HLB de 4.3, se difunden rápidamente a la interfase agua/aceite, proyectando la mayor parte de sus moléculas hacia la fase oleosa, causando una rápida disminución de la tensión interfacial y en consecuencia la formación de gotas pequeñas. Por su parte, las moléculas hidrofílicas de L (HLB de 8) se localizan predominantemente en el lado acuoso de la interfase logrando una menor disminución en la tensión interfacial para las gotas de agua. Schmidts *et al.* (2009) elaboraron EM's con Span 80 (HLB = 4.3) y lecitina (HLB = 4 y 8) obteniendo tamaño de gota (W/O) de 0.45 μm y de 0.55 μm respectivamente, esto nos da una idea de que al usar tensoactivos de bajo peso molecular y con distinto HLB nos permitirá obtener tamaños de gota interna cercanos. Con base en lo expuesto, en la segunda etapa de la elaboración de EM's se partió de la EP_{0.4, 0.13:0.87} con el menor tamaño de partícula ($p \leq 0.05$; $0.27 \pm 0.01 \mu\text{m}$).

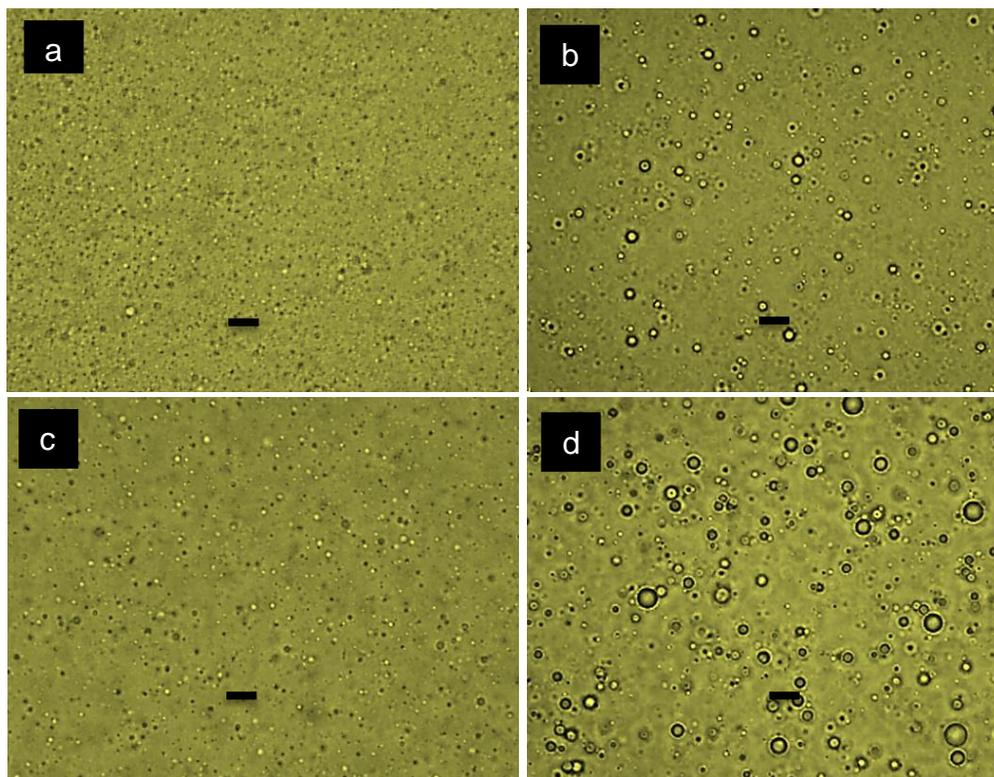


Figura 7.5. Microfotografías de las emulsiones primarias: (a) EP_{0.4, 0.13:0.87}; (b) EP_{0.4, 0.5:0.5}; (c) EP_{0.5, 0.13:0.87} y (d) EP_{0.5, 0.5:0.5}. Amplificación 100x; barra de escala = 5 μm .

7.5. Tamaño de gota de las emulsiones múltiples y su variación con el tiempo

Todas las EM's exhibieron una morfología tipo C de acuerdo a Garti (1997), es decir, que se compone por gotitas de aceite esféricas que contienen dentro de ellas un gran número de gotitas de agua (Figura 7.6), inmediatamente después de su elaboración y se mantiene esta morfología después de 21 días de almacenamiento.

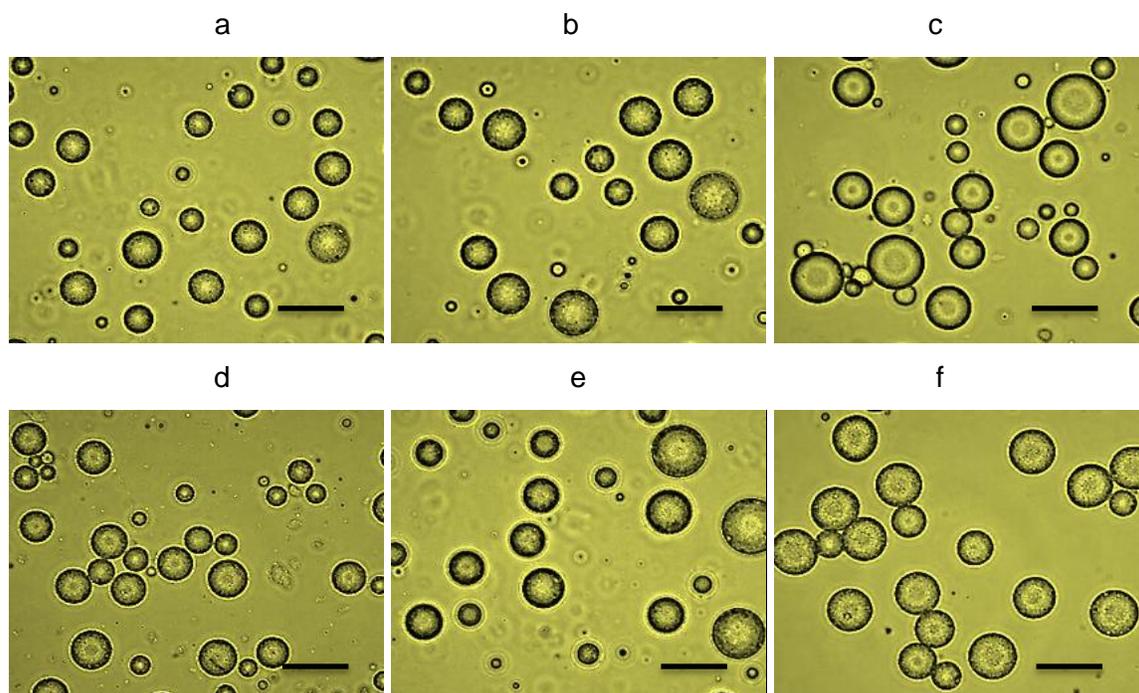


Figura 7.6. Microfotografías de las EM's en el primer día de elaboradas: (a) $EM_{W:C}$; (b) $EM_{W:C:P}$ y (c) $EM_{P:C}$ y a los 21 días de su elaboración: (d) $EM_{W:C}$; (e) $EM_{W:C:P}$ y (f) $EM_{P:C}$. Amplificación 100x; barra de escala = 5 μm .

La composición de los complejos solubles afectó el diámetro volumétrico-superficial inicial ($d_{3,2}$) de las EM's (Tabla 7.2, Fig. 7.7). El tamaño de gota exhibido de menor a mayor varió como sigue: $EM_{W:C}$ (2.84 μm) < $EM_{W:C:P}$ (3.18 μm) < $EM_{P:C}$ (3.40 μm), y fueron significativamente diferentes entre ellos. Estos resultados indican que los diferentes complejos solubles presentaron diferente actividad superficial y formaron diferentes estructuras alrededor de las gotas de aceite. Complejos intermoleculares estables resultan en agregados de diferentes tamaños, dependiendo de los biopolímeros usados para su formación. La complejación resulta en una adsorción colectiva y cooperativa en la interfase aceite-agua, lo que conlleva a la formación de películas interfaciales con mayor estructuración que la de los biopolímeros individuales (Li *et al.*, 2012). P actúa y ofrece

más sitios de anclaje para C debido a su bajo peso molecular, promoviendo su adsorción. C en turno, incrementa la adsorción de P por proporcionar más sitios electrostáticos de enlace en la proximidad de la superficie de las gotas de aceite. La adsorción cooperativa rinde películas interfaciales gruesas y compactas cubriendo las gotas de aceite, proporcionando estabilización estérica fuerte y buena emulsificación (Li *et al.*, 2012). Un proceso similar ocurre con los complejos W-C y W-C-P; las diferencias en el tamaño de gota observadas posiblemente surgen debido a diferencias en el carácter anfílico exhibido por W y P. Péptidos de mayor tamaño tienen más probabilidades de tener residuos hidrofóbicos e hidrofílicos en la misma molécula que los péptidos de menor tamaño (Adjonu *et al.*, 2014). Por lo anterior una alta cantidad de P en los complejos solubles permite una mayor difusión para su adsorción en la superficie de las gotas de aceite; sin embargo, su menor actividad superficial da lugar a fenómenos de coalescencia incipiente post-emulsificación, resultando en un tamaño de gota medio más grande. En el caso de los complejos solubles formados por W, las gotas de aceite son envueltas por una capa proteína:polisacárido que forma capas más gruesas, que proporcionan una mayor estabilización a las gotas a través de efectos estéricos (Adjonu *et al.*, 2014.). De acuerdo a Girard, *et al.*, (2002) el uso de complejos biopoliméricos proteína de lactosuero-polisacárido proporcionan una mejor estabilización a las EM's contra coalescencia que las proteínas de lactosuero. El $d_{3,2}$ después de 21 días de almacenamiento no fue significativamente diferente respecto al inicial (Figura 7.6).

Tabla 7.2. Valores de diámetro volumétrico-superficial ($d_{3,2}$) (\pm DE) de las emulsiones múltiples.

Emulsión	$d_{3,2}$ (d_i)	$d_{3,2}$ (d_f)	Relación diámetros $\frac{d_i - d_f}{d_i} * 100$
	inicial	final	
	(μ m)	(μ m)	
	1 d	21 d	
EM _{W:C}	2.84 \pm 0.1 ^{aA}	2.76 \pm 0.1 ^{aA}	2.81
EM _{W:C:P}	3.18 \pm 0.1 ^{bA}	3.09 \pm 0.1 ^{bA}	2.83
EM _{P:C}	3.40 \pm 0.01 ^{cA}	3.35 \pm 0.1 ^{cA}	1.57

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

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

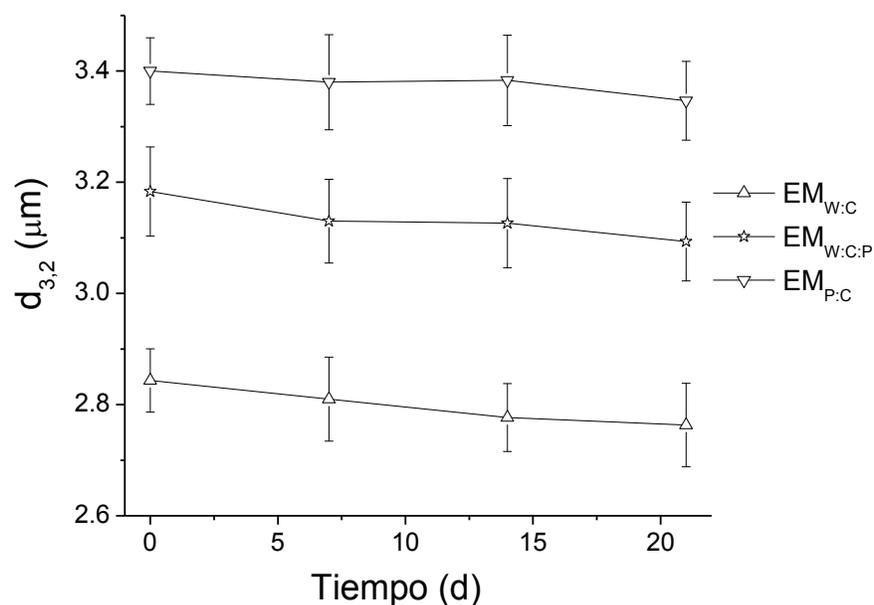


Figura 7.7. Variaciones del diámetro $d_{3,2}$ de las EM's con el tiempo de almacenamiento.

7.6. Propiedades reológicas de las EM's

Los resultados de las mediciones dinámicas de las EM's se expresaron en términos de módulo de almacenamiento o elástico (G') y módulo de pérdida o viscoso (G'') como función del % de deformación (Figuras 7.8a y 7.8b) G' es una medida de la energía almacenada elásticamente durante la deformación periódica; mientras que G'' está asociado con la disipación o pérdida de energía como flujo viscoso (Murillo *et al.*, 2011). Los resultados indican que la respuesta viscoelástica de las EM's es dependiente de la naturaleza de la película interfacial adsorbida alrededor de las gotas de aceite y del % de deformación. Todas las EM's mostraron perfiles similares caracterizados por una región viscoelástica lineal (RVL) exhibiendo un valor de G' más o menos constante a bajo % de deformación, seguida por una inflexión pronunciada de G' a deformaciones mayores (n-RVL). La existencia de una RVL en el espectro mecánico se ha relacionado con la formación de una red tridimensional que atrapa las gotas de aceite (Quintana *et al.*, 2002). Después de 1 día de almacenamiento las $EM_{W:C}$ presentaron los valores más altos de G' (3.30 ± 0.1 Pa) en la RVL, seguido por $EM_{W:C:P}$ (2.63 ± 0.1 Pa) > $EM_{P:C}$ (2.32 ± 0.1 Pa). Los valores de G'' en la RVL fueron en orden descendente: $EM_{W:C}$ (3.98 ± 0.1 Pa) > $EM_{P:C}$ (2.95 ± 0.1 Pa) = $EM_{W:C:P}$ (2.74 ± 0.1 Pa). El valor relativo de los módulos viscoelásticos exhibidos por las EM's indica la existencia de fenómenos complejos entre

complejos solubles adsorbidos y no adsorbidos, su tamaño y forma, y conformación adoptada en el solvente, los cuales influenciaron su desarrollo estructural. Cuando W predominó en los complejos, las EM's mostraron valores superiores de G' y G'' . Cuando W estuvo ausente y P estuvo presente en el complejo soluble, G' fue menor. Todas las EM's presentaron valores de G'' mayores a los de G' durante todo el intervalo de deformación estudiado, por lo que pueden clasificarse como emulsiones con comportamiento reológico predominantemente viscoso; donde las interacciones moleculares fueron débiles y la red estructural pudo reorganizarse fácilmente en función del % de deformación (Bortnowska *et al.*, 2014). El comportamiento y los valores de los módulos viscoelásticos se mantuvieron sin cambios significativos durante los 21 días de almacenamiento ($p \leq 0.05$), indicativo de la alta estabilidad estructural de las EM's, bajo condiciones cuasi-estacionarias. Sin embargo, en la práctica las EM's se someten a grandes deformaciones, más allá de las que se encuentran en la RVL; por ejemplo, durante su consumo y a través de su tránsito gastrointestinal, por lo que es conveniente caracterizar su comportamiento en la n-RVL en la cual se simula este tipo de deformaciones. El % de deformación al cual G' mostró la inflexión más pronunciada varió en orden descendente de la siguiente forma: $EM_{W:C}$ (20.4 %) > $EM_{W:C:P}$ (13.7 %) > $EM_{P:C}$ (9.2 %). El valor de G' de mayor a menor, siguió el mismo orden en la RVL y n-RVL.

Las curvas de amplitud de las EM's a uno y 21 días de su elaboración muestran que la RVL de todas las muestras soporta diferentes porcentajes de deformación (Tabla 7.3), sin embargo, el análisis de G' y G'' (Figura 7.8a y 7.8b) se determinó a un porcentaje de deformación de 0.85%, debido a que en esta zona todas las EM's mostraron una RVL uniforme, es decir, que en esta región las propiedades reológicas de las EM's fueron independientes de la deformación o del esfuerzo aplicados (Murillo *et al.*, 2011). Por su parte, las $EM_{W:C}$ y $EM_{P:C}$ exhibieron valores $G' < G''$ bajo cualquier % de deformación y presentando un comportamiento reológico predominantemente viscoso, obteniendo cambios en la composición y formación de películas interfaciales con distintas estructuras y propiedades mecánicas, lo cual abre la posibilidad de modular dichas propiedades de acuerdo a la funcionalidad requerida en las EM's (Tabilo-Munizaga y Barbosa-Cánovas, 2005).

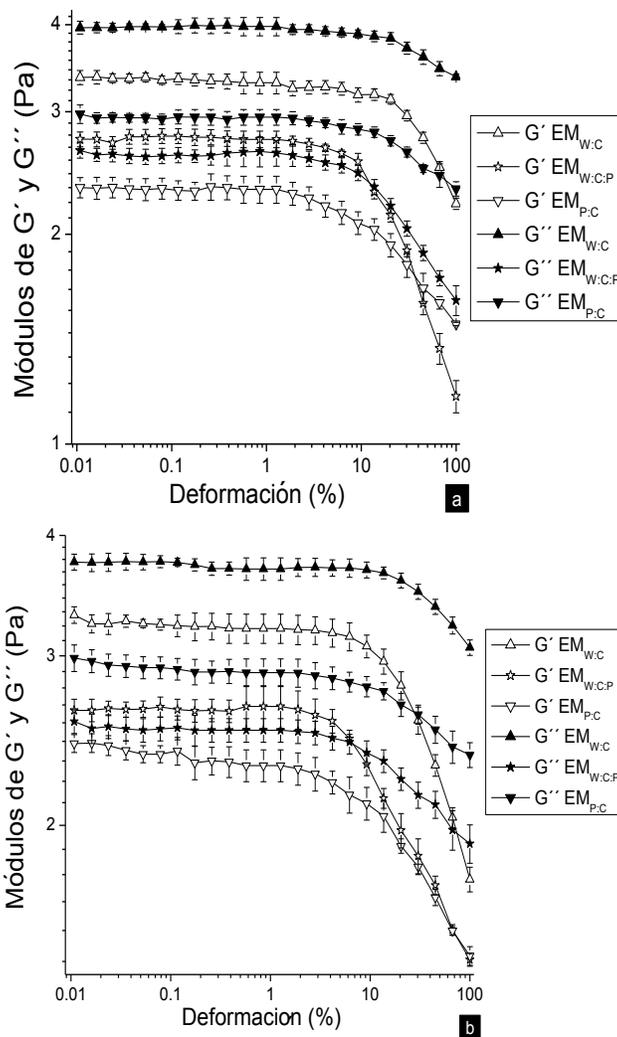


Figura 7.8. Variaciones de G' y G'' de las emulsiones múltiples elaboradas a 1 día (a) y 21 días (b) de elaboradas como función de la deformación.

Tabla 7.3. Valores medios de G' y G'' (\pm DE) de emulsiones múltiples en la Región Viscoelástica Lineal.

Emulsión	G'	G''	G'	G''
	(Pa)	(Pa)	(Pa)	(Pa)
	1 día		21 días	
EM _{W:C}	3.30±0.1 ^{cA}	3.98±0.1 ^{bA}	3.20±0.1 ^{bA}	3.69±0.1 ^{cA}
EM _{W:C:P}	2.74±0.1 ^{bA}	2.63±0.1 ^{aA}	2.66±0.1 ^{aA}	2.51±0.1 ^{aA}
EM _{P:C}	2.32±0.1 ^{aA}	2.95±0.1 ^{aA}	2.31±0.1 ^{aA}	2.88±0.1 ^{bA}

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

A Superíndices indican que las medias no difieren significativamente ($p \leq 0.05$).

Gauthier *et al.* (1993), menciona que las proteínas del suero presentan una gran solubilidad, además de mostrar una menor capacidad emulsificante respecto a las caseínas debido a su estructura globular, por lo que, es necesario el uso de metodologías que permitan la desnaturalización o desdoblamiento de su estructura y las hagan más disponibles. La hidrólisis enzimática, el calor y los medios ácidos son métodos que permiten mejorar las propiedades superficiales de las proteínas debido a que estos procesos les permiten dejar atrás su estructura secundaria (por desdoblamiento) y obtener fracciones peptídicas con mejores propiedades emulsificantes debido al aumento en el carácter hidrofílico (por la exposición de grupos carboxilo) e hidrofóbico (en función de la cadena residual de los aminoácidos apolares) y por lo tanto aumentar su uso en la industria alimenticia. Sin embargo, si el grado de hidrólisis en las proteínas no es controlado, se perdería por completo el poder emulsificante. Gauthier *et al.* (1993) menciona que existe una correlación positiva entre la actividad superficial y la longitud del péptido obtenido tras la hidrólisis, así mismo menciona que péptidos con cadenas residuales $R > 20$ carbonos han demostrado tener un alto poder emulsificante y propiedades interfaciales y que en general los péptidos tienen mejores propiedades emulsificantes a pH ácidos. Sin embargo, al comparar la composición de aminoácidos de W y P nos damos cuenta que W contiene una mayor concentración de aminoácidos apolares (alanina, glicina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano y valina) que P y por tanto, podemos deducir que tiene mejores propiedades emulsificantes Gauthier *et al.* (1993).

7.7. Eficiencia de encapsulación de la cafeína

La eficiencia de encapsulación (EE) de cafeína fue significativamente diferente para las distintas EM's, variando de acuerdo a la Tabla 7.4 indicando que la EE está directamente relacionada con el tamaño de la gota de las EM's, es decir, cuanto mayor sea el tamaño de la gota de aceite, mayor será el volumen efectivo de la fase dispersa de W_1 , y por tanto mayor fue la cantidad de cafeína atrapada.

Tabla 7.4. Eficiencia de encapsulación en W_1 (\pm DE) de las EM.

Emulsión	EE (%)
EM _{W:C}	85.3 \pm 0.3 ^a
EM _{W:C:P}	88.2 \pm 0.6 ^b
EM _{P:C}	91.1 \pm 0.1 ^c

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

7.8. Composición química y sinéresis de los yogures

Los yogures difirieron significativamente en el contenido de humedad y proteína, como resultado de su formulación inicial, sin embargo, el contenido de grasa ($2.5 \pm 0.1\%$) y sólidos totales ($12 \pm 0.1\%$) no obtuvo diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los distintos tratamientos (Tabla 7.5). El porcentaje de proteína fue mayor ($p \leq 0.05$) en los yogures reducidos en grasa láctea incorporados con las EM's, en comparación con aquel presente en el YC, debido a la contribución de proteína proporcionada por W y P presentes en los complejos solubles usados para estabilizar las EM's. La cantidad de EM L-1 incorporada a los yogures reducidos en grasa láctea proporcionó una cantidad de AC equivalente a aquella de grasa láctea que se disminuyó en la leche usada para su elaboración; por tanto todos los yogures presentaron contenidos grasos comparables. Las variaciones de yogur exhibieron diferencias ($p \leq 0.05$) en su acidez después de 1 y 21 días de elaborados, esto fue atribuido a la acidez proporcionada por la adición de los complejos biopoliméricos que estabilizaron a las EM's, los cuales presentaban pH's de 4.2; así mismo esto se confirma debido a que todos los yogures presentaron una acidez de 85°D antes de agregar los complejos y esta se modificó de inmediato al ser mezclada con las EM's como se muestra en los datos del primer día de la Tabla 7.5; por otra parte; la adición de los complejos no influyo en los cambios de acidez durante el almacenamiento del yogur, ya que todos los tratamientos presentaron un cambio equivalente a $2.0 \pm 0.2^{\circ}\text{D}$ durante los 21 días de almacén.

La sinéresis en el yogur no es deseable y se produce cuando la red de la proteína muestra una baja capacidad de retención de agua (Keogh y O'Kennedy, 1998). El $Y_{W:C}$ presentó el menor grado de sinéresis en contraste con el resto de los yogures, e incluso con el YC, el cual presentó mayor grado de sinéresis ($p \leq 0.05$). Los resultados expuestos indican que la sustitución de los glóbulos de grasa láctea por gotas de EM, rindió que yogures con estructura menos susceptible a la expulsión de lactosuero y con mayor capacidad de retención de agua debido a la utilización de los biopolímeros con capacidad estabilizante (C) (Castillo *et al.*, 2004).

Tabla 7.5. Composición química, acidez y sinéresis (\pm DE) de los yogures.

Yogur	Humedad (%)	Proteína (%)	Acidez ($^{\circ}$ D)		Sinéresis (%)	
			1	21	7	21
YC	87.2 \pm 0.2 ^b	3.1 \pm 0.1 ^a	93.5 \pm 0.4 ^{aA}	95.6 \pm 0.5 ^{aB}	6.7 \pm 0.2 ^{CA}	7.3 \pm 0.2 ^{bCB}
Y _{W:C}	85.7 \pm 0.3 ^a	3.5 \pm 0.1 ^b	101.4 \pm 0.7 ^{bA}	103.5 \pm 0.5 ^{bB}	3.8 \pm 0.1 ^{BA}	5.1 \pm 0.2 ^{aB}
Y _{W:C:P}	85.7 \pm 0.2 ^a	3.6 \pm 0.1 ^b	103.8 \pm 0.6 ^{CA}	105.7 \pm 0.7 ^{CB}	5.5 \pm 0.2 ^{BA}	7.0 \pm 0.1 ^{bB}
Y _{P:C}	85.4 \pm 0.1 ^a	3.7 \pm 0.1 ^b	103.6 \pm 0.7 ^{CA}	105.8 \pm 0.6 ^{CB}	5.9 \pm 0.1 ^{BA}	7.8 \pm 0.2 ^{CB}

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

A y B Superíndices indican que las medias no difieren significativamente ($p \leq 0.05$).

7.9. Cinética de liberación de la cafeína

La cinética de liberación de cafeína de las EM's fue evaluada en los yogures después de 1, 7, 14 y 21 días de almacenamiento a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ y bajo condiciones gastrointestinales simuladas (Tabla 7.6), en el cual podemos observar que las EM's con W presentan un menor porcentaje de cafeína liberada durante el tiempo de almacenamiento.

Tabla 7.6. Liberación de cafeína en W_2 (\pm DE) de los yogur con EM's.

Yogur	%CL _{almacenamiento}				%CL _{ácidas}	%CL _{sales biliares}
	1 D	7 D	14 D	21 D	3 H	2.5 H
Y _{W:C}	2.3 \pm 0.2 ^{aA}	3.9 \pm 0.3 ^{aB}	4.8 \pm 0.2 ^{aC}	5.3 \pm 0.2 ^{aC}	10.3 \pm 0.2 ^a	64.6 \pm 0.5 ^a
Y _{W:C:P}	2.7 \pm 0.3 ^{abA}	4.7 \pm 0.2 ^{bB}	6.0 \pm 0.2 ^{bC}	7.0 \pm 0.3 ^{bD}	14.0 \pm 0.2 ^b	69.7 \pm 0.3 ^b
Y _{P:C}	3.3 \pm 0.2 ^{CA}	5.7 \pm 0.2 ^{CB}	7.2 \pm 0.3 ^{CC}	8.3 \pm 0.2 ^{CD}	16.4 \pm 0.2 ^c	75.4 \pm 0.7 ^c

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

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

La cinética de liberación de cafeína durante el almacenamiento de los yogures decreció en el siguiente orden $Y_{P:C} > Y_{W:C:P} > Y_{W:C}$, obteniendo después de 21 días los siguientes % de cafeína liberada (% CL_{almacenamiento}): 8.3 ± 0.2 ($Y_{P:C}$) $>$ 7.0 ± 0.3 ($Y_{W:C:P}$) $>$ 5.3 ± 0.2 ($Y_{W:C}$). Estos resultados se pueden explicar con base en los siguientes factores: (a) la relación de las fases W_1/O de la EP es reconocida como uno de los factores que contribuyen a la velocidad de liberación; es decir, un aumento del contenido de agua representa mayor cantidad de gotas por unidad de EP, resultando en un aumento en la velocidad de liberación (Bjerregaard *et al.*, 1999); y (b) la naturaleza de la estructura de la interfase externa puede proporcionar mejor o peor sellado contra la liberación del

bioactivo (Benichou *et al.*, 2002). En el presente trabajo, al parecer existió una relación inversa entre los valores de G' de las EM's y la velocidad de liberación de cafeína. Valores de G' más elevados produjeron velocidades de liberación más lentas. Gotas de emulsion cubiertas con películas interfaciales más gruesas tienden a exhibir valores de G' más elevados.

La liberación de cafeína bajo condiciones ácidas y sales biliares (%CL_{ácido} y %CL_{sales biliares}, respectivamente) (Tabla 7.6) siguió la misma tendencia que aquella mostrada durante el almacenamiento de los yogures. %CL_{ácido} varió de la siguiente manera $Y_{P:C} (16.4 \pm 0.2) > Y_{W:C:P} (14.0 \pm 0.3) > Y_{W:C} (10.3 \pm 0.2)$; mientras que los valores de % CL_{sales biliares} variaron como sigue: $75.4 \pm 0.7 (Y_{P:C}) > 69.7 \pm 0.3 (Y_{W:C:P}) > 64.6 \pm 0.5 (Y_{W:C})$. Estos resultados indican que la liberación de cafeína en la presencia de sales biliares fue cuatro veces mayor que la observada bajo condiciones ácidas.

Las cinéticas de liberación de la cafeína durante el almacenamiento de los yogures y bajo condiciones ácidas y sales biliares (Figura 7.9) fueron ajustadas a distintos modelos siendo el de Korsmeyer y Peppas (Ecuaciones 6.3 y 6.4), el que presentó un mayor ajuste ($R^2=0.99$ para condiciones de almacenamiento y ácidas y $R^2=0.98$ para condiciones de sales biliares):

$$(\% CL) = kt^n \quad \text{Ecuación 6.3}$$

$$\log(\% CL) = \log(k) + n \log(t) \quad \text{Ecuación 6.4}$$

Donde %CL=es el porcentaje de cafeína liberada al tiempo t, k = es una constante cinética (con unidades de t⁻ⁿ) incorporando características estructurales y geométricas del sistema de liberación y n = es un exponente que indica el mecanismo de liberación de la cafeína a través de la matriz biopolimérica. El mecanismo de liberación es por difusión Fickiana cuando $n \leq 0.45$, no-Fickiana (anómalo) cuando $0.45 < n < 0.89$ (Chime *et al.*, 2013).

La cinética de liberación de cafeína durante el almacenamiento de los yogures estuvo asociada con valores de k más bajos (Tabla 7.7), conforme el contenido de W en los complejos solubles fue más alto. El valor de n fue menor que 0.32 en todos los casos, indicando que la liberación de cafeína ocurrió por difusión Fickiana. De manera similar, para la cinética de liberación de cafeína bajo condiciones ácidas, el valor de n estuvo por

debajo de 0.44 para todos los casos, por lo que se infiere que la difusión de cafeína fue Fickiana; a su vez, k aumentó conforme la concentración de P incrementó en los complejos solubles. Por otra parte la cinética de liberación de cafeína bajo la acción de sales biliares presentó valores de n mayores a 0.61 en todos los casos, indicativo de que la liberación de este bioactivo fue dominada por una difusión anómala no-Fickiana, en el cual la liberación no solo depende de la velocidad de disolución del sistema, sino también de los fenómenos de relajación que afectan las cadenas del material polimérico (Gambhire *et al.*, 2007). De forma semejante a lo observado durante el almacenamiento de los yogures y durante su exposición a condiciones ácidas, los valores de k aumentaron conforme la concentración de P incrementó. Los resultados de liberación de cafeína bajo la exposición a sales biliares pueden estar relacionados con el hecho de que el pH bajo condiciones biliares fue alrededor de 6.8 causando la disociación de los complejos solubles y promoviendo la formación de zonas débiles en la matriz biopolimérica, induciendo una rápida liberación anómala de cafeína.

Tabla 7.7. Parámetros del modelo de Korsmeyer y Peppas (\pm DE) para la liberación de cafeína a partir de las emulsiones múltiples incorporadas a los yogures.

Yogur	Almacenamiento		Ácidas		Sales biliares	
	K	n	k	n	k	n
Y _{W:C}	1.43 \pm 0.07 ^a	0.28 \pm 0.03 ^a	0.86 \pm 0.06 ^a	0.43 \pm 0.04 ^b	1.26 \pm 0.04 ^a	0.73 \pm 0.02 ^b
Y _{W:C:P}	1.52 \pm 0.06 ^{ab}	0.31 \pm 0.04 ^a	1.16 \pm 0.05 ^b	0.41 \pm 0.02 ^a	1.42 \pm 0.06 ^b	0.70 \pm 0.02 ^b
Y _{P:C}	1.68 \pm 0.03 ^c	0.30 \pm 0.03 ^a	1.43 \pm 0.04 ^c	0.38 \pm 0.01 ^a	1.76 \pm 0.04 ^c	0.61 \pm 0.01 ^a

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

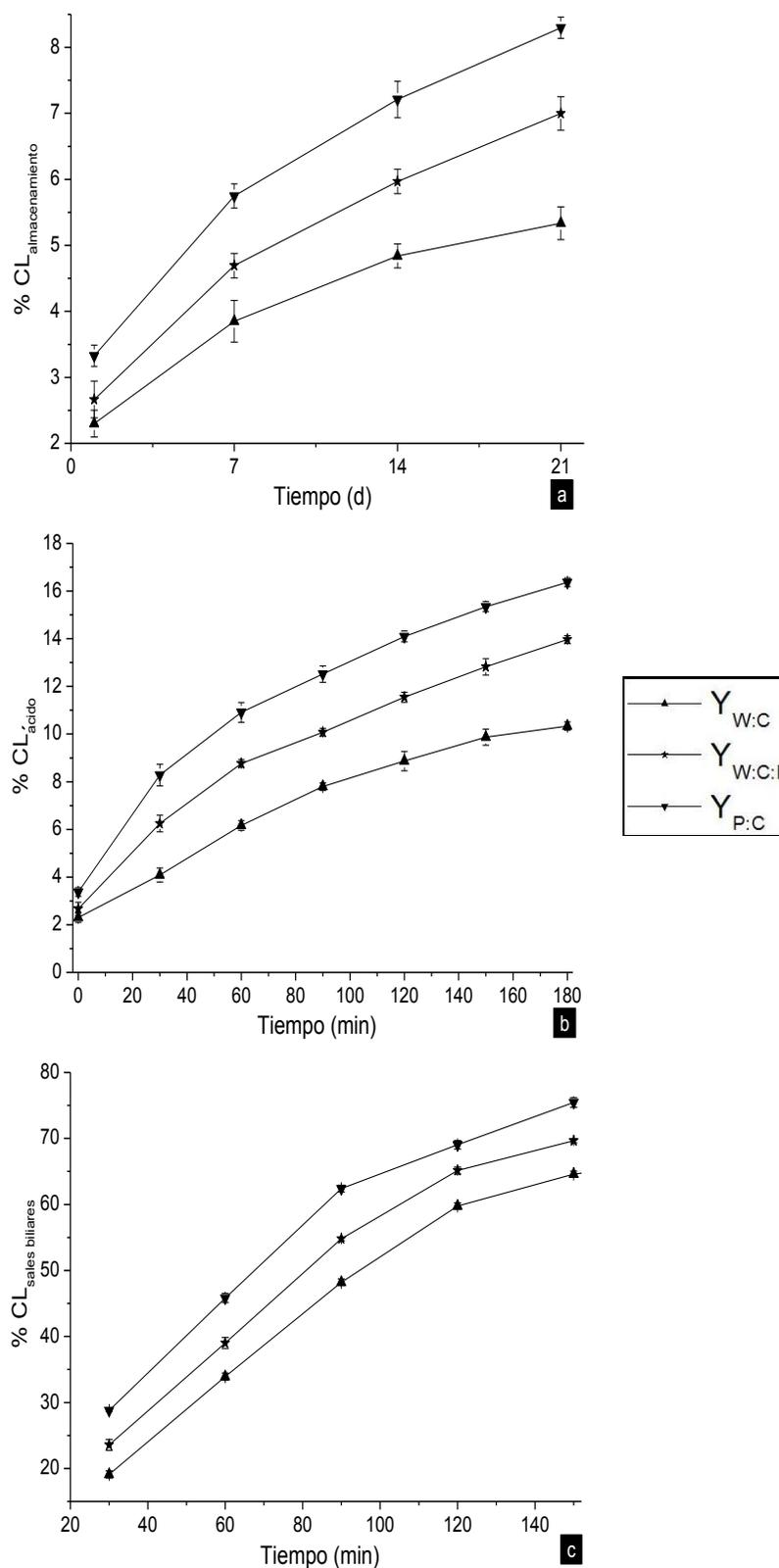


Figura 7.9. Perfil de liberación de cafeína de las EM's (± DE) bajo condiciones de almacenamiento (a), ácidas (b) y sales biliares (c).

7.10. Microestructura del yogur

El estudio presenta que la microestructura del Y_C consistió de una red de proteína compuesta por cadenas y agregados de micelas de caseína, donde existen espacios ocupados por lactosuero y glóbulos de grasa de la leche (Figura 7.10).

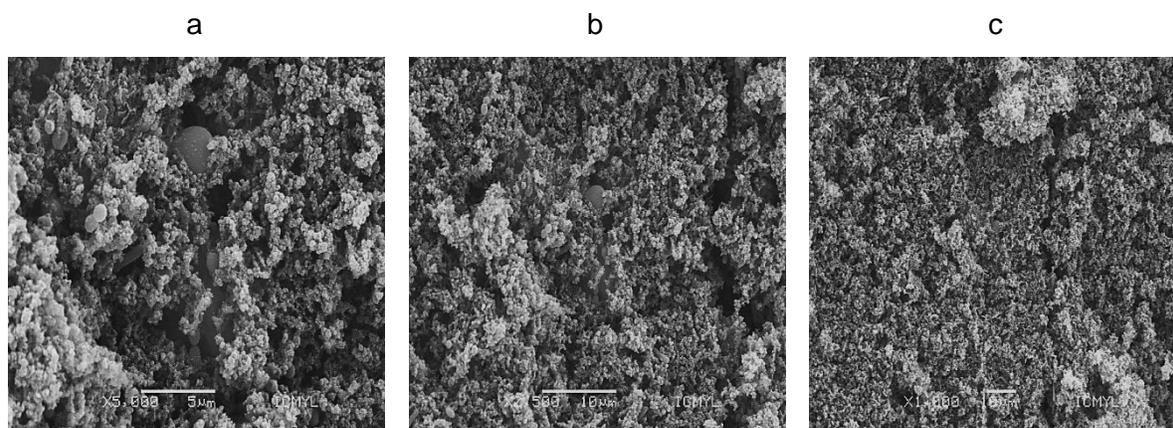


Figura 7.10. Micrografías de Y_C . Magnitud y barra de escala: a) 5000x: 5 μ m, b)2500x: 10 μ m y c)1000x: 10 μ m.

Las Figuras 7.11, 7.12 y 7.13 corresponden a las micrografías de los yogures $Y_{W:C}$, $Y_{P:C}$ y $Y_{W:C:P}$ respectivamente y su estructura está diseñada a partir de glóbulos de grasa y de EM's rodeados por una red proteica compacta muy similar la cual reduce la expulsión de lactosuero en el yogur (Everett y McLeod, 2005 y Tromp *et al.* (2004) encontraron que biopolímeros como la pectina adicionada a bebidas lácteas acidificadas se adsorben en las micelas de caseína y proteínas de suero permitiendo la reducción de sinéresis en los productos finales, por lo que se infiere que la utilización de complejos biopoliméricos (en un pH ácido) para la estabilización de EM's en la elaboración de yogur permite la acomplejación de estas emulsiones con el resto de las proteínas de cada yogur, aumentando su adsorción y formación de una red como medio de soporte el cual provee mayor estabilidad al sistema lácteo.

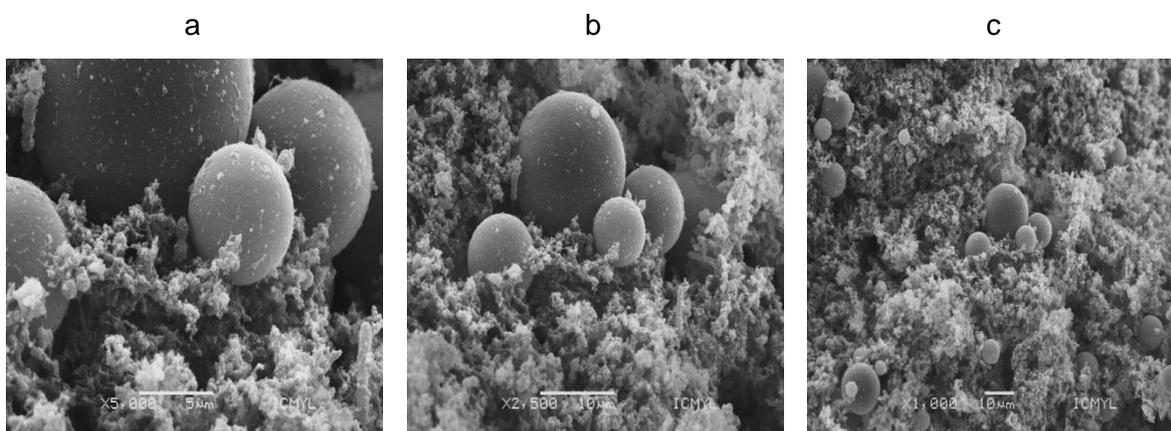


Figura 7.11. Micrografías de $Y_{W:C}$. Magnitud y barra de escala: a) 5000x: 5 μ m, b)2500x: 10 μ m y c)1000x: 10 μ m.

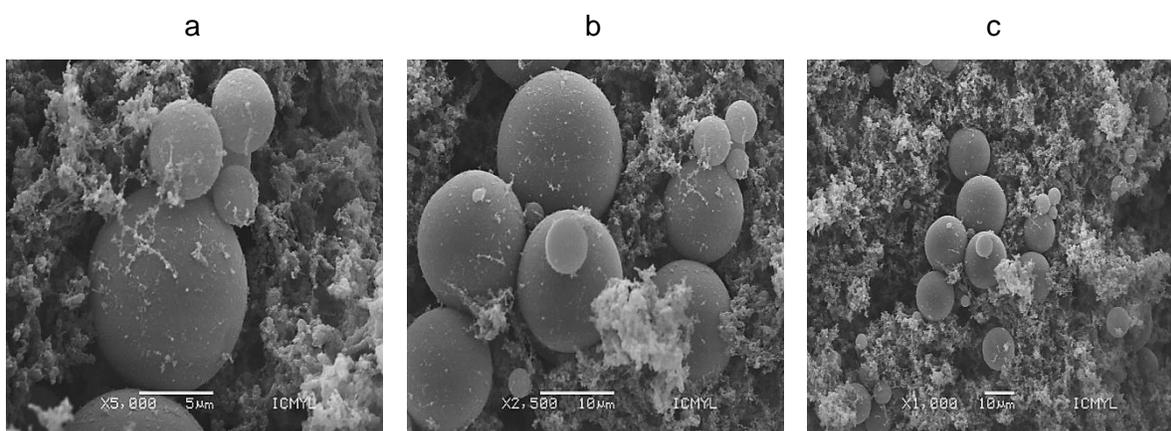


Figura 7.12. Micrografías de $Y_{W:C:P}$. Magnitud y barra de escala: a) 5000x: 5 μ m, b)2500x: 10 μ m y c)1000x: 10 μ m.

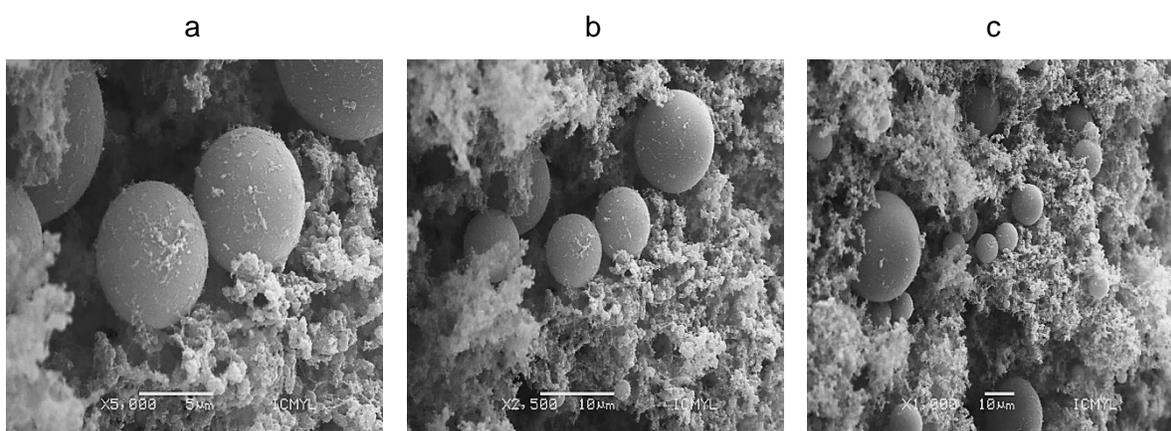


Figura 7.13. Micrografías de $Y_{P:C}$. Magnitud y barra de escala: a) 5000x: 5 μ m, b)2500x: 10 μ m y c)1000x: 10 μ m.

8. CONCLUSIONES

El uso de lecitina de soya (L) y ricinoleato de propilénglicol (R) como agentes emulsificantes en una relación en peso de 0.13:0.87, permitió la obtención de una EP (W_1/O) con gotas de diámetro medio hidrodinámico (d_h) 0.27 μm y una mínima variación de tamaño (aumento 5.8 %) durante su almacenamiento.

El análisis electroforético en gel SDS-PAGE reveló que el hidrolizado de proteínas de lactosuero estuvo formado en su mayor parte por fracciones peptídicas con pesos moleculares < 5 kDa, encontrándose además bandas correspondientes a 82, 10, 5 y 3.4 kDa.

A través de análisis de potencial zeta (ζ) y turbidimetría se determinaron las condiciones óptimas para la formación de complejos solubles binarios y ternarios entre concentrado de proteína de lactosuero (W): carboximetilcelulosa (C) e hidrolizado de proteína de lactosuero (P): P, siendo las siguientes: pH de interacción (pH_i) = 4.2 y relación en peso W:C = 3:1 y P:C = 8:1.

Se formularon emulsiones múltiples grado alimenticio, que contenían cafeína; utilizando complejos solubles binarios (proteína de suero de leche: carboximetilcelulosa y péptidos de suero: carboximetilcelulosa) y ternarios entre estos biopolímeros. Todas las emulsiones múltiples mostraron estabilidad pero diferentes propiedades reológicas a largo plazo, también se encontraron diferencias en la cinética de liberación de cafeína bajo condiciones de almacenamiento, condiciones ácidas y sales biliares, dependiendo de la composición de los complejos solubles utilizados. Se observó que las EM's elaboradas con proteínas nativas obtuvieron módulos viscoelásticos más altos y causaron tasas de liberación de la cafeína más bajas, en contraste, con las EM's elaboradas con péptidos donde la liberación de la cafeína fue más rápida.

Estos resultados demuestran claramente que la estabilidad y la cinética de liberación de las EM's se pueden modular mediante la variación de la composición de complejos solubles, y que las propiedades viscoelásticas son un buen indicador para establecer esto.

9. REFERENCIAS

- Andreetta H. A. (2003). Fármacos de acción prolongada: Mecanismos de liberación. Usos de distintos modelos. *Lat. Am. J. Pharm*, 22 (4): 355-64.
- Adjonu R., Dorana G., Torley P., y Agboola S. (2014). Whey protein peptides as components of nanoemulsions: A review of emulsifying and biological functionalities. *Journal of Food Engineering*, 122, 15–27.
- Ashwell, M. 2002. *Concepts of Functional Foods*. ILSI Europe Concise Monograph series. Belgium.
- AOAC. (1995). *Official methods of analysis* (16th ed.). Arlington, Association of Official Analytical Chemists.
- Aranberri I., Binks B. P., Clint J. H. y Fletcher P. D. I. (2006). Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensoactivos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 7(3).
- Baró L., Jiménez J., Martínez-Férez A. y Bouza J.J. (2001). Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. *Ars Pharmaceutica*, 42:3-4; 135-145.
- Barreda-Abascal R., Molina L., Haro-Valencia R., Alford C. y Verster J.C. (2012). State of the art regarding caffeine's effects and its safety profile in food and beverages. *Rev Med Hosp Gen Méx.*, 75(1):60-67.
- Benichou A., Aserin A. y Garti N. (2002). Double emulsions stabilized by new molecular recognition hybrids of natural polymers. *Polymers for Advances Technologies*, 13: 1019-1031.
- Bergenståhl, B. (1995). Emulsions. In S.T. Beckett, *Physico-chemical aspects of food processing* (pp.49-64). London : Blackie Academic & Professional.
- Bjerregaard, S., Soderberg, I., Vermehren, C., & Frokjaer, S. (1999). Formulation and evaluation of release and swelling mechanism of a water-in-oil emulsion using factorial design. *International Journal of Pharmaceutics*, 193, 1-11.
- Bonnet M., Cansell M., Berkaoui A., Ropers M. H., Anton M. y Leal-Calderon F. (2009). Release rate profiles of magnesium from multiple W/O/W emulsions. *Food Hydrocolloids*, 23: 92-101.
- Bortnowska, G., Balejko, J., Tokarczyk, G., Romanowska-Osuch, A., & Krzemińska, N. (2014). Effect of pregelatinized waxy maize starch on the physicochemical properties and stability of model low-fat oil-in-water food emulsions. *Food Hydrocolloids*, 36, 229-237.

- Castillo, M., Borregales, C., Sánchez, M. D. (2004). Influencia de la pectina sobre las propiedades reológicas del yogur. *Revista de la facultad de farmacia*. 46 (2): 33-37.
- Cencic A. y Chingwaru W. (2010). The Role of Functional Foods. *Nutraceuticals and Food Supplements in Intestinal Health*. *Nutrients*, 2: 611-625.
- Charles B.G., Townsend S.R., Steer P.A., Flenady V.J., Gray P.H. y Shearman A. (2008). Caffeine citrate treatment for extremely premature infants with apnea: population pharmacokinetics, absolute bioavailability and implications for therapeutic drug monitoring. *Thera Drug Monit*, 30:709–16.
- Chime, S. A., Onunkwo, G. C., & Onyishi, I. I. 448 (2013). Kinetics and mechanisms of drug release from swellable and non swellable matrices: A review. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 4(2), 97-103.
- Dalgleish D. G. (2006). Food emulsions-their structures and structure-forming properties. *Food Hydrocolloid*, 20: 415-422.
- Dalton P. y Takehara N. A. (2012). Efecto de los probióticos sobre el colesterol plasmático. *Diaeta*, 30 (139):11-17. B.Aires.
- Darewicz, M., Dziuba, J., & Dziuba, M. (2006). Functional properties and biological activities of bovine casein proteins and peptides. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 15(56), 79-86.
- Delie F. y Blanco Prieto M. J. (2005). Polymeric particulates to improve oral bioavailability of peptide drugs. *Molecules*, 10: 65-80.
- Dickinson, E. (2011). Double emulsions stabilized by food biopolymers. *Food Biophysics*, 6, 1-11.
- Espinosa-Andrews H., Sandoval-Castilla O., Vázquez-Torres H., Vernon-Carter E. J. and Lobato-Calleros C. (2010). Determination of the gum Arabic–chitosan interactions by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates. *Carbohydrate Polymers*, 79: 541-546.
- Everett D. W. y McLeod R. E. (2005). Interactions of polysaccharide stabilisers with casein aggregates in stirred skim-milk yoghurt. *International Dairy Journal*, 15(11), 1175-1183.
- Farrell, H. M. J., Jimenez-Flores R., Bleck G. T., Brown E.M., Butler J. E., Creamer L. K., Hicks C. L., Hollar C. M., Ng-Kwai-Hang K. F., Swaisgood H. E. (2004). Nomenclature of the protein of cow's milk – sixth revision. *Journal of Dairy Science*. 87:1641-1674.

- Fausto Guerra J., Valdez López R. M., Aldrete Rodríguez M. G. y López Zermeño, M. D. (2006). Antecedentes históricos sociales de la obesidad en México. *Medigraphic Artemeni Isínaea*. 8 (2): 6.
- Fredholm B. B., Battig K., Holmén J., Nehlig A. y Zvartau E. E. (1999). Action of caffeine in the brain with special reference to factor that contribute to its widespread use. *Pharmacological Reviews*, 5 (1). USA.
- Fukuda D. H., Smith A. E., Kendall K. L. y Stout J. R. (2010). The possible combinatory effects of acute consumption of caffeine, creatine, and amino acids on the improvement of anaerobic running performance in humans. *Nutrition Research*, 30: 607-614.
- Gambhire M. N., Ambade K. W., Kurmi S. D., Kadam V. J. y Jadhav K. R. (2007). Development and in vitro evaluation of an oral floating matrix tablet formulation of Diltiazem hydrochloride. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 8(3): 73.
- Ganong (2010). *Fisiología médica*. Heddwen Brooks McGraw-Hill. 23a edición: 429 - 478.
- Garti N. (1997). Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food applications. *LWT - Food Science and Technology*, 30, 222-235
- Gauthier S., Paquin F. P., Pouliot Y. y Turgeon S. (1993). Surface Activity and Related Functional Properties of Peptides Obtained from Whey Proteins. *Journal Dairy Science*. 76:321-328.
- Girard M., Turgeon S. L. y Paquin P. (2002). Emulsifying properties of whey protein-carboxymethylcellulose complexes. *Journal of Food Science* 67(1): 13-119.
- Global Industry Analysts Inc. (2012). Functional food industry: Market research reports, statistics and analysis. <http://www.reportlinker.com/ci02036/Functional-Food.html> [Consulta: 15 Junio 2012.]
- Goodman y Gilman. (1997). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 9° Edición. McGraw-Hill Interamericana.
- Heckman M.A., Weil J. y Gonzales M. E. (2010) Caffeine (1,3,7,-trimethylxanthine) in foods: A comprehensive review on consumption, functionality, Safety, and Regulatory matters. *Journal of food science*. 75: 3.
- Hernández-Marín N. Y., Lobato-Calleros C., y Vernon-Carter E. J. (2013). Stability and rheology of water-in-oil-in-water multiple emulsions made with protein polysaccharide soluble complexes. *Food Engineering*, 119, 181–187.

- Higuchi T. (1963). Mechanism of sustained release medication: theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *J. Pharm. Sci.*, Washington, 52:1145-1149.
- Hino A., Adachi H., Enomoto M., Furuki K., Shigetoh Y., Ohtsuka M., Kumagae S. I., Hirai Y., Jalaldin A., Satoh A. y Imaizumi T. (2007). Habitual coffee but not green tea consumption is inversely associated with metabolic syndrome an epidemiological study in a general Japanese population. *Diabetes Res Clin Practice*, 76:383–9.
- Ibarz-Ribas A. y Barbosa-Cánovas G.V. (2005). *Unit Operations in Food Engineering*. Madrid, Spain: 2nd Edition.
- Imran M., Revol-Junelles A. M., René N., Jamshidian M., Akhtar M. J., Arab-Tehrany E., Jacquot M. y Desobry S. (2012). Microstructure and physico-chemical evaluation of nano-emulsion-based antimicrobial peptides embedded in bioactive packaging films. *Food Hydrocolloids*, 29: 407-419.
- Jafari S., Assadpoor E. y Yinghe H. (2008). Encapsulation efficiency of food flavours and oil during spray drying. *Dry Technol*, 26: 816-835.
- Jiménez-Alvarado R., Beristain C.I., Medina-Torres L., Román-Guerrero A. y Vernon-Carter E.J. (2009). Ferrous bisglycinate and release in W1/O/W2 multiple emulsions stabilized by protein-polisaccharide complexes. *Food hydrocolloids*, 23. 2425-2433.
- Juliano L. M. y Griffiths R. R. (2005). "Caffeine." *Substance Abuse*. Uruguay. 4° Edition: 19-23.
- Kalu V. D., Odeniyi M. A. y Jaiyeoba K. T. (2007). Matrix Properties of a New Plant Gum in Controlled Drug Delivery. *Arch Pharm Res*, 30 (7): 884-889.
- Keogh, M. K., Y B. T. O'Kennedy. (1998). Rheology of stirred yogurt as affected by added milk fat, protein and hydrocolloids. *Journal of Food Science*. 63: 108-112.
- Khwaldia K., Banon S., Perez C. y Desobry S. (2004). Properties of sodium caseinate film-forming dispersions and films. *J. Dairy Sci.*, 87: 2011–2016.
- Kilara A. y Panyam D. (2003). Peptides from milk proteins and their properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43 (6): 607-633.
- Korhonen H., y Pihlanto A., (2003). Bioactive peptides and proteins. *Advances in Food and Nutrition Research*, 47: 175-276.
- Korsmeyer R.W., Gunny, R. y Peppas N.A. (1983). Mechanism of solute release from hydrophilic polymers. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, 15: 25-35.

- Koupantsis T. y Kiosseoglou V. (2009). Whey protein-carboxy methylcellulose interaction in solution and in oil-in-water emulsion systems. Effect on emulsion stability. *Food Hydrocolloids*, 23: 1156-1163.
- Kralj D., y Brečević L. (1998). Precipitation of some slightly soluble salts using emulsion liquid membranes. *Croatica Chemical Acta*, 71, 1049-1060.
- Krog N.J. (1997). Food emulsifiers and their chemical and physical properties en Friberg. SE y Larsson K (Eds). *Food emulsions*. 3° Ed. New York.
- Leal-Calderon, F., Schmitt, 472 V., y Bibette, J. (2007). *Emulsion Science: Basic Principles*. New York: Springer Science + Business Media LLC.
- Li B., Jiang Y., Liu F., Chai Z., Li Y. y Leng X. (2012). Synergistic effects of whey protein-polysaccharide complexes on the controlled release of lipid-soluble and water-soluble vitamins in W1/O/W2 double emulsion systems. *International Journal of Food Science & Technology*, 47, 248-254.
- Lobato-Calleros C., Martínez-Torrijos O., Sandoval-Castilla O., Pérez-Orozco J. P. y Vernon-Carter E. J. (2004). Flow and creep compliance properties of reduced-fat yoghurts containing protein-based fat replacers. *International Dairy Journal*, 14: 777–782.
- Lobato C., Sosa A., Rodríguez J., Sandoval O., Pérez C. y Vernon E. J. (2008). Structural and textural characteristics of reduced-fat cheese-like products made from W1/O/W2 emulsions and skim milk. *Lebensmittel Wissenschaft and Technologie*, 41:1847-1856.
- Lobato-Calleros, C., Recillas-Mota, M. T., Espinosa-Solares, T., Alvarez-Ramirez, J. y Vernon-Carter, E. J. (2009). Microstructural and rheological properties of low-fat stirred yoghurts made with skim milk and multiple emulsions. *Journal of Texture Studies*, 40, 657–675.
- Lopretti M., Barreiro F., Fernandes I., Damboriarena A., Ottati C. y Olivera A. (2007). *Microencapsulación de compuestos de actividad biológica*. Uruguay 2° Edition: 19-23.
- Madene A., Jacquot M., Scher J. I. y Desobry S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41: 1–21.
- Matoušková, P., Patočková, K., Doskočil, L., y Márová, I. (2012). Encapsulation of caffeine into organic micro- and nanoparticles. *NANOCON 2012 – 2nd. International*

- Conference on Nanotechnology. Conference Proceedings. Bharati Vidyapeeth University, Pune, India. p. 99. ISBN: 978-80-87294-32-1.
- McClements D. J. (2005). Food emulsions: principles, practice and techniques. Boca Raton (FL): CRC Press.
- Meisel H. (2001). Bioactive peptides from milk proteins: a perspective for consumers and producers. The Australian Journal of Dairy Technology, 56: 83-92.
- Mekhloufi G., Sanchez C., Renard D. y Guillemin S. (2005). pH-induced structural transitions during complexation and coacervation of beta-lactoglobulin and acacia gum. Langmuir, 21(1): 386-394.
- Michael, N., Johns, M., Owen, C., y Patterson, J. (2008). Effects of caffeine on alertness as measured by infrared reflectance oculography. Psychopharmacology, 200, 255–260
- Mumin M. A., Akhter K. F., Abedin A. Z., y Hossain M. Z. (2006). Determination and characterization of caffeine in tea, coffee and soft drinks by solid phase extraction and high performance liquid chromatography (SPE – HPLC). Malaysian Journal of Chemistry, 8(1): 45-51.
- Muñoz J., Alfaro M.C. y Zapata I. (2007). Avances en la formulación de emulsiones. Grasas y Aceites. 58 (1).
- Murillo M. M., Pedroza R., Lobato C., Martínez A. y Vernon E.J. (2011). Designing W1/O/W2 double emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes for producing edible films: Rheological, mechanical and water vapour properties. Food Hydrocolloids, 25: 577-585.
- Nehlig A. y Debry G. (1994). Consequences on the newborn of chronic maternal consumption of coffee during gestation and lactation: a review. J. Amer. Coll. Nutr., 13:6-21.
- Osad L. J. E., Rojas V. M. O., Rosales V. C. E. y Vega D. J. (2008). Caffeine consumption in medical students and its coexistence with depressive and anxious symptomatology. Rev Med Hered, 19 (3). Peru
- Ozer O., Muguet V., Roy E., Grossiord J. L. y Seiller M. (2000). Stability Study of W/O/W Viscosified Multiple Emulsions. Drug Development and Industrial Pharmacy, 26: 1185-1189.
- Patel A. R. y Velikov K. P. (2011). Colloidal delivery systems in foods: A general comparison with oral drug delivery. Food Science and Technology. 44 (9).

- Piorkowski D. T. y McClements D. J. (2013). Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. *Food Hydrocolloids*, 42: 1: 5-41.
- Quintana J. M., Califano A. M., Zaritzky N. E., Partal P. y Franco J. M. (2002). Linear and nonlinear viscoelastic behavior of oil-in-water emulsions stabilized with polysaccharides. *Journal of Texture Studies*, 33, 215-236.
- Ramírez-Santiago, C., Lobato-Calleros, C., Espinosa-Andrews, H. y 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.
- Rao J. y McClements D. J. (2011). Food-grade microemulsions, nanoemulsions and emulsions: Fabrication from sucrose monopalmitate & lemon oil. *Food Hydrocolloids*, 25: 1413-1423.
- Rozner S., Shalev D. E., Shames A. I., Ottaviani M. F., Aserin A. y Garti N. (2010). Do food microemulsions and dietary mixed micelles interact?. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 77: 22-30.
- Ru Q., Wang Y., Lee J., Ding Y. y Huang Q. (2012). Turbidity and rheological properties of bovine serum albumin/pectin coacervates: Effect of salt concentration and initial protein/polysaccharide ratio. *Carbohydrate Polymers*. 88: 838–846.
- Ruiz-Ramos J. O., Pérez-Orozco J. P., Báez-González J. G., Bósquez-Molina E., Pérez-Alonso C. y Vernon-Carter E. J. (2006). Interrelationship between the viscoelastic properties and effective moisture diffusivity of emulsions with the water vapor permeability of edible films stabilized by mesquite gum–chitosan complexes. *Carbohydr. Polym.* 64: 355-363.
- Ruxton C. H. S. (2008). The impact of caffeine on mood, cognitive function, performance and hydration: a review of benefits and risks. *Nutrition Bulletin*, 33: 15-25.
- Sabato S. F., Ouattara B., Yu H., D'Aprano G. y Lacroix M. (2001). Mechanical and barrier properties of cross-linked soy and whey protein based films. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 49: 1397-1403.
- Sandoval-Castilla O., Lobato-Calleros C., Aguirre-Mandujano E. y Vernon-Carter E. J. (2004). Microestructure and texture of yogurt as influenced by fat replacer. *International Dairy Journal*, 14:151-159.
- Sandoval-Castilla O., Lobato-Calleros C., García-Galindo H. S., Alvarez-Ramírez J. y Vernon-Carter E. J. (2010). Textural properties of alginate–pectin beads and

- survivability of entrapped Lb. casei in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Food Research International*, 43: 111–117.
- Savant V. D. y Torres J. A. (2000). Chitosan-based coagulating agents for treatment of Cheddar cheese whey. *Biotechnology Progress*, 16, 1091-1097.
- Schägger H. y Von Jagow G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfatopoliacrilamide gel electroforesis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166 (2): 368-379.
- Schmidts T., Dobler D., Nissing C. y Runkel P. (2009). Influence of hydrophilic surfactants on the properties of multiple W/O/W emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 338: 14-192.
- Schmitt C. y Turgeon S. L. (2010). Protein/Polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Advances in colloid and Interface Science*, 167 (1-2): 63-70
- Sela Y., Magdassi S. y Garti, N. (1995). Release of Markers from the Inner Water Phase of W/O/W Emulsions Stabilized by Silicone Based Polymeric Surfactants, *Journal of Controlled Release*, 33: 1–12.
- Shahidi F. (2005). Nutraceuticals and Functional Foods in Health Promotion and Disease Prevention. *Proc. WOCMAP III, Vol.6: Traditional Medicine & Nutraceuticals. Acta Hort.* 680: 13-24.
- Skoog Douglas A., West Donaid M., Holler F y James. (1995). *Química analítica*. McGraw Hill. México. 257-281.
- Smith A. (2002). Effects of caffeine on human behavior. *Food Chem Tox* 40:1243–55.
- Smulders, P. E. A. (2000). Formation and stability of emulsions made with proteins and peptides. Ph.D. Thesis Wageningen Agricultural University, Netherlands. Souza, C. J. F., Garcia Rojas, E. E., Melo, N. R., Gaspar, A., & Lins, J.F.C. (2013).
- Soppimath K. S., Aminabhavi T. M., Kulkarni A. R. y Rudzinski W. E. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, 70: 1-20.
- Steffe J. F. (1996). *Rheological methods in food process engineering* (2nd ed.). East Lansing, MI: Freeman Press.
- Tabilo-Munizaga G. y Barbosa-Cánovas V. (2005). Rheology for the food industry. *Journal of Food Engineering*, 67: 147-156.
- Tamime A. Y. y Robinson R. K. (1999). *Yoghurt, Science and Technology*. 3° Edition, 619.

- Tesch S. y Schubert H. (2002). Influence of Increasing Viscosity of the Aqueous Phase on the Short-term Stability of Protein Stabilized Emulsions. *Journal of Food Engineering*, 52: 305-312.
- Torruco-Uco J. G., Domínguez-Magaña M. A., Dávila-Ortíz G., Martínez-Ayala A., Chel-Guerrero L. A. y Betancur-Ancona D. A. (2008). Péptidos antihipertensivos, una alternativa de tratamiento de origen natural: Revisión. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 6(2): 158-168.
- Tromp, R. H., de Kruif, C. G., van Eijk, M., y Rolin, C. (2004). On the mechanism of stabilisation of acidified milk drinks by pectin. *Food Hydrocolloids*, 18, 565–572.
- Turgeon S. L., Beaulieu M., Schmitt C. y Sanchez C. (2003). Protein –polysaccharide Interactions: Phase-Ordering Kinetics, Thermodynamic and Structural Aspects. *CurPrent Opinion in Colloid Interface Science*, 4-5:401-414.
- Velikov K. P. y Pelan E. (2008). Colloidal delivery systems for micronutrients and nutraceuticals. *Soft Matter*, 4:1964-1980.
- Vinayahan, T., Williams, P. A., Phillips, G. O. (2010). Electrostatic interaction and complex formation between gum arabic and bovine serum albumin. *Biomacromolecules*, 11, 3367–3374.
- Weinbreck F., Tromp R. H. y de Kruif C. G. (2004). Composition and estructure of whey protein/gum Arabic coacervates. *Biomacromolecules*, 5. 1437-1445.
- Weiss J., Takhistov P., y McClements D. J. (2006). Functional materials in food nanotechnology. *Journal of Food Science*, 71: 107-116.
- Westerterp-Plantenga M, Diepvens K, Joosen A. M. C. P., Berube-Parent S. y Tremblay A. (2006). Metabolic effects of spices, teas, and caffeine. *Physiol Behav*, 89:85-91.
- Wróblewska B. y Troszyńska A. (2005). Enzymatic hydrolysis of cow's whey milk proteins in the aspect of their utilization for the production of hypoallergenic formulas. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 14/55 (4): 349–357.
- Ye A. (2008). Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 43: 406–415.
- Yua H., Sabato S.F., D'Apranoc G. y Lacroixa M. (2004). Effect of the addition of CMC on the aggregation behavior of proteins. *Radiation Physics and Chemistry*, 71 (1-2): 131-135.
- Zydney A.L. 1998. Protein separations using membrane filtration: new opportunities for whey fractionation, *International Dairy Journal*. 8:243.

ANEXOS:

Publicaciones:

Caffeine release kinetics from multiple emulsions stabilized by binary and ternary soluble complexes of carboxymethylcellulose, whey proteins and peptides.

Hernández-Marín N. Y., Lobato-Calleros C., Alvarez-Ramirez J. y Vernon-Carter E. J.

Food Engineering, (2015).

Stability and rheology of water-in-oil-in-water multiple emulsions made with protein polysaccharide soluble complexes.

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

Food Engineering, (2013), 119, 181–187.

Caffeine release kinetics from multiple emulsions stabilized by binary and ternary soluble complexes of carboxymethylcellulose, whey proteins and peptides

N. Y. Hernández-Marín^a, C. Lobato-Calleros^{b,*}, J. Alvarez-Ramirez^c, E. J. Vernon-Carter^c

^a*Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Vicentina, México, D.F. 09340, México.*

^b*Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, 56230 Texcoco, México.*

^c*Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Vicentina, México, D.F. 09340, México*

ABSTRACT

Water-in-oil-in-water multiple emulsions (ME's) containing caffeine were developed for controlled release application, by designing interfacial layers made of binary and ternary soluble complexes (whey protein (W), whey peptides (P) and carboxymethylcellulose (C)). Droplet oil size of all the ME's did not vary significantly over 21 days of storage, but initial droplet size, viscoelastic properties, and caffeine release rates depended on soluble complexes composition. The molecular weight of the protein fraction predominating in the protein:polysaccharide soluble complex was a key factor in determining the ME's properties. When W predominated in the soluble complexes, as opposed to P, droplet size was smaller, the viscoelastic properties higher, and the caffeine release kinetics slower as determined by the Korsmeyer-Peppas model.

Keywords: caffeine release, whey protein and peptides, carboxymethylcellulose, multiple emulsions, rheology.

1. Introduction

Caffeine is a stimulant of the central nervous system and has been targeted as an ingredient of several energy drinks as a vehicle for achieving increased alertness. An ongoing research topic is to design appropriate encapsulation systems for achieving controlled release of caffeine (Matoušková et al., 2012) and thus to impart a desired level of increased alertness. Moderate intakes of caffeine (37.5 to 250 mg day⁻¹) have been associated with maximised benefits and minimised risks for cognitive function, mood, physical performance and hydration (Michael et al., 2008; Ruxton, 2008).

Water-in-oil-in-water (w1/o/w2) multiple emulsions (ME) consist of small-sized water droplets (w1) contained within larger oil droplets (o) that are dispersed within an aqueous continuous phase (w2) (Murillo-Martínez et al., 2011). Increasing attention has been devoted to these systems with the aim of taking advantage of their double (or multiple) compartment structure (Leal-Calderon et al., 2007). Functional food components could be encapsulated within the inner water phase, the intermediate oil phase, or the outer water phase, thereby making it possible to develop a single delivery system containing multiple functional components, which may be released to a specific site such as the mouth, stomach, or small intestine (Weiss et al., 2006). Another, strategic reason for considering double emulsions for food applications relates to the ongoing search for healthier reduced fat products, seeking to lower the oil content of a conventional o/w food emulsion by replacing it with an equivalent ME of similar perceived fat content (Lobato-Calleros et al., 2008; Dickinson, 2011).

The most used method for forming kinetically meta-stable ME is the two-step emulsification method process, where in the first step a water-in-oil emulsion (w1/o) is formed, which is then re-emulsified in

an aqueous phase 57 (w2) that usually includes the use of two or more biopolymers, usually protein-polysaccharide conjugates and complexes, for enhancing the ME functional properties, among them the controlled release of bioactives (Dickinson, 2011; Hernández-Marín et al., 2013). The release kinetics of bioactives from ME has been reported as being slower as the molecular weight of the polysaccharide making up the protein-polysaccharide complex was higher (Jiménez-Alvarado et al., 2009).

Thus, the factor that probably affected most the overall functionality was the thickness of the complex adsorbed around the ME oil droplets. Different health effects have been attributed to milk-derived peptides, including antimicrobial properties, blood pressure lowering (angiotensin converting enzyme, ACE, inhibitory effects), cholesterol-lowering ability, antithrombotic and antioxidant activities, enhancement of mineral absorption and/or bioavailability, cyto- or immunomodulatory effects, and other effects (Hartman & Meisel, 2007). In particular whey peptides with molecular weight ≤ 6 kDa have been reported having the greatest ACE inhibitory activity (Pan et al., 2012). Bioactive peptides derived from milk proteins offer a promising approach for the promotion of health by means of a tailored diet and provide interesting opportunities to the dairy industry for expansion of its field of operation (Nagpal et al., 2011). In the food industry there is a trend towards the production of functional foods and nutraceuticals containing bioactive peptides (Darewicz et al., 2006). Whey proteins are good emulsifiers due to their ability to adsorb at the oil-water interface and their good solubility in water (Girard et al., 2002). The peptides produced by proteolysis are smaller, have less secondary structure than proteins, and are expected to have different behaviour at oil-water interfaces (Gauthier et al., 1993). The emulsion forming properties of milk peptides can be inferior, comparable or superior to that of intact proteins, depending on many factors, such as their solubility, hydrophobicity, molecular weight, conformational stability, among others (Smulders, 2000). The emulsifying properties of whey proteins have been enhanced by their complexation with polysaccharides, in particular carboxymethylcellulose, providing more effective protection to oil droplets against coalescence than that conferred by whey proteins alone (Girard et al., 2002). In contrast, the emulsifying properties of whey peptides-polysaccharides complexes are still unknown, so a better knowledge about this may lead to a more efficient use of whey peptides. On the other hand, to assess the effectiveness of ME's as delivery systems, studies are required of their incorporation in food systems and their *in vitro* release properties.

With these premises in mind, the objectives of this work were to: (1) formulate ME's containing caffeine in the inner aqueous phase; (2) use binary and ternary soluble complexes of whey protein concentrate (W), carboxymethylcellulose (C), and whey peptides (P) as stabilisers in the outer aqueous phase; (3) determine the morphology, droplet size, rheological properties, stability, and caffeine encapsulation efficiency of the ME's; and (4) evaluate caffeine release kinetics from the ME's incorporated to yogurt, during storage time and under simulated gastrointestinal conditions.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Canola oil (CO; Maravilla, Aceites, Grasas y Derivados, S.A. de C.V., Mexico City, Mexico) was used as the oil phase of the ME. Grinsted® PGPR 90 (G), esters of polyglycerol and polyricinolate fatty acids (PGPR; Danisco Mexico, S.A. de C.V., Mexico City, Mexico), and soy lecithin (L; Alquimia Mexicana, S. de R. L. Mexico City, Mexico) were used as emulsifiers to prepare the primary emulsion

(w1/o). Caffeine was purchased from Sigma-Aldrich Quimica, S.A. de C.V. (Toluca, State of Mexico, Mexico). Whey protein concentrate (W; 83.7 g protein/100 g and 6.4 g fat/100 g, Hilmar 8000®, Hilmar, CA, USA), carboxymethylcellulose (C; CMC® CEROL; viscosity of 50 000 mPa s for a 2 g/100 g solution at 60 rpm and 25 °C; Grupo Dermet, S.A. de C.V., Mexico City, Mexico), and whey peptides (P; 80.5 g protein, 5.8 g fat, 17 g peptides larger than 20 kDa, 15.6 g peptides falling between 5 and 20 kDa, and 67.2 g peptides smaller than 5 kDa per 100 g; Hilmar 8360®, Hilmar, CA, USA) were used to prepare the soluble complexes, which were used to stabilise the ME. Low-heat skim milk (0.01 g fat/100 g, Lactomix®, DILAC, SA de CV, Mexico City, Mexico) and homogenised whole milk (28 g fat/100 g, Reny Picot, DILAC, SA de CV, Mexico City, Mexico) spray-dried powders, and freeze-dried starter culture (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis*, and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MY800 LYO Danisco, S. A. de C. V. Mexico City, Mexico) were used to prepare the stirred yogurts. Reagents used were porcine bile extract (B8631, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), hydrochloric acid (HCl) and sodium hydroxide (NaOH) (J. T. Baker, SA de CV, Xalostoc, State of Mexico, Mexico). All water used in the experiments was double distilled and deionised.

2.2. Zeta potential measurements

To understand the driving force for electrostatic interaction between W:C and P:C, the zeta potential of the W (2.0 g/100 g), C (0.5 g/100 g), and P (2.0 g/100 g) solutions was determined with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK) at pH values from 2.0 to 8.0. The pH of the solutions was adjusted to the desired value by the addition of either 0.1 N NaOH or 0.1 N HCl.

2.3. Complexes formation

The effect of W:C weight ratios (RW:C) and P:C weight ratios (RP:C) and pH is important on the formation of the soluble complexes. In this work the information for W:C soluble complexes was obtained from the turbidity measurements made by Hernández-Marín et al. (2013), while that corresponding to P:C soluble complexes was determined experimentally following the procedure reported by these same authors. The tested RP:C ranged from 6:1 to 10:1, by blending the P (3.0, 3.5, 4.0, 4.5, and 5.0 g/100 g) solutions with the C (0.5 g/100 g) solution, and the mixtures were adjusted to pH values in the range of 2.0–6.0 with either 0.1 N HCl or 0.1 N NaOH.

2.4. Formulation and preparation of the multiple emulsions

ME's were prepared at room temperature (20 ± 2 °C) using a two-stage emulsification procedure (Lobato-Calleros et al., 2008). In the first stage, the primary (w1/o) emulsion was made with 0.4 disperse mass fraction (ϕ1). The dispersed aqueous phase ((39.24 g of distilled water + 0.52 g of L + 0.24 g of caffeine)/100 g) was added drop-wise to the oil phase ((56.52 g of CO + 3.48 g of G)/100 g) using a high shear Ultra-Turrax® T50 basic homogenizer (IKA Works, Inc., Wilmington, DE, USA) operated at 6400 rpm during 5 min. In the second stage the w1/o emulsion was re-emulsified in different binary and ternary soluble complexes aqueous solutions (w2). The binary soluble complex solutions were W:C and P:C, and the ternary soluble complex solution was W:C:P. The composition, relative weight ratio and pH for the formation of the W:C soluble complex were those reported by Hernández-Marín et al. (2013); those for the P:C soluble complex were determined experimentally following the methodology of Hernández-Marín et al. (2013); and the formation of the W:C:P soluble

complex was based on the results obtained for the two previous binary soluble complexes, and more details are given in results and discussion. The requisite amount of primary emulsion was added drop-wise to the aqueous solutions with the help of the high shear homogenizer operated at 4000 rpm during 5 min. The codes of the ME's were as follows: MEW:C, MEW:P and MEW:C:P. All of the ME's had a dispersed mass fraction (ϕ_2) of 0.3 and were stored at 4 °C until required for analyses.

2.5. Mean droplet size and optical micrographs of the emulsions

The mean hydrodynamic diameter (dh) of the primary emulsion was determined after 1 and 7 d of storage using a Malvern Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK). The mean surface-volume droplet size (d_{3,2}) of the ME was determined with a Malvern Mastersizer 3000 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK), using deionized water (refractive index 1.333) as dispersant within 1 h of initial preparation and at different intervals during 21 days of storage. Micrographs of the ME's were taken after 1 h of preparation and after 21 days of storage using an optical microscope (Olympus BX45, Olympus Optical Co., Tokyo, Japan) coupled to an image analyser system (digital Olympus camera C3030, Olympus Imaging Americas Inc., Center Valley, PA, USA). Selected micrographs taken at a magnification of 100× are shown.

2.6. Rheological analysis of the ME's

Dynamic oscillatory measurements of the ME's aged 1 day, were performed using a Physica MCR 301 rheometer (Physica Mebtechnik GmbH, Stuttgart, Germany), with a cone-plate geometry, in which the rotating cone was 50 mm in diameter, and cone angle of 1° with a gap of 0.05 mm. About 2 mL of each ME were carefully placed in the measuring system, and left to rest for 30 min at 5 °C for temperature equilibration and structure recovery. Amplitude sweeps were carried out by applying a strain sweep ranging from 0.01 to 100 % at 1 Hz. The storage modulus (G') and the loss modulus (G'') were obtained from the equipment software (Rheoplus/32 V2.62) in all cases. Plots of G'-strain % and G''- strain % were obtained from the experimental data with an Origin Scientific Graphing and Analysis Software version 7 (OriginLab Corporation, Northampton, MA), and analyzed to determine the linear viscoelastic (LVR) and the non-linear viscoelastic (n-LVR) regions of the curves. The LVR on the modulus-strain % plots was considered as that in which at least three consecutive highest experimental points of G' did not vary with increasing strain %. The last experimental point of the LVR was considered as the onset point of the n-LVR. The point where sharpest downward inflexion of the modulus-strain % curve commenced was considered as that characterizing best the n-LVR (Lobato-Calleros et al., 2006).

2.7. Caffeine encapsulation efficiency

The caffeine encapsulation efficiency (EE) in the ME's was measured after 1 day of storage. EE was defined as the percentage of caffeine entrapped within the inner aqueous phase:

$$\% EE = \frac{TC - NEC}{TC} * 100$$

Where TC = total caffeine content in the whole ME (mg) and NEC = non-entrapped caffeine present in the outer aqueous phase (mg).

ME's samples (10 g) were broken by heating at 85 °C during 5 min and sonication at 70 % of amplitude for 5 min (Ultrasonic Processor, model VCX 130PB 500, Newtown, CT, USA). The ME's breakdown was verified by direct observation under the microscope. Centrifugation at 4500 rpm during 5 min allowed the separation of the oil and water phases of the broken ME. The aqueous phase was filtered through 0.45 µm acrodisk (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA) and then the total amount of caffeine (TC) released from the ME's was measured by HPLC (Agilent Technologies/HP 1100, Palo Alto, CA, USA) coupled to a Nucleosil 100 S C(18) column (150×4.6 mm internal diameter, 5 microns) using the procedure reported by Mumin et al. (2006). By separate 10 g of each ME were centrifuged at 1800 rpm during 10 min to allow the separation of the oil droplets from the outer aqueous phase, which was filtered through 0.45 µm acrodisk and then the non entrapped caffeine (NEC) was measured by HPLC.

2.8. Caffeine release in yogurt during storage

The MEW:C, MEW:P and MEW:C:P emulsions were added to reduced-fat yogurt containing 12 g of milk fat/kg, prepared according to the procedure informed by Sandoval-Castilla et al. (2004). Reduced-fat yogurt (916.5 g) was added with 83.5 g of each ME variation, and stirred with a mechanical mixer (Caframo, RZR1, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA) operated at 500 rpm for 1 min. The yogurts were coded as YW:C, YW:C:P and YP:C, stored at 4 °C, and the caffeine release was determined after 1, 7, 14 and 21 days of storage. Samples (10 g) of each yogurt were centrifuged at 1800 rpm during 10 min to allow the separation of the oil droplets from the outer aqueous phase, which was filtered through 0.45 µm acrodisk and then the released caffeine was quantified by HPLC. Caffeine release percentage (CR_{storage}%) was calculated as the ratio of released to entrapped caffeine × 100.

2.9. Caffeine release under simulated gastrointestinal conditions

The caffeine release from ME's contained in yogurt (stored 1 day) was studied separately when exposed to acid and bile salts conditions. Samples of each yogurt (100 g) were placed in glass beakers containing 100 mL of simulated gastric solution (pH 2.3) with 0.1 N HCl (Pimentel-González et al., 2009). Samples were incubated at 37 °C for 3 h in a Precision Scientific 360 orbital shaker bath (Cole Parmer, Chicago, IL, USA). Samples of 10 g were taken every 30 min and centrifuged at 1800 rpm for 10 min. The supernatant was filtered through 0.45 µm acrodisk, and caffeine was measured by HPLC. To evaluate bile salts effect on caffeine release, 100 g of yogurt were added to 100 mL of bile salts solution (0.3 g/100 mL, pH 6.8), and the mixture was incubated 2.5 h at 37 °C with constant agitation of 100 rpm (Sandoval-Castilla et al., 2010). Samples of 10 g were taken every 30 min and processed as above. Caffeine release percentages under acid (CR_{acid}%) and bile salts (CR_{bile salts}%) was calculated as indicated above.

2.9. Data analyses

All measurements were done by triplicate and reported as means ± standard deviations. Simple classification variance analysis was applied and, whenever it was appropriate, Least Significant Difference (LSD) tests were used in order to determine differences between the means (p ≤ 0.05). Statistical analyses were done with Statgraphics Plus software (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc., Cambridge, MA). Experimental data of caffeine release during storage and under simulated gastrointestinal conditions were fitted to Zero, First, Second, Hixson and Crowell,

Korsmeyer and Peppas, Peppas and Higuchi, and Higuchi models, and best fit was determined by estimating the correlation coefficient R^2 (Andretta, 2003; Jiménez-Alvarado et al., 2009).

3. Results and discussion

3.1. ξ -potential of C, W and P solutions

The ξ -potential values of C, W and P solutions are given as a function of pH in Figure 1. It is noted that for C the ξ -potential values changed from -6.06 ± 1.8 mV to -105.0 ± 3.3 mV on increasing the pH from 2 to 8, due to the increased dissociation of the carboxylic moieties ($-\text{COOH}$) giving rise to carboxylate moieties ($-\text{COO}^-$) (Hernández-Marín et al., 2013). For W and P the ξ -potential values changed both from 21.7 ± 6.5 mV at pH = 2 to 24.6 ± 5.7 mV and -29.3 ± 5.6 mV at pH=8, respectively, due to changes in the degree of ionization of the amine and carboxylic moieties. The isoelectric point (pI) was 4.2 ± 0.1 for both W and P. Thus strong electrostatic interactions between W:C and P:C should arise in 2.5-3.5 pH range, where the magnitude of opposite sign charges is nearly stoichiometric.

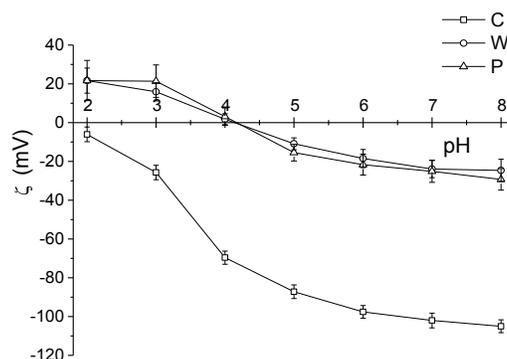


Figure 1. ξ potential-pH profiles for 0.5 g/100 g C, 2.0 g/100 g W, and 2.0 g/100 g P solutions.

3.2. Effect of pH and biopolymers mixing ratio on complex formation

The turbidity arises mainly from the change in mass and size of aggregates in solution, so the changes in turbidity may indicate the progressive complexation between biopolymers, giving rise to soluble and insoluble biopolymer complexes (Ru et al., 2012). Solutions with greater turbidity have a greater amount of macromolecules spread in the bulk, i.e., soluble complexes, than translucent solutions. Therefore, translucent solutions are main indicative of complex coacervate formation, i.e., precipitates (Souza et al., 2013). Figure 2 shows the dynamics of the P:C complexes formation (at different RP:C) as the pH of the solution decreased from 6.0 to 2.0. At pH values between 4.75 to 4.25, a plateau of maximum turbidity readings was obtained for P:C at RP:C of 8:1 and higher, indicating a non significant different maximum soluble complexes formation. In this pH range, just above that of the isoelectric point of P, positive patches on P were able to interact with the carboxylate groups on C molecules (Vinayahan et al., 2010). As pH decreased below pI (4.2) of P, turbidity readings suffered a pronounced drop due to phase separation caused by the formation of insoluble complexes. Turbidity readings reached a minimum at about pH 3.0, indicating that maximum binding had been achieved between P and C molecules. The ME's were stabilized with the following: (a) P:C soluble complex formed at RP:C of 8:1 (4.0 g of P:0.5 g of C) per 100 g of w2, based on the results given above; (b) W:C soluble complex obtained at RW:C of 3:1 (1.5 g of W:0.5 g

of C) per 100 g of w2, based on the results of Hernández-Marín et al. (2013); and (c) W:C:P soluble complex made at RW:C:P of 1.5:1:4.0 (0.75 g of W:0.5 g of C:2 g of P) per 100 g of w2, i.e., the relative amount of W and P were halved (their zeta potential profile was very close, Fig. 1) with respect to the quantities used in the W:C and P:C complexes. All the soluble complexes were formed at a pH of 4.25.

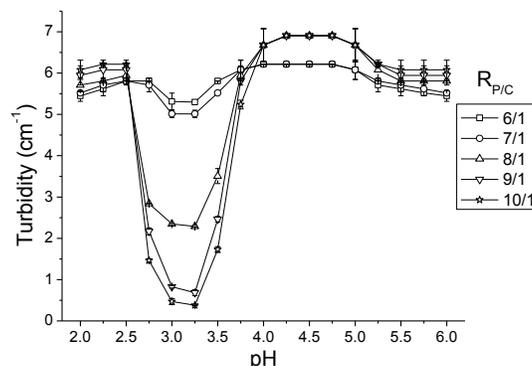


Figure 2. Turbidity as a function of pH for P and C blends at different weight ratios (R_{P/C})

3.3. ME's droplet size and morphology

The primary emulsion droplets hydrodynamic diameter (d_h) remained unchanged ($0.27 \pm 0.01 \mu\text{m}$) immediately after manufacture and after 7 days of storage at 4°C , indicative that the emulsifiers blend and concentration used were adequate for obtaining emulsions with good stability against coalescence. All the ME's exhibited type C morphology (Fig. 3), 308 i.e., they were made up by spherical oil droplets containing within them a large number of flocculated water droplets (Garti, 1997), immediately after manufacture and maintained this morphology after 21 days of storage. The composition of the soluble complexes affected the initial mean surface-volume diameter ($d_{3,2}$) of the ME's (Fig. 4). Mean droplet size exhibited from smaller to larger size was as follows: MEW:C ($2.84 \mu\text{m}$) < MEW:C:P ($3.18 \mu\text{m}$) < MEP:C ($3.40 \mu\text{m}$), and were significantly different among themselves. These results point out that the different soluble complexes exhibited different surface activity and formed different structures around the oil droplets. Intermolecular stable complexes result in aggregates of different sizes, depending on the departing biopolymers used for forming the complexes. The complexation results in a collective and cooperative adsorption on the oil-water interface, leading to higher surface coverages than either component on its own. P acts and provides more anchoring sites for C, hence promoting its adsorption. C in turn increases the adsorption of P by providing more electrostatic binding sites in the near proximity of oil surfaces. The cooperative adsorption yields thick and compact interfacial layers covering the oil droplets providing strong steric stabilisation and good emulsification (Li et al., 2012). A similar process occurs with the W:C and W:C:P complexes, the qualitative differences observed in droplet size possibly arising due to the amphiphilicity differences exhibited by W and P. Larger size peptides are more likely to have both hydrophobic and hydrophilic residues in the same molecule than small size peptides (Adjonu et al., 2014). A high amount of P in the soluble complex allowed a faster diffusion to and adsorption at the oil droplet surface, however, its lower surface activity allows for incipient coalescence post-emulsification resulting in mean larger initial size droplet size. In the case of soluble complexes where W is present, the oil droplets are wrapped by a protein:polysaccharide shell that form bulkier polymeric layers which provide enhanced stabilization to the droplets through steric effects (Adjonu et

al., 2014). Whey protein-polysaccharide complexes provide better stabilization against coalescence to oil-in-water emulsions than whey proteins (Girard et al., 2002). $d_{3,2}$ after 21 days of storage was non-significantly different respect the initial size (Fig. 4).

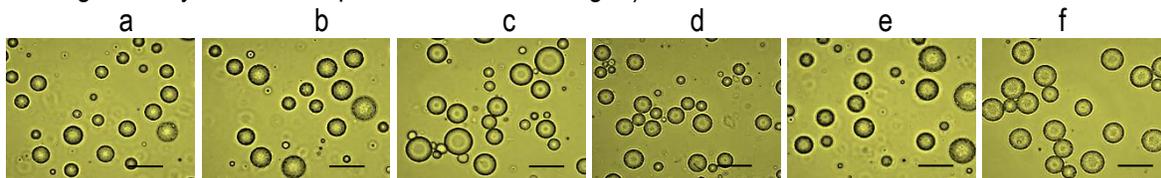


Fig. 3. ME's droplets morphology after 1 and 21 days of storage. Magnification is 100 ×, scale bar = 5 μm.

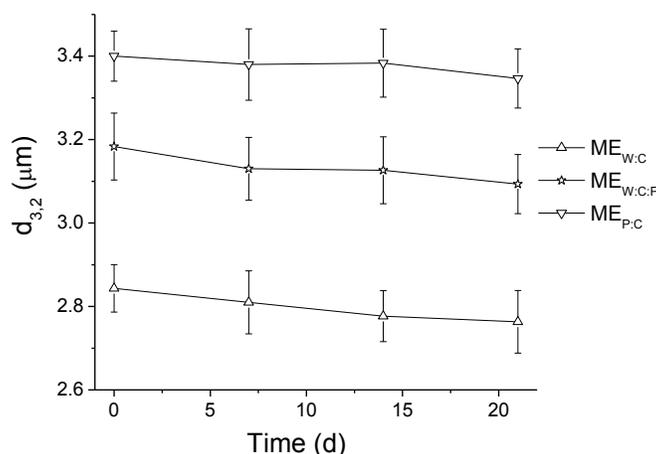


Figure 4. ME's droplet size changes with storage time.

3.4. Rheological properties of ME's

The ME's dynamic measurements results were expressed in terms of the storage modulus (G') and the loss modulus (G'') as a function of the strain % (Fig. 5). G' is a measure of the energy stored elastically during the periodic deformation, while G'' is associated with the dissipation or loss of energy as a viscous flow (Tadros, 1996). Fig. 5 indicates that the viscoelastic response of the ME's was dependent on the nature of the adsorbed interfacial layer around the oil droplets and on strain %. All of the ME's showed similar profiles characterized by a plateau region (LVR) exhibiting a more or less constant value of G' at low strain %, followed by a sharp downward inflection in G' at larger strains (n-LVR). The appearance of a plateau region in the mechanical spectrum has been related to the formation of physical entanglements among polymeric molecules that form a 3-D network that traps the oil droplets (Quintana et al., 2002). After 1 day of storage MEW:C exhibited the highest storage modulus (3.30 ± 0.1 Pa) in the LVR, followed by MEW:C:P (2.63 ± 0.1 Pa) \square MEC:P (2.32 ± 0.1 Pa). G'' values in the LVR region were in descending order: MEW:C (3.98 ± 0.1 Pa) \square MEC:P (2.95 ± 0.1 Pa) = MEW:C:P (2.74 ± 0.1 Pa). The relative value of the viscoelastic moduli exhibited by the emulsions, indicates that a complex interplay between adsorbed and non-adsorbed soluble complexes, their size and shape, and conformation adopted in the solvent influenced their structure development. 355 When W predominated in the complexes, the emulsions exhibited higher G' and G'' values. When W was absent in the soluble complex, G' was lower. All the ME's presented higher G'' than G' values over the entire strain % interval studied, thus they may be classified as viscous liquid-like emulsions (Chen & Dickinson, 1999), where the intermolecular interactions were weak and the network structure could easily rearrange to accommodate the strain (Bortnowska et al., 2014).

The profile and values of the viscoelastic moduli remained practically unchanged after 21 days of storage (data not shown), indicative of the high structural stability of the ME's, under quasi-stationary conditions. However, in practice, the ME's are subjected to large strains beyond those encountered in the LVR when consumed and during their transit through the gastrointestinal tract, so that it is convenient to characterize their behaviour in the n-LVR. The strain % at which the G' showed the sharpest downward inflexion of the ME's varied as follows: MEW:C (20.4 %) \square MEW:C:P (13.7 %) \square MEP:C (9.2 %). The value of G' from higher to lower followed the same order in the LVR and n-LVR.

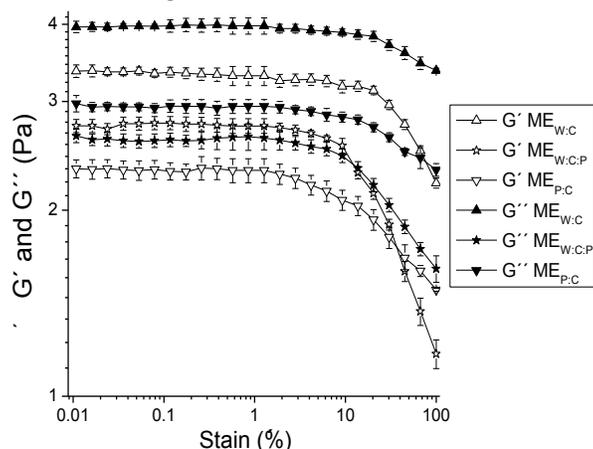


Fig. 5. Strain dependence of G' and G'' of multiple emulsions stored 1 day.

3.5. Caffeine encapsulation efficiency and release

Caffeine EE was significantly different for the ME's variations, being of 91.1 ± 0.3 % for MEP:C, 88.2 ± 0.6 % for MEW:C:P and of 85.3 ± 0.3 % for MEW:C. These results indicate that EE was closely related to ME's droplet size, i.e. the larger the oil droplet size, the larger the effective disperse phase volume of w_1 , and the larger the amount of caffeine entrapped. The release of caffeine in yogurt was evaluated during 21 days of storage (Fig. 6a). The release kinetics were significantly faster from the MEP:C, than from MEW:C:P, than from MEW:C, obtaining the following % caffeine release after 21 days of storage ($CR_{storage}$): 8.3 ± 0.2 (MEP:C) \square 7.0 ± 0.3 (MEW:C:P) \square 5.3 ± 0.2 (MEW:C). These results can be explained as due to the following factors: (a) the phase ratio of w_1/o emulsion is regarded as one of the factors contributing to the release rate, i.e. an increased water content represents larger amount of droplets per unit of primary emulsion, resulting in an increase in the release rate (Bjerregaard et al., 1999); and (b) the nature of the external interface structure may provide better or worse sealing against the release of the entrapped bioactive (Benichou et al., 2004). In this work it seems that an inverse relationship existed between the G' values of the ME's and the rate of caffeine release. Higher G' values produced slower caffeine release rates. Emulsion droplets covered with thicker interfacial layers tend to exhibit higher G' values. The caffeine experimental release data were best fitted by the Korsmeyer-Peppas model ($R^2_{389} \geq 0.99$):

$$\log(\%CR_{storage}) = \log(k) + n \log(t)$$

where K = is a kinetic constant (having units of t^{-n}) incorporating structural and geometric characteristics of the delivery system; and n = is the diffusion exponent indicative of the mechanism of transport of caffeine through the biopolymer matrix. The release mechanism is by Fickian diffusion when $n \leq 0.45$, but non-Fickian (anomalous) when $0.45 < n < 0.89$ (Chime et al., 2013). Table 1 presents the values of K and n .

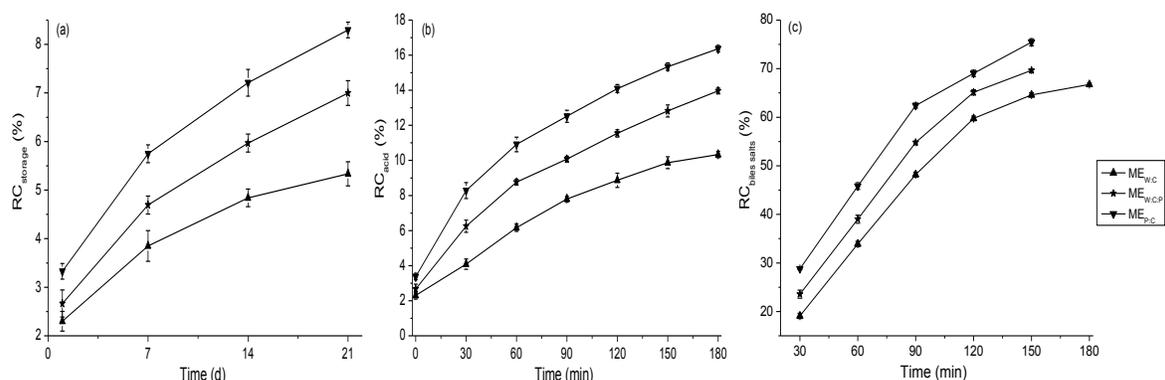


Fig. 6. Caffeine release patterns from the ME under: (a) storage at 4 °C, (b) acid, and (c) bile salts.

The values of K were lower as W content in the soluble complexes was higher. The value of n was less than 0.32 in all cases, indicating that caffeine release was by Fickian diffusion. Figures 6b and 6c show that the caffeine release under acid and bile salts conditions followed the same trend than that found under storage conditions. %CR_{acid} was as follows: 16.4 ± 0.2 (MEP:C) > 14.0 ± 0.3 (MEW:C:P) > 10.3 ± 0.2 (MEW:C), while %CR_{bile salts} was as follows: 75.4 ± 0.7 (MEP:C) > 69.7 ± 0.3 (MEW:C:P) > 64.6 ± 0.5 (MEW:C). As can be observed the caffeine release under bile salt conditions was around four times-fold greater than that under acid conditions. The caffeine release kinetics under acid and bile salts conditions also fitted well the Korsmeyer-Peppas model ($R^2 \geq 0.98$) and the values of K and n are given in Table 1.

TABLE 1. Caffeine release parameters derived from Korsmeyer-Peppas model

ME code	Almacenamiento		Acid		Bile salts	
	K	n	K	n	K	n
ME _{W:C}	1.43 ± 0.1^a	0.28 ± 0.03^a	0.86 ± 0.1^a	0.53 ± 0.04^b	1.26 ± 0.0^a	0.73 ± 0.02^b
ME _{W:C:P}	1.52 ± 0.1^{ab}	0.31 ± 0.04^a	1.16 ± 0.1^b	0.44 ± 0.02^a	1.42 ± 0.1^b	0.70 ± 0.02^b
ME _{P:C}	1.68 ± 0.0^c	0.30 ± 0.03^a	1.43 ± 0.0^c	0.38 ± 0.01^a	1.76 ± 0.0^c	0.61 ± 0.01^a

K = kinetic constant; n = diffusion exponent.

The values of n under acid conditions were below 0.44, indicating that Fickian diffusion of caffeine prevailed. However, under bile salts conditions, n values were higher than 0.61, indicative that caffeine release was dominated by an anomalous non-Fickian diffusion. This was probably due to the fact that the pH under bile conditions was around 6.8, causing the dissociation of the soluble complexes and promoting weak spots in the biopolymer matrix, inducing an anomalous fast release of caffeine.

4. Conclusions

Food grade multiple emulsions containing caffeine were designed using binary (whey protein:carboxymethylcellulose and whey peptides:carboxymethylcellulose) and a ternary complex between these biopolymers. All the multiple emulsions exhibited long term stability but different rheological properties and caffeine release kinetics under storage, acid and bile salts conditions, depending on the composition of the soluble complexes used to stabilize them. Higher viscoelastic

moduli caused slower caffeine release rates. When whey protein predominated in the soluble complexes, the protein:polysaccharide shell enshrouding the oil droplets was thicker and bulkier, and caffeine release slower. In contrast, when whey peptides formed part of the complexes, caffeine release was faster. These results clearly demonstrate that the stability and release kinetics from multiple emulsions can be modulated by varying the soluble complexes composition, and that viscoelastic properties are a good indicator for establishing this.

References

- Adjou, R., Dorana, G., Torley, P., & Agboola, S. (2014). Whey protein peptides as components of nanoemulsions: A review of emulsifying and biological functionalities. *Journal of Food Engineering*, 122, 15–27.
- Andreetta, H. A. (2003). Fármacos de acción prolongada: Mecanismos de liberación. Usos de distintos modelos. *Latin American Journal of Pharmacy*, 22, 355-364.
- Benichou, A., Aserin, A., & Garti, N. (2004). Double emulsions stabilized with hybrids of natural polymers for entrapment and slow release of active matters. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108-109, 29-41.
- Bjerregaard, S., Soderberg, I., Vermehren, C., & Frokjaer, S. (1999). Formulation and evaluation of release and swelling mechanism of a water-in-oil emulsion using factorial design. *International Journal of Pharmaceutics*, 193, 1-11.
- Bortnowska, G., Balejko, J., Tokarczyk, G., Romanowska-Osuch, A., & Krzemińska, N. (2014). Effect of pregelatinized waxy maize starch on the physicochemical properties and stability of model low-fat oil-in-water food emulsions. *Food Hydrocolloids*, 36, 229-237.
- Chen, J., & Dickinson, E. (1999). Effect of monoglycerides and diglycerol-esters on viscoelasticity of heat-set whey protein emulsion gel. *International Journal of Food Science and Technology*, 34, 493-501.
- Chime, S. A., Onunkwo, G. C., & Onyishi, I. I. (2013). Kinetics and mechanisms of drug release from swellable and non swellable matrices: A review. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 4(2), 97-103.
- Darewicz, M., Dziuba, J., & Dziuba, M. (2006). Functional properties and biological activities of bovine casein proteins and peptides. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 15(56), 79-86.
- Dickinson, E. (2011). Double emulsions stabilized by food biopolymers. *Food Biophysics*, 6, 1-11.
- Garti, N. (1997). Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food applications. *LWT - Food Science and Technology*, 30, 222-235.
- Gauthier, S. F., Paquin, P., Pouliot, Y., & Turgeon, S. (1993). Surface activity and related functional properties of peptides obtained from whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 76, 321-328.
- Girard, M., Turgeon, S. L., & Paquin, P. (2002). Emulsifying properties of whey protein carboxymethylcellulose complexes. *Journal of Food Science*, 67(1), 113-119.
- Hartman, R., & Meisel, H. (2007). Food-derived biopeptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 163-169.
- 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. *Food Engineering*, 119, 181–187.
- Jiménez-Alvarado, R., Beristain, C. I., Medina-Torres, L. Román-Guerrero, A., & Vernon-Carter, E. J. (2009). Ferrous bisglycinate and release in W1/O/W2 multiple emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes. *Food Hydrocolloids*, 23, 2425-2433.

- Leal-Calderon, F., Schmitt, 472 V., & Bibette, J. (2007). *Emulsion Science: Basic Principles*. New York: Springer Science + Business Media LLC.
- Li, B., Jiang, Y., Liu, F., Chai, Z., Li, Y., Li, Y., & Leng, X. (2012). Synergistic effects of whey protein-polysaccharide complexes on the controlled release of lipid-soluble and water-soluble vitamins in W1/O/W2 double emulsion systems. *International Journal of Food Science & Technology*, 47, 248-254.
- Lobato-Calleros, C., Rodríguez, E., Sandoval-Castilla, O., Vernon-Carter, E. J., & Alvarez-Ramirez, J. (2006). Reduced-fat white fresh cheese-like products obtained from W1/O/W2 double emulsions: viscoelastic and high-resolution image analyses. *Food Research International*, 39, 678-685.
- Lobato-Calleros, C., Sosa-Pérez, A., Rodríguez-Tafoya, J., Sandoval-Castilla, O., Pérez-Alonso, C., & Vernon-Carter, E. J. (2008). Structural and textural characteristics of reduced-fat cheese-like products made from W1/O/W2 emulsions and skim milk. *LWT - Food Science and Technology*, 41, 1847-1856.
- Matoušková, P., Patočková, K., Doskočil, L., & Márová, I. (2012). Encapsulation of caffeine into organic micro- and nanoparticles. *NANOCON 2012 – 2nd. International Conference on Nanotechnology. Conference Proceedings*. Bharati Vidyapeeth University, Pune, India. p. 99. ISBN: 978-80-87294-32-1.
- Michael, N., Johns, M., Owen, C., & Patterson, J. (2008). Effects of caffeine on alertness as measured by infrared reflectance oculography. *Psychopharmacology*, 200, 255–260.
- Mumin, M. A., Akhter, K. F., Abedin, A. Z., & Hossain, M. Z. (2006). Determination and characterization of caffeine in tea, coffee and soft drinks by solid phase extraction and high performance liquid chromatography (SPE – HPLC). *Malaysian Journal of Chemistry*, 8(1), 045 – 051.
- Murillo-Martínez, M. M., Pedroza-Islas, R., Lobato-Calleros, 496 C., Martínez-Ferez, A., & Vernon-Carter, E. J. (2011). Designing W1/O/W2 double emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes for producing edible films: Rheological, mechanical and water vapour properties. *Food Hydrocolloids*, 25, 577-585.
- Nagpal, R., Behare, P., Rana, R., Kumar, A., Kumar, M., Arora, S., Morotta, F., Jain, S., & Yadav, H. (2011). Bioactive peptides derived from milk proteins and their health beneficial potentials: an update. *Food Function*, 2(1), 18-27.
- Pan, D., Cao, J., Guo, H., & Zhao, B. (2012). Studies on purification and the molecular mechanism of a novel ACE inhibitory peptide from whey protein hydrolyzate. *Food Chemistry*, 130, 121-126.
- 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.
- Quintana, J.M., Califano, A.M., Zaritzky, N.E., Partal, P., & Franco, J.M. (2002). Linear and nonlinear viscoelastic behavior of oil-in-water emulsions stabilized with polysaccharides. *Journal of Texture Studies*, 33, 215-236.
- Ru, Q., Wang, Y., Lee, J., Ding, Y., & Huang, Q. (2012). Turbidity and rheological properties of bovine serum albumin/pectin coacervates: Effect of salt concentration and initial protein/polysaccharide ratio. *Carbohydrate Polymers*, 88, 838–846.
- Ruxton, C. H. S. (2008). The impact of caffeine on mood, cognitive function, performance and hydration: a review of benefits and risks. *Nutrition Bulletin*, 33, 15-25.

- Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., Aguirre-518 Mandujano, E., & Vernon-Carter, E. J. (2004). Microestructure and texture of yogurt as influenced by fat replacers. *International Dairy Journal*, 14, 151-159.
- Sandoval-Castilla O, Lobato-Calleros C., García-Galindo H.S., Alvarez-Ramírez J., & Vernon-Carter E.J. (2010). Textural properties of alginate–pectin beads and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Food Research International*, 43, 111–117.
- Smulders, P. E. A. (2000). Formation and stability of emulsions made with proteins and peptides. Ph.D. Thesis Wageningen Agricultural University, Netherlands. Souza, C. J. F., Garcia Rojas, E. E., Melo, N. R., Gaspar, A., & Lins, J.F.C. (2013). Complex coacervates obtained from interaction egg yolk lipoprotein and polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 30, 375-381.
- Tadros, Th.F. (1996). Correlation of viscoelastic properties of stable and flocculated suspensions with their interparticle interactions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 68, 97–200.
- Vinayahan, T., Williams, P. A., Phillips, G. O. (2010). Electrostatic interaction and complex formation between gum arabic and bovine serum albumin. *Biomacromolecules*, 11, 3367–3374.
- Weiss, J., Takhistov, P., & McClements, D. J. (2006). Functional materials in food nanotechnology. *Journal of Food Science*, 71, R107-R116.



Stability and rheology of water-in-oil-in-water multiple emulsions made with protein-polysaccharide soluble complexes



N.Y. Hernández-Marín^a, C. Lobato-Calleros^{b,*}, E.J. Vernon-Carter^c

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

^b Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5, Carretera México-Texcoco, 56230 Texcoco, Mexico

^c Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Vicentina, México, D.F. 09340, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 March 2013

Received in revised form 20 May 2013

Accepted 24 May 2013

Available online 4 June 2013

Keywords:

Multiple emulsions

Carboxymethylcellulose

Whey protein concentrate

Soluble complexes

Rheology

ABSTRACT

The morphology, stability, and rheological properties of water-in-oil-in-water ($W_1/O/W_2$) multiple emulsions (ME) stabilized by whey protein concentrate (W)-carboxymethylcellulose (C) soluble complexes ($SC_{W/C}$) were evaluated. The interaction pH values (pH_i) to generate $SC_{W/C}$ were established through zeta potential and turbidity determinations. Six ME variations were prepared using a constant weight ratio (WR) between W and C of 3:1 (where maximum interaction occurred) and by varying the way in which the biopolymers were adsorbed at the interface (layer-by-layer, LL, or pre-formed complex, PF) and pH_i (3.7, 4.0 and 4.3). The ME initial volume-surface diameter ($D_{3,2}$) of the oil droplets ranged from 2.4 to 3.2 μm , which on turn contained numerous flocculated water droplets. Higher viscoelastic moduli values (G' and G''), more pronounced shear thinning behaviour and smaller changes in droplet size with storage time were displayed by ME made with a pH_i value of 4.3, $WR_{3:1}$, and LL biopolymers adsorption technique.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In water-in-oil-in-water ($W_1/O/W_2$) multiple emulsions (ME) the internal (W_1) and external (W_2) phases are chemically alike, and an intermediate immiscible (O) phase physically separates the two like phases (Dickinson and McClements, 1996). Bioactive compounds can be incorporated within the W_1 or O phases, making ME carriers for non-polar and polar ingredients, and ideal for the development of novel food products with enhanced functional properties (Murillo-Martínez et al., 2011; Nisisako et al., 2012). ME have been used in the manufacture of reduced-fat yoghurt (Lobato-Calleros et al., 2009) and edible films (Murillo-Martínez et al., 2011). The most used method for forming kinetically meta-stable ME is the two-step emulsification method process, where in the first step a water-in-oil emulsion (W_1/O) is formed, which is then re-emulsified in an aqueous phase (W_2) containing a combination of emulsifiers and/or stabilizing agents (Lobato-Calleros et al., 2009). Actual development of food emulsions usually includes the use of two or more biopolymers for enhancing their individual functional properties (Ramírez-Santiago et al., 2012). For instance, the combined use of proteins and polysaccharides would be expected to bring together the emulsifying role of the protein with the stabilizing role of the polysaccharide (Dickinson and Euston,

1991). The improved functional properties resulting from the protein-polysaccharide complexes in comparison to the proteins and polysaccharides alone could be attributed to the structure of their complexes. There are many ways in which biopolymers can interact at the molecular level, and so it is important to determine which parameters influence the formation of the complexes and their effect on the main functional properties that they impart to the systems to which they are incorporated (Espinosa-Andrews et al., 2008; Schmitt and Turgeon, 2011). Oppositely charged protein and polysaccharides are generally known to form stable inter-biopolymer complexes that have the capacity to form and stabilize effectively emulsions (Ruíz-Ramos et al., 2006). The mechanical, thermal, emulsifying properties of these complexes are better than those of the individual biopolymers (Ye, 2008) with the additional advantage that the electrostatic interactions and in consequence the complexes properties can be modulated. The actual chemical composition of the emulsion droplet surface will depend on how the protein and polysaccharide molecules adsorb at the interface, this being the key factor which determines most of the surface interactions (Bergensstahl, 1995). Thus, the interface may arise by two routes: (i) aggregates of pre-formed (PF) protein-polysaccharide soluble complex which may adsorb together at the interface from a mixed bulk solution; or alternatively (ii) a pure protein layer may be formed first, with interfacial complexation following on after subsequent addition of polysaccharide (LL). Hence, surface composition and structure may be determined by a

* Corresponding author. Tel.: +52 595 95 21618; fax: +52 595 95 21617.

E-mail address: consuelobato@yahoo.com (C. Lobato-Calleros).

delicate dynamic balance of competitive and cooperative (associative) processes, leading to possibilities for evolving structural heterogeneity in both the plane of the interface (surface phase separation) and normal to the interface (multilayer formation) (Dickinson, 2008; Jourdain et al., 2009).

The aim of this work was to determine the influence on the morphology, droplet size, rheological properties and stability of water-in-oil-in water multiple emulsions formed by the layer-by-layer and pre-formed whey protein concentrate–carboxymethylcellulose biopolymers adsorption at the interface at different pH values.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Canola oil (CO; Capullo®, Unilever de Mexico, S.A. de C.V., Mexico, Mexico) was used as the oil phase of the ME. The hydrophilic emulsifier (Panodan® SDK Datem, esters of monoglycerides and diglycerides of diacetyltartaric acid) and hydrophobic emulsifier (Grinsted® PGPR 90, esters of polyglycerol and polyricinolate fatty acids) were purchased from Danisco Mexico, S.A. de C.V., Mexico City, Mexico). The biopolymers used were whey protein concentrate (W; 83.7 g protein/100 g and 6.4 g fat/100 g, Hilmar 8000, CA, USA) and carboxymethylcellulose (C; CMC® CEROL; viscosity of 50 000 mPa s for a 2 g/100 g solution at 60 rpm and 25 °C; Grupo Dermat, S.A. de C.V., Mexico City, Mexico). Analytical grade reagents used were hydrochloric acid (HCl), sodium hydroxide (NaOH), all purchased from Quimica Laitz, S.A. de C.V., Mexico City, Mexico. All water used in the experiments was double distilled and deionized.

2.2. Complexes formation

In order to obtain a general picture for the complexation phenomena between W and C, the impact of the protein to polysaccharide weight ratios ($WR_{W/C}$) at a given pH value was evaluated using turbidity measurements (Ramírez-Santiago et al., 2012). $WR_{W/C}$ ratios ranging from 2:1 to 1:6 were obtained by blending the C (0.5 g/100 g) solution with W (1.0, 1.5, 2.0, 2.5, and 3.0 g/100 g) solutions, adjusting the pH values of the mixtures in the range of 2.0–6.0. The mixtures were gently stirred for 1 h at room temperature, and let to stand for 48 h at 4 ± 1 °C. Soluble complexes exist in solution prior to onset of macroscopic phase separation, and this phenomenon may be effectively monitored through turbidity measurements. The % transmittance (%T) of the biopolymers mixtures was measured at 400.5 nm with a Spectronics Genesis 5 UV/Vis (Spectronic Unicam, Rochester, NY, USA). The turbidity was calculated as:

$$\text{Turbidity } (\tau) = \frac{1}{L} \ln \frac{I_0}{I_t}$$

where τ = turbidity (cm^{-1}); L = optical length (1 cm); I_t = intensity of transmitted light (%T); and I_0 : intensity of incident light (100) (Skoog et al., 1995). High turbidity measurements are indicative of the formation of soluble complexes, while low turbidity measurements are indicative of insoluble complexes formation (complex coacervate).

2.3. Zeta potential measurements

To understand the driving force for electrostatic interaction between W and C, the zeta potential of the W (1.5 g/100 g) and C (0.5 g/100 g) solutions was determined with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK) at pH

values ranging between 2.0 and 8.0. The pH of the solutions was adjusted to the desired value by the addition of either 0.1 N NaOH or 0.1 N HCl.

2.4. Formulation and preparation of the ME

ME variations were prepared using a 2×3 factorial experiment, maintaining constant the $WR_{W/C}$ at which maximum turbidity was obtained. The independent variables were the way in which the biopolymers adsorbed at the outer oil–water interface (LL or PF) and pH of interaction (pH_i). These pH_i values were selected in order to comprise different conditions of charge density driving the complexation between the biopolymers, mainly: (i) pH_i of 3.7 where dissociation of W was relatively high and that of C quite suppressed; (ii) pH_i of 4.0, slightly below that of the isoelectric point of W ($pI = 4.2$), where the positive charges of W and negative charges of C are more balanced, but sufficiently far away from a stoichiometric relationship between the biopolymers that would lead to the formation of insoluble complexes; and (iii) a pH_i of 4.3 above the pI of W, where both W and C are negatively charged. It is known that anionic polysaccharide can interact with positively charged “patches” on the protein surface (Dickinson, 2008). The resulting multiple emulsions were coded as $ME_{x,y}$, where x = biopolymers interfacial adsorption technique employed (LL or PF) and y = pH_i of manufacture (3.7, 4.0 or 4.3). ME_{PF} were prepared by a two-step procedure (Lobato-Calleros et al., 2008), while the ME_{LL} were prepared by a three step procedure (Mora-Huertas et al., 2010).

In the case of both ME_{PF} and ME_{LL} , the first stage consisted in the formation of a W_1/O primary emulsion with a 0.4 disperse mass fraction (ϕ_1). The aqueous phase (37.9 g of distilled water per 100 g + 2.1 g of Panodan per 100 g) was poured drop-wise with continuous agitation into the oil phase (51.5 g of CO per 100 g + 8.5 g of Grinsted per 100 g) with the help of a high shear Ultra-Turrax® T50 basic homogenizer (IKA Works, Inc. Wilmington, USA) operated at 6 400 rpm during 5 min.

The second stage procedure was slightly different for ME_{PF} and ME_{LL} , but both types of emulsions had dispersed mass fraction (ϕ_2) of 0.3, total biopolymer concentration of 2% w/w and $WR_{3/1}$. The requisite amount of primary emulsion was added drop-wise with continuous agitation to aqueous dispersions of W + C (1.5 g W + 0.5 g C/68 g of distilled water) for ME_{PF} , and to aqueous dispersions of W (1.5 g W per 40 g of distilled water) for ME_{LL} . In both cases the aqueous dispersions were adjusted to the different pH_i values mentioned above, and homogenization was done a high shear homogenizer operated at 4000 rpm during 5 min.

The third stage for ME_{LL} consisted in pouring the protein covered preliminary ME into a C aqueous dispersion (0.5 g C per 28 g of distilled water) with a homogenizer at 4000 rpm for 5 min.

All of the $ME_{x,y}$ were prepared by triplicate using completely randomized experimental design.

2.5. Mean droplet size and optical micrographs of ME

The mean surface-volume droplet size ($d_{3,2}$) of the $ME_{x,y}$ was determined with a Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK), using deionized water (refractive index 1.333) as dispersant within 1 h of initial preparation and at different intervals during 21 days of storage at 4 ± 1 °C.

Micrographs of the $ME_{x,y}$ were taken after 1 h of preparation and after 21 days of storage using an optical microscope (Olympus BX45, Olympus Optical Co., Tokyo, Japan) coupled to an image analyser system (digital Olympus camera C3030, Olympus Imaging Americas Inc., Center Valley, PA, USA). Selected micrographs taken at a magnification of 100 \times are presented. An estimation of the W_1/O

O droplet size can be obtained from their proportion with respect to $ME_{x,y}$ oil droplets size.

2.6. Rheological properties of the ME

Dynamic oscillatory measurements of the $ME_{x,y}$ were performed using a Physica MCR 301 rheometer (Physica Meßtechnik GmbH, Stuttgart, Germany), with a cone-plate geometry, in which the rotating cone was 50 mm in diameter, and cone angle of 1° with a gap of 0.05 mm. About 2 mL of each $ME_{x,y}$ was carefully placed in the measuring system, and left to rest for 30 min at 4°C for structure recovery. Amplitude sweeps were carried out at 4°C to characterize the linear viscoelastic region (LVR) of the $ME_{x,y}$. Strain ranging from 0.01% to 100% was applied at 1 Hz. The storage modulus (G'), the loss modulus (G'') and the loss angle defined as $\tan \delta (G''/G')$ were obtained from the equipment software. $ME_{x,y}$ were also subjected to a shear rate sweep ($0.01\text{--}1000\text{ s}^{-1}$) and the apparent viscosity of was recorded. Temperature was maintained at 4°C with the help of the Physica TEK 150P Peltier system in all the experiments. Analysis was carried out by triplicate on each of the $ME_{x,y}$ after 1 day of prepared.

2.7. Data analysis

Multifactor analysis of variance was carried out to determine which factor (interfacial adsorption technique or the pH_i) affected significantly the $ME_{x,y}$ rheological properties. Significance was established at $p \leq 0.05$. Data analysis was done using the Statgraphics Plus software (Statistical Graphics Corp., Manugistics, Inc., Cambridge, MA, USA).

3. Results and discussion

3.1. Complexes formation between W/C

Turbidity of a solution is an indicator of dissolved solids present and is mainly due to the light scattering of these particles. It has also been used as an indicator of the formation and dissociation of protein/polysaccharide complexes (Savant and Torres, 2000; Ramírez-Santiago et al., 2012). Fig. 1 shows the turbidity versus pH profiles of the complexation between W and C for $WR_{W/C}$ of 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, and 6:1. All the profiles showed similar trends and were characterized by four regions observed from high to low pH values as follows: (A) a region of relatively high turbidity readings occurring in the pH span comprised between ~ 6.0 and 4.2. The relatively high turbidity readings found at pH 6.0 are due mainly to the co-existence of the individual W and C molecules, which begin to interact as pH drops towards pH of $\sim 4.8\text{--}4.2$. In this pH region, turbidity readings increased as $WR_{W/C}$

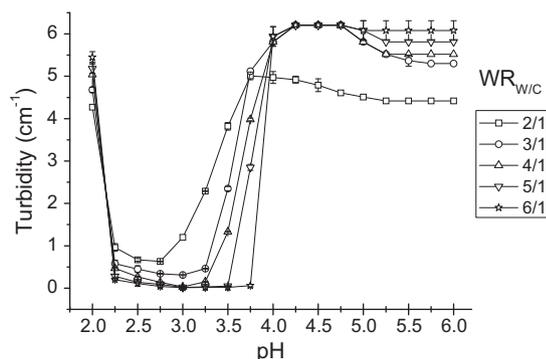


Fig. 1. Turbidity as a function of pH for W and C blends at different weight ratios.

increased. A maximum interaction region (B) was reached which was characterized by a plateau of maximum turbidity reading due to the presence of mainly soluble biopolymers complexes. The turbidity readings were the same for all of the $WR_{W/C}$ at this plateau, indicative that maximum binding was achieved between W and C in the $WR_{W/C}$ range of 3:1–6:1, except for the 2:1 $WR_{W/C}$, which exhibited lower turbidity readings. These results also indicate that increasing the W to C ratio does not increase the amount of binding between W and C possibly because at a $WR_{3/1}$, the binding sites at C are saturated. For this reason, a $WR_{3/1}$ was used to obtain the $ME_{x,y}$. At a pH value below the isoelectric point ($pI \sim 4.2$), turbidity dropped sharply for all the WR, with precipitation of the biopolymer complex occurring, followed by minimum turbidity readings in a pH range between 3.75 and 2.25 (region C). At pH values of around 2.25 or lower, decomplexation between the W and C occurred, resulting in an increased turbidity. Ru et al. (2012) mentioned that when pH decreases to values below pK_a of the polysaccharide, polysaccharide/protein coacervates may dissociate into soluble complexes or even into non-interacting individual protein and polysaccharide molecules, due to low charges of polysaccharide chains and strong repulsion between the positively charged proteins.

3.2. ζ -Potential of W and C solutions

Electrostatic forces are usually the major driving force for the interaction of charged biopolymers in aqueous solutions, and so it was important to determine the electrical characteristics of the biopolymers used in this work. The pH dependence of the zeta potential (ζ) for the W (1.5 g/100 g) and C (0.5 g/100 g) solutions is shown in Fig. 2. The ζ values for the C solution were negative throughout the pH range studied, varying from -6.1 ± 1.8 mV at $pH = 2.0$ to -105.0 ± 3.3 mV at $pH = 8.0$ reflecting the very low pK_a of the carboxylic moieties (Jones et al., 2011). For W, ζ varied between 21.7 ± 6.5 mV at $pH = 2.0$ to -24.6 ± 5.7 mV at $pH = 8.0$. A zero ζ value occurred at pI ($\sim pH$ of 4.2). The negative ζ values that occurred at pH values >4.2 can be attributed to the ionization of the carboxylic moieties ($-\text{COOH}$) giving rise to carboxylate groups ($-\text{COO}^-$), while the positive ζ values at pH values <4.2 are due to the protonation of the amino moieties ($-\text{NH}_2$) giving rise to ammonium groups ($-\text{NH}_3^+$). This trend is in agreement with that reported by several authors (Weinbreck et al., 2004; Jiménez-Alvarado et al., 2009; Koupantsis and Kiosseoglou, 2009). The strength of the electrostatic interaction between oppositely charged polyelectrolytes can be calculated as the product of the absolute value of ζ -potential of both macromolecules at different pH values (Weinbreck et al., 2004). The pH range where maximum absolute charge difference was displayed between the W and C fell in

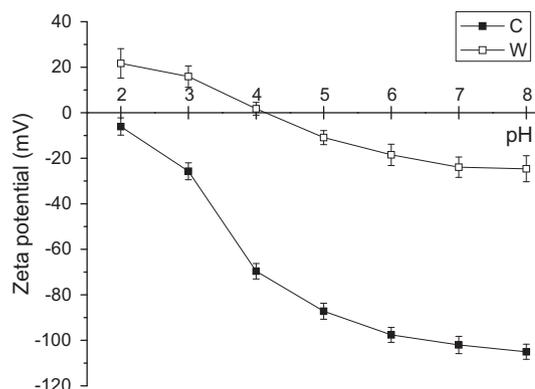


Fig. 2. ζ potential-pH profiles for 1.5 g/100 g W and 0.5 g/100 g C solutions.

between pH 2.0 and 4.0 (Fig. 2). Based on these results and those of the turbidity shown in the previous section, the outer aqueous phase of the ME_{x,y} was adjusted to pH of 3.7, 4.0 and 4.3 as explained in section 2.4.

3.3. ME_{x,y} droplet size and morphology

All of the fresh ME_{x,y} were characterized for exhibiting type C morphology (Garti, 1997), i.e. they were made up by spherical oil droplets containing within them a large number of water droplets (Fig. 3). The ME_{x,y} droplet size evolution was affected by both the biopolymers adsorption technique (PF or LL) and the pH_i used in their manufacture (Fig. 4). In general terms, the ME_{LL} tended to exhibit larger initial $d_{3,2}$ than the ME_{PF}, and both types of emulsion displayed an increasingly smaller initial $d_{3,2}$ as pH_i was increased from 3.7 to 4.3. The $d_{3,2}$ of the ME_{LL} tended to decrease slightly during the first days of storage, followed by an increase at longer storage times, while the opposite behaviour was shown by the ME_{PF}. The relative change of $d_{3,2}$ between $t = 1$ h and $t = 504$ h was as

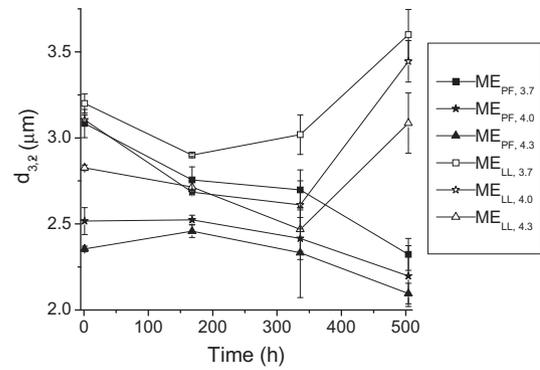


Fig. 4. Droplet size changes with storage time of the ME.

follows: ME_{PF,3.7} = -24.7%, ME_{PF,4.0} = -12.7%, ME_{PF,4.3} = -11.0%, ME_{LL,3.7} = 12.5%, ME_{LL,4.0} = 10.9%, and ME_{LL,4.3} = 9.2%, where + values indicate a relative size increase and the - values a relative size

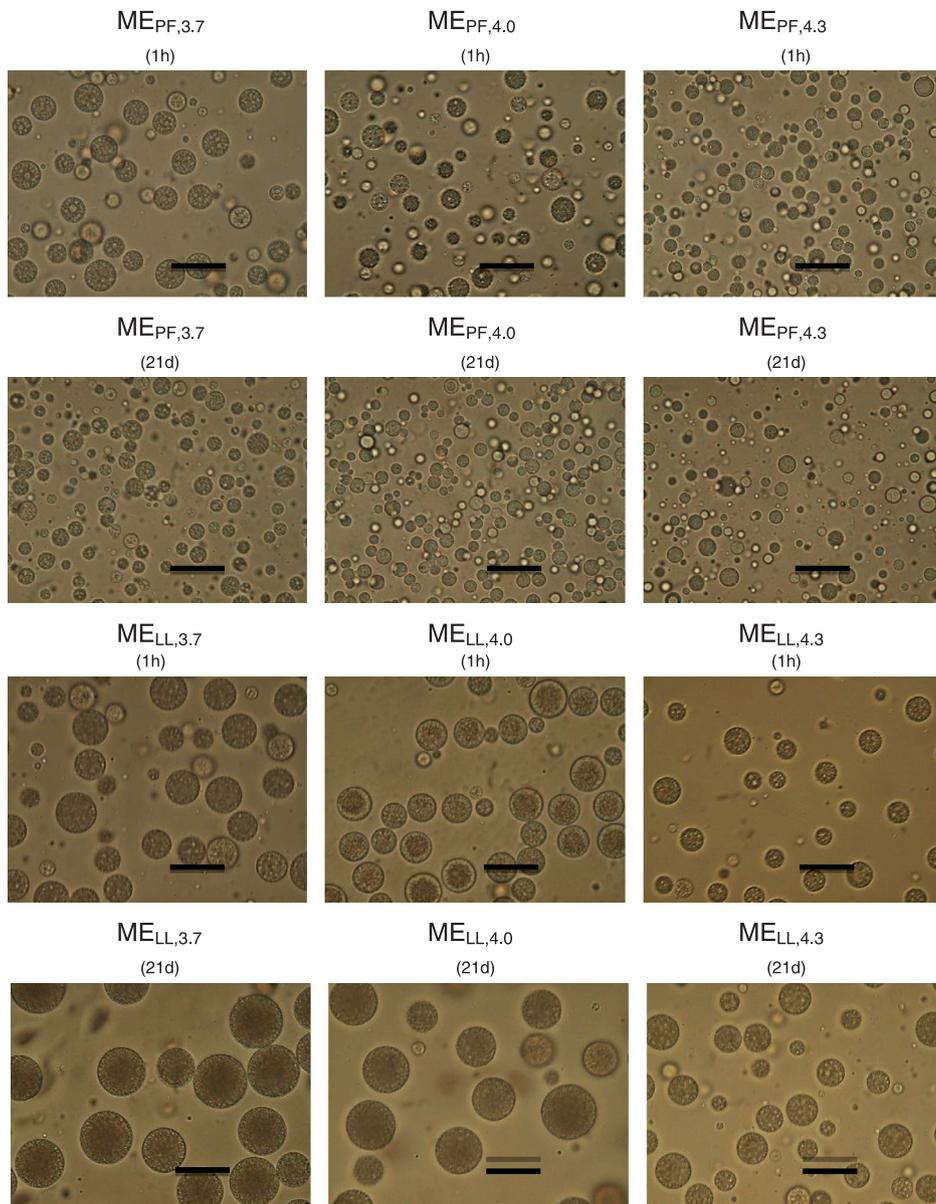


Fig. 3. ME droplets morphology aged 1 h and 504 h. Magnification is 100×, scale bar = 5 μm.

decrease. These results indicate that although all of the $ME_{x,y}$ emulsions were quite stable, those made at pH 4.3 suffered smaller droplet size variation than those made at pH's of 3.7 and 4.0 so that they may be considered to be more stable. Fig. 3 shows micrographs for all of the $ME_{x,y}$ taken after 1 h and 504 h of storage time, and they provide a visual confirmation of the droplet size behaviour described above. Although droplet size changes in both types of multiple emulsions was significant, it is important to observe that all of the $ME_{x,y}$ maintained their type C morphology during storage time. The destabilization processes available to multiple emulsions systems are necessarily much more varied than those for simple emulsions. For example, the outer droplet interface may coalesce with one or more multiple emulsion droplets; the individual internal aqueous droplets can be expelled sequentially from the multiple emulsions droplets; gradual shrinkage of the internal droplets is possible due to osmotic gradient between the inner and continuous aqueous phases, when net mass transport of water occurs from the inner phase to the outer continuous phase through the oil film acting as a "semi-permeable membrane"; and conversely, when the osmotic gradient acts in the opposite direction, water diffusion through the oil film from the continuous phase into the encapsulated aqueous droplets will produce swelling of these inner droplets. A successful formulation of stable multiple emulsions requires the blocking of each of these instability pathways (Dickinson and McClements, 1996). A strategy for achieving this aim is to structure the interfacial membranes in order to minimise the diffusional effects through them and to enhance the rheological properties of the emulsions. Thus, it is reasonable to infer that the structure and stabilizing properties of the mixed protein + polysaccharide layer around the $ME_{x,y}$ depended on the sequence of adsorption of the biopolymers to the interface, pH and biopolymer charge distribution (Dickinson, 2008).

3.4. Rheological properties of the ME

Small-deformation rheological behaviour is a sensitive probe of the state of aggregation of droplets and hence of the colloidal interactions. The state of aggregation depends on the interactions between adsorbed biopolymer layers on different droplets, which in turn depend on factors such as the biopolymer surface coverage, the layer thickness, the surface charge density, and the aqueous solution conditions (Dickinson, 2001). The strain dependent data of the storage modulus (G') showed differences between the $ME_{x,y}$ (Fig. 5a). Based on the G' data, maximum strain% at which LVR occurred varied as follows: $ME_{LL,4.3}$ (1.2%) > $ME_{PF,4.3}$ (1.1%) > $ME_{LL,4.0}$ (1.0%) = $ME_{PF,4.0}$ (1.0%) = $ME_{LL,3.7}$ (1.0%) > $ME_{PF,3.7}$ (0.9%) at 1 Hz. The strain range over which $ME_{x,y}$ exhibited linear viscoelastic behaviour may be indicative of the complex intermolecular forces taking place at the oil–water interface.

G' values in the LVR for the freshly made $ME_{x,y}$ was as follows: $ME_{LL,4.3}$ (3.17 Pa) > $ME_{PF,4.3}$ (2.02 Pa) > $ME_{LL,4.0}$ (1.15 Pa) > $ME_{PF,4.0}$ (0.43 Pa) = $ME_{PF,3.7}$ (0.43 Pa) = $ME_{LL,3.7}$ (0.25 Pa). Higher maximum strain% values were related with higher G' values in the $ME_{x,y}$.

The loss modulus (G'') versus strain behaviour (Fig. 5b) showed similar trends and profiles as those exhibited by the G' -strain% curves of the $ME_{x,y}$. The G'' values in the LVR region in descending order were: $ME_{LL,4.3}$ (3.96 Pa) > $ME_{PF,4.3}$ (2.34 Pa) > $ME_{LL,4.0}$ (1.84 Pa) > $ME_{PF,4.0}$ (0.77 Pa) = $ME_{PF,3.7}$ (0.63 Pa) = $ME_{LL,3.7}$ (0.63 Pa). The variation of $\tan \delta$ as a function of strain is shown in Fig. 5c. The loss tangent, $\tan \delta$ (G''/G'), is a dimensionless value that indicates whether viscous or elastic properties predominate in samples (Lobato-Calleros et al., 2009). The $\tan \delta$ values for all the ME were higher than 1.0 in all the strain range studied. That is, G'' values were always greater than G' values in the range of strain% studied, indicating a dominant viscous character of the $ME_{x,y}$

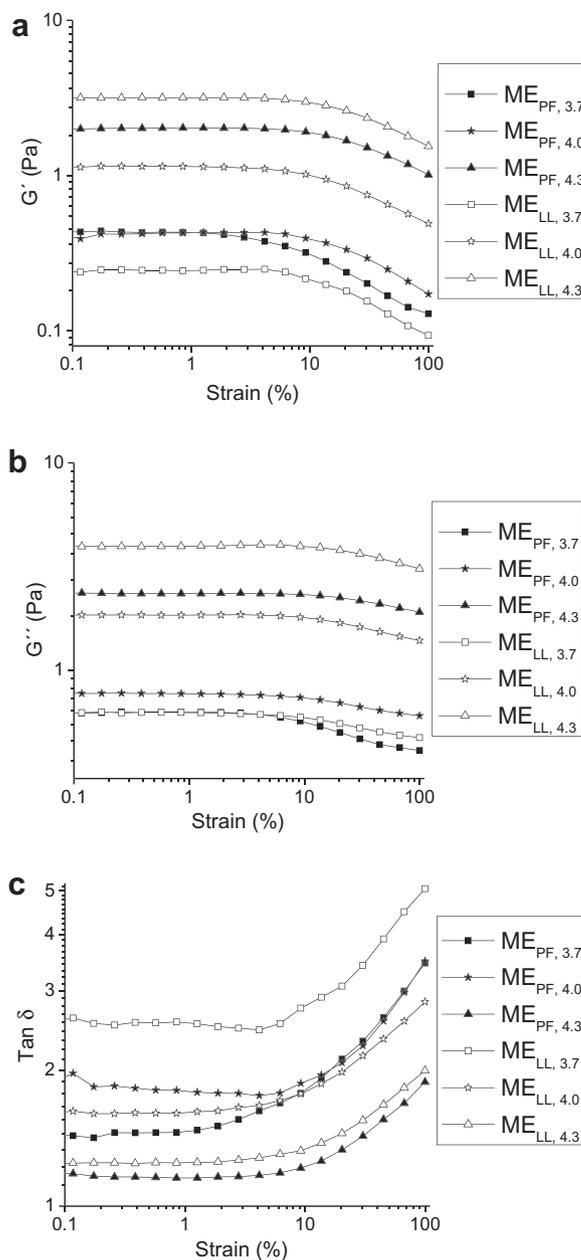


Fig. 5. ME strain dependence of G' (a), G'' (b) and $\tan \delta$ (c).

characterized by the energy dissipation used to induce flow of these systems (Ferry, 1980).

Multifactor variance analyses (Table 1) of the $ME_{x,y}$ viscoelastic properties indicate that both pH_i and biopolymers adsorption technique influenced the G' , G'' and $\tan \delta$ values. As the pH_i of $ME_{x,y}$ increased from 3.7 to 4.3, so did the G' and G'' values, while the $\tan \delta$ values decreased. These results are consistent with the droplet sizes (Fig. 4) and micrographs (Fig. 3) of the $ME_{x,y}$, suggesting that as the number of droplets increased per unit volume of emulsions, increased interactions arose between the adsorbed biopolymer layers between neighbouring droplets. Soluble complexes are often formed above the pI of the protein, even though both the protein and polysaccharide have a net negative charge, because of the presence of positive patches on the protein's surface to which anionic polysaccharide can bind (Jones and McClements, 2010). On the other hand, at pH_i values below the pI of the protein, stronger interactions arise between the positively charged protein and

Table 1
Multifactor variance analyses of the rheological properties of the ME.

Factor	pH _i			Biopolymers adsorption	
	3.7	4.0	4.3	PF	LL
G' (Pa)	0.3 ± 0.1 ^a	0.8 ± 0.4 ^a	2.6 ± 0.7 ^a	1.0 ± 0.8 ^a	1.5 ± 1.3 ^a
G'' (Pa)	0.6 ± 0.0 ^a	1.3 ± 0.6 ^a	3.2 ± 0.9 ^a	1.2 ± 0.9 ^a	2.1 ± 1.5 ^a
Tan δ	2.0 ± 0.6 ^a	1.7 ± 0.1 ^a	1.2 ± 0.1 ^a	1.5 ± 0.3 ^a	1.8 ± 0.6 ^a
K (Pa s ⁿ)	0.4 ± 0.1 ^a	0.5 ± 0.1 ^a	1.8 ± 0.1 ^a	0.6 ± 0.1 ^a	1.2 ± 0.1 ^a
n (dimensionless)	0.8 ± 0.0 ^a	0.7 ± 0.0 ^a	0.5 ± 0.0 ^a	0.7 ± 0.1 ^a	0.5 ± 0.1 ^a

pH_i = Interaction pH; LL = layer-by-layer biopolymer adsorption; PF = pre-formed soluble complex adsorption.

^a Different superscripts within the same line corresponding to a factor indicate that the means differ significantly ($p < 0.05$).

negatively charged polysaccharide molecules, which may induce an excess soluble complex formation in the bulk between these two biopolymers, leading to a depletion of free protein for adsorption at the interface, and hence to larger droplet sizes (Murray, 2011).

The higher viscoelastic properties exhibited by ME_{LL} than ME_{PF} at a given pH_i adsorption can be attributed to the mechanics of biopolymer adsorption at the interface. In the case of the ME_{PF}, the soluble protein-polysaccharide complexes tend to adsorb at the interface forming a single complex layer, while in the case of ME_{LL}, the polysaccharide addition after protein adsorption has taken place can maximize the formation of protein-polysaccharide complexes at the interface and of the adsorbed layers thickness (Ganzevles et al., 2006), producing more resistant layer to strain than those corresponding to the ME_{PF} prepared by PF technique.

Shear rheological measurement provide a sensitive technique for distinguishing the flow properties between emulsions formed under different conditions. All of the ME_{x,y} exhibited an apparent viscosity (η_{app})-shear rate ($\dot{\gamma}$) behaviour characteristic of shear thinning fluids (Fig. 6). The flow properties of the ME_{x,y} were fitted to different models, but the model that best described the experimental data ($R^2 > 0.97$) was the Oswald-de Waele or power law equation:

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

where σ is the shear stress (Pa); K is consistency index (Pa sⁿ); $\dot{\gamma}$ is shear rate (s⁻¹); and n is the flow index (dimensionless).

Multifactorial variance analysis showed that both, the pH_i and biopolymers adsorption technique, affected the rheological parameters n and K of the ME_{x,y} (Table 1). The consistency index, being numerically equal to viscosity at 1 s⁻¹ shear rate, is typically adopted when a comparison among different viscosity levels is required and it is a measure of the material “body”. The flow index (n) is a measure of the mechanical stability. The lower is n , the higher the slope of viscosity versus shear rate curve, and the stron-

ger the de-structurization rate (Gabrielle et al., 2009). The values of n decreased with increase in pH and also n for ME_{LL} was lower than ME_{PF} (Table 1).

4. Conclusions

Emulsion stability and rheological properties are the most important characteristics when a new product is developed. In this work, it was established that multiple emulsions with different rheological properties and stability could be obtained by using different protein-polysaccharide complexes adsorption techniques and pH values in their manufacture. In this way, insights could be gained for incorporating these multiple emulsions in new food products for achieving desired and improved functional properties. For example, in this work it was found that higher viscoelastic properties and smaller droplet size variations were obtained when the multiple emulsions were made by the layer-by-layer biopolymers adsorption technique and when interaction pH was higher, so that a better degree of food structuring could probably be achieved with this multiple emulsion. On the other hand, the multiple emulsions obtained using the pre-formed complexes technique, showed a decrease in droplet size with storage time, probably due to the expulsion of primary emulsion droplets into the bulk solution. Thus, if the aim of the new product is to release a bioactive compound, probably latter type of multiple emulsion could provide the best functionality. The results of this work may help to better understand the influence of the adsorption sequence of the biopolymers at the interface, interaction pH and biopolymers charge distribution on multiple emulsions stability and functionality.

References

- Bergenstahl, B., 1995. Emulsions. In: Beckett, S.T. (Ed.), *Physico-Chemical Aspects of Food Processing*. Blackie Academic & Professional, London, pp. 49–64.
- Dickinson, E., 2001. Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 20, 197–210.
- Dickinson, E., 2008. Interfacial structure and stability of food emulsions as affected by protein-polysaccharide interactions. *Soft Matter* 4, 932–942.
- Dickinson, E., Euston, S.R., 1991. Stability of food emulsions containing both protein and polysaccharide. In: Dickinson, E. (Ed.), *Food Polymers, Gels and Colloids*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 132–146.
- Dickinson, E., McClements, D.J., 1996. *Advances in Food Colloids*. Blackie Academic & Professional, London.
- Espinosa-Andrews, H., Lobato-Calleros, C., Loeza-Corte, J.M., Beristain, C.I., Rodríguez-Huezo, M.E., Vernon-Carter, E.J., 2008. Quantification of the composition of gum Arabic-chitosan coacervate by HPLC. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 7, 293–298.
- Ferry, J.D., 1980. *Viscoelastic Properties of Polymers*, vol. 3. JohnWiley and Sons Inc., New York.
- Gabrielle, D., Migliori, M., Di Sanzo, R., Rossi, C.O., Ruffolo, S.A., de Cindio, B., 2009. Characterization of dairy emulsions by NMR and rheological techniques. *Food Hydrocolloids* 23, 619–628.
- Ganzevles, R.A., Zinoviadou, K., van Vliet, T., Cohen Stuart, M.A., de Jongh, H.H.J., 2006. Modulating surface rheology by electrostatic protein/polysaccharide interactions. *Langmuir* 22, 10089–10096.
- Garti, N., 1997. Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food applications. *LWT – Food Science and Technology* 30, 222–235.

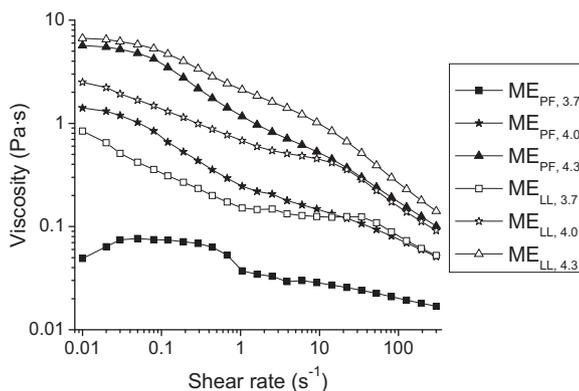


Fig. 6. Apparent viscosity-shear rate behaviour of the ME.

- Jiménez-Alvarado, R., Beristain, C.I., Medina-Torres, L., Román-Guerrero, A., Vernon-Carter, E.J., 2009. Ferrous bisglycinate and release in $W_1/O/W_2$ multiple emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes. *Food Hydrocolloids* 23, 2425–2433.
- Jones, O.G., McClements, D.J., 2010. Functional biopolymer particles: design, fabrication, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9, 374–397.
- Jones, O.G., Handschin, S., Adamcik, J., Harnau, L., Bolisetty, S., Mezzenga, R., 2011. Complexation of β -lactoglobulin fibrils and sulfated polysaccharides. *Biomacromolecules* 12, 3056–3065.
- Jourdain, L.S., Schmitt, C., Leser, M.E., Murray, B.S., Dickinson, E., 2009. Mixed layers of sodium caseinate + dextran sulfate: influence of order of addition to oil-water interface. *Langmuir* 25, 1026–1037.
- Koupantsis, T., Kiosseoglou, V., 2009. Whey protein-carboxy methylcellulose interaction in solution and in oil-in-water emulsion systems. Effect on emulsion stability. *Food Hydrocolloids* 23, 1156–1163.
- Lobato-Calleros, C., Recillas-Mota, M.T., Espinosa-Solares, T., Alvarez-Ramirez, J., Vernon-Carter, E.J., 2009. Microstructural and rheological properties of low-fat stirred yoghurts made with skim milk and multiple emulsions. *Journal of Texture Studies* 40, 657–675.
- Lobato-Calleros, C., Sosa Pérez, A., Rodríguez-Tafoya, J., Sandoval-Castilla, O., Pérez-Alonso, C., Vernon-Carter, E.J., 2008. Structural and textural characteristics of reduced-fat cheese-like products made from $W1/O/W2$ emulsions and skim milk. *LWT – Food Science and Technology* 41, 1847–1856.
- Mora-Huertas, C.E., Fessi, H., Elaissari, A., 2010. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 385, 113–142.
- Murillo-Martínez, M.M., Pedroza-Islas, R., Lobato-Calleros, C., Martínez-Ferez, A., Vernon-Carter, E.J., 2011. Designing $W_1/O/W_2$ double emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes for producing edible films: rheological, mechanical and water vapour properties. *Food Hydrocolloids* 25, 577–585.
- Murray, B.S., 2011. Rheological properties of protein films. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 16, 27–35.
- Nisisako, T., Okushima, S., Torii, T., 2012. Controlled formulation of monodisperse double emulsions in a multiple-phase microfluidic system. *Soft Matter* 1, 23–27.
- 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 & Technology* 92, 383–398.
- Ru, Q., Wang, Y., Lee, J., Ding, Y., Huang, Q., 2012. Turbidity and rheological properties of bovine serum albumin/pectin coacervates: effect of salt concentration and initial protein/polysaccharide ratio. *Carbohydrate Polymers* 88, 838–846.
- Ruiz-Ramos, J.O., Pérez-Orozco, J.P., Báez-González, J.G., Bósquez-Molina, E., Pérez-Alonso, C., Vernon-Carter, E.J., 2006. Interrelationship between the viscoelastic properties and effective moisture diffusivity of emulsions with the water vapor permeability of edible films stabilized by mesquite gum-chitosan complexes. *Carbohydrate Polymers* 64, 355–363.
- Savant, V.D., Torres, J.A., 2000. Chitosan-based coagulating agents for treatment of Cheddar cheese whey. *Biotechnology Progress* 16, 1091–1097.
- Schmitt, C., Turgeon, S.L., 2011. Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Advances in Colloid and Interface Science* 167, 63–70.
- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., 1995. *Química Analítica*. McGraw Hill, Mexico City.
- Weinbreck, F., Tromp, R.H., de Kruif, C.G., 2004. Composition and structure of whey protein/gum Arabic coacervates. *Biomacromolecules* 5, 1437–1445.
- Ye, A., 2008. Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interaction: principles and applications – a review. *International Journal of Food Science and Technology* 43, 406–415.