

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS Y DE LA SALUD



*DESARROLLO DE EMULSIONES MÚLTIPLES W/O/W ESTABLES
CONTENIENDO COLORANTES HIDRO Y LIPO DISPERSABLES
COMO PRECURSORES DE MICROENCAPSULADOS*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA

JUDITH SOSA FRAGOSO

Junio del 2004

“El posgrado en Biotecnología de la UAM-Iztapalapa está incluido en el Padrón de Posgrado de excelencia del CONACYT, y a demás cuenta con el apoyo del mismo consejo con el convenio 471-O/ maestría en Biotecnología.”

AGRADECIMIENTOS

El autor desea agradecer a Dios por las enseñanzas del camino,

Al Dr. Eduardo Jaime Vernon Carter por la paciencia, el apoyo y orientación recibidas,

A mis asesores la Dra. Edith Ponce Alquicira y el Dr. Francisco Cruz Sosa por su apoyo y colaboración.

A mis sinodales la Dra Ruth Pedroza Islas y la Dra. Consuelo Lobato Calleros

A mis padres por su amor, confianza y apoyo,

A Mariano por su motivación y ayuda,

A Cesar, Juan Pablo y Juan Gabriel por su paciencia y su ayuda

A mi familia por su apoyo y compañía.

Al apoyo económico recibido para el desarrollo de éste trabajo al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del convenio G-33565-B.

INDICE GENERAL

1	Introducción	1
1.1	Definición y clasificación de las emulsiones	2
1.2	Formación y características de una emulsión	4
1.3	Estabilidad de las emulsiones	5
1.4	Hidrocoloides	11
1.5	Microencapsulación	14
1.6	Importancia de los carotenoides	17
2	Justificación	19
3	Objetivos	21
4	Hipótesis	23
5	Metodología experimental	25
5.1	Materiales y equipo	26
5.2	Formulación de las emulsiones múltiples	27
5.2.1	Selección de la concentración del agente emulsificante lipofílico en la emulsión W_1/O	27
5.2.2	Determinación de la relación de la mezcla de agentes emulsificantes en la emulsión W_1/O	28
5.2.3	Determinación de la fracción de fase dispersa en la emulsión W_1/O	29
5.2.4	Determinación de la concentración de biopolímeros en la emulsión O/W_2	30
5.2.5	Determinación de la mezcla de biopolímeros en la emulsión O/W_2	31
5.2.6	Selección del tiempo de agitación en la emulsión O/W_2	31
5.2.7	Selección de la concentración de goma de gelana	32
5.2.8	Selección de los colorantes lipo e hidrodispersables	33
5.2.9	Estabilidad de la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ a través del tiempo conteniendo colorantes lipo e hidrodispersables	34
5.2.10	Rendimiento de las emulsiones múltiples	35
6	Resultados y discusión	36
6.1	Emulsión interna W_1/O	
6.1.1	Selección de la concentración del agente emulsificante lipofílico en la emulsión interna W_1/O	37
6.1.2	Determinación de la relación de la mezcla de agentes Emulsificantes hidrofílico-lipofílico	39
6.1.3	Selección de la fracción volumétrica de fase dispersa (ϕ)	42

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Morfología de las emulsiones	3
Figura 2 Mecanismos responsables de la inestabilidad de emulsiones simples	6
Figura 3 Representación global de los diferentes mecanismos de desestabilización de las emulsiones $W_1/O/W_2$	8
Figura 4 Unidad de isopreno	17
Figura 5 Carotenoides de Chile Rojo y de la Flor de Cempasúchil	18
Figura 6 Concentración de emulsificante lipofílico para la emulsión interna W_1/O	39
Figura 7 Mezcla de agentes emulsificantes en la emulsión interna W_1/O	41
Figura 8 Fracción volumétrica de la fase dispersa (\emptyset) en la emulsión interna W_1/O	43
Figura 9 Comportamiento de $D_{4,3}$ a diferentes concentraciones de goma de mezquite en la emulsión externa O/W_2	47
Figura 10 Comportamiento de $D_{4,3}$ a diferentes concentraciones de suero de leche en la emulsión externa O/W_2	47
Figura 11 Mezcla de goma de mezquite y suero de leche en la emulsión externa O/W_2	49
Figura 12 Tiempo de agitación para la emulsión externa O/W_2	51
Figura 13 Concentración de goma de gelana dentro de la fase acuosa interna de la emulsión múltiple $W_1/O/ W_2$	52
Figura 14 Mezcla de colorantes hidrodispersables (MUC) y lipodispersables (REC)	53
Figura 15 Tamaño de partícula de la emulsión interna y externa de la emulsión múltiple $W_1/O/ W_2$	56
Figura 16 Relación entre el diámetro interno y externo de la emulsión $W_1/O/ W_2$ a través del tiempo	57
Figura 17 Microfotografías de emulsiones múltiples a través del tiempo	59
Figura 18 Microfotografía de microcapsulas obtenidas de la emulsión $W_1/O/W_2$ conteniendo colorantes hidro y lipodispersables	60

INDICE DE TABLAS

Tabla.1 Mezclas de colorantes naturales	33
Tabla.2 Comparación de tamaño medio de partícula a diferente concentración de emulsificante en la emulsión interna W_1/O	39
Tabla.3 Formulación de la emulsión múltiple	54
Tabla.4 Cinética de coalescencia	58

6.2	Determinación de las condiciones de la fase externa de la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ por medio del comportamiento de emulsiones O/W_2	
6.2.1	Selección de la concentración de biopolímeros goma de mezquite y suero de leche	44
6.2.2	Determinación de la mezcla de biopolímeros goma de mezquite y suero de leche	48
6.2.3	Selección del tiempo de agitación de la emulsión externa O/W_2	50
6.3	Emulsión múltiple $W_1/O/W_2$	
6.3.1	Selección de la concentración de goma gelana en la fase acuosa interna	51
6.3.2	Selección de los colorantes lipo e hidrodispersables	53
6.3.3	Estabilidad y rendimiento de la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ A través del tiempo conteniendo colorantes lipo e hidrodispersables	55
7	Conclusiones	61
8	Bibliografía	64
9	Anexos	68
	Anexo A Métodos para la determinación del diámetro en la emulsión Interna y externa	69
	Determinación del diámetro por medio del analizador de Partículas Malvern series 2600	70
	Anexo B Diámetros a través del tiempo de la emulsión interna, externa y múltiple	71
10	Glosario	77

Resumen

Se formularon emulsiones múltiples $W_1/O/W_2$ que permitieron la encapsulación de carotenoides naturales hidro y lipodispersables, estabilizando la emulsión interna (W_1/O) con una mezcla de emulsificantes de bajo peso molecular, y la emulsión múltiple con una mezcla de biopolímeros. La fase acuosa de la emulsión W_1/O contuvo carotenoides saponificados de flor de cempasúchil, y la fase oleosa intermedia de la emulsión $W_1/O/W_2$ contuvo carotenoides esterificados de chile. La concentración total de carotenoides en la emulsión múltiple fue de 0.5% en una relación de 1:2:6 carotenoides hidrosolubles a carotenoides liposolubles. La formación de la emulsión múltiple se hizo por el método de dos etapas, en donde inicialmente se forma la emulsión interna (W_1/O) y esta se agrega a una solución acuosa de biopolímeros para obtener la emulsión múltiple ($W_1/O/W_2$).

La estabilidad y tamaño de partícula de la emulsión interna W_1/O son críticos en la estabilidad de la emulsión $W_1/O/W_2$. En este trabajo se estableció que una emulsión interna estable con tamaño de partícula muy pequeño alrededor de 0.1 μm se podía obtener con una fracción volumétrica de la fase acuosa de 0.2, una relación de agente emulsificante hidrofílico (Panodan SDK) a emulsificante lipofílico (Grinsted PGPR) de 20:80 a una concentración del 8% (p/p), e incorporando goma gelana al 0.4%(p/p) en la fase acuosa. Esta emulsión se homogenizó con un homogenizador de alto corte a 5800 rpm por 8 min.

La estabilidad de la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ depende en gran medida de que su tamaño de partícula sea lo suficientemente grande para poder contener una concentración elevada de gotas de emulsión sencilla W_1/O , pero que a la vez que la capa adsorbida de biopolímeros sea lo suficientemente gruesa y viscoelástica para estabilizar la emulsión cinéticamente. En este trabajo se encontró que el uso de una mezcla del polisacárido goma de mezquite en

combinación con la proteína de suero de leche en una relación 40:60 en una concentración del 25% (p/p) resultaba en una emulsión múltiple estable con un adecuado tamaño de partícula alrededor de 3 μm cuando la fracción volumétrica de emulsión interna fue de 0.2. Esta emulsión se homogenizó con un homogenizador de alto corte a 5000 rpm por 3 min.

La emulsión final obtenida resultó ser estable a los fenómenos de desestabilización como la floculación y coalescencia ya que los diámetros de las gotas obtenidos resultaron ser constantes a través del tiempo.

Abstract

Water-oil-in-water ($W_1/O/W_2$) multiple emulsions that allowed core water soluble to oil soluble carotenoids were formulated by stabilizing the inner W_1/O emulsion with a blend of low molecular weight emulsifiers, and the multiple emulsion with a blend of biopolymers. The inner phase of the W_1/O emulsion contained saponified carotenoids from marigold petals, and the intermediate oil phase of the $W_1/O/W_2$ emulsion contained esterified carotenoids from red chillies. The total carotenoids concentration in the multiple emulsion was 0.5%, and the ratio of water soluble to oil soluble carotenoids was 1:2.6. Formation of the multiple emulsion was done by the two stage procedure, where initially the inner (W_1/O) emulsion is formed, and then added to a biopolymer aqueous phase in order to obtain the $W_1/O/W_2$ emulsion.

The stability and particle size of the inner (W_1/O) emulsion are critical to the stability of the $W_1/O/W_2$ emulsion. In this work it was established that a stable inner emulsion with a very small particle size (0.1 μm) could be obtained with an aqueous volumetric fraction of 0.2, a ratio of hydrophilic (Panodan SDK) to lipophilic (Grinsted PGPR) emulsifier of 20:80 at a concentration of 8% (w/w), and with the inclusion of 0.4% (w/w) gellan gum in the aqueous phase. This emulsion was homogenized with a high shear homogenizer at 5800 rpm for 8 min.

The stability of a $W_1/O/W_2$ multiple emulsion greatly depends in that its particle size is sufficiently large (3 μm) so as to be able to contain a high concentration of W_1/O emulsion droplets, but that on turn the adsorbed biopolymers layer may be sufficiently thick and viscoelastic in order to attain kinetic stability. In this work it was found that by using a blend of the polysaccharide mesquite gum and the protein from milk whey in a ratio 40:60 and a concentration of 25% (w/w), a stable $W_1/O/W_2$ multiple emulsion with an adequate particle size

was obtained when the volume fraction of the inner emulsion was 0.2. This emulsion was homogenized with a high shear homogenizer at 5000 rpm for 3 min.

The final emulsion was stable at mechanisms of flocculation and coalescence because of that its particle size were constants across the time.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Definición y clasificación de las emulsiones

Una emulsión consiste de dos líquidos inmiscibles (usualmente agua y aceite), uno de ellos disperso como pequeñas gotas esféricas en el otro. Al hablar de emulsiones es necesario poder distinguir claramente cada una de las fases presentes. La fase que está presente en forma de gotas finamente divididas se le llama fase dispersa o interna, la fase que forma la matriz en que se suspenden estas gotas se llama fase continua o externa, las emulsiones son clasificadas según la distribución de sus fases como aceite en agua (O/W) o agua en aceite (W/O) (McClements, 1999).

Es posible preparar emulsiones del tipo múltiple o también conocidas como emulsiones de emulsiones, éstas pueden ser del tipo agua en aceite en agua ($W_1/O/W_2$) o aceite en agua en aceite ($O_1/W/O_2$), las gotas de fase dispersa contienen pequeñas gotas dispersadas. Cada uno de los glóbulos dispersados en una emulsión múltiple del tipo $W_1/O/W_2$ forma una estructura vesicular con simples o múltiples compartimentos de fase acuosa interna separados de la fase acuosa por una capa del compartimento de la fase oleosa.

Las emulsiones múltiples que son clasificadas tradicionalmente de acuerdo a la distribución de sus fases en dos tipos, agua en aceite en agua ($W_1/O/W_2$) y aceite en agua en aceite ($O_1/W/O_2$), pueden presentar diferente morfología dependiendo del tipo y tamaño de gotas dentro de la emulsión y son comúnmente conocidos como tipo A, B y C (Figura 1) (Garti, 1997a).

Las emulsiones tipo A son sistemas compuestos predominantemente por una gota de la fase interna. Las emulsiones tipo B pueden contener de fase interna una o más gotas. Las emulsiones tipo C contienen gran número de gotas de fase interna, este tipo de emulsión presenta la mejor estabilidad y

generalmente es considerada como el mejor vehículo controlador de la liberación de sustituyentes.

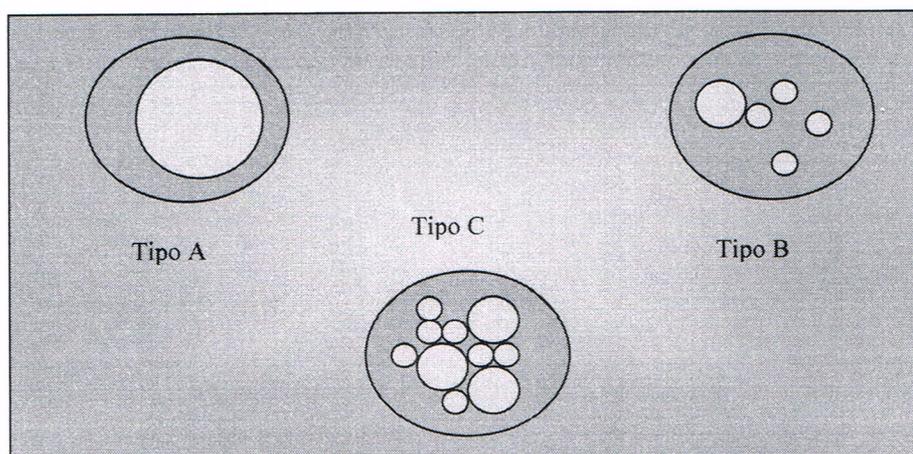


Figura 1. Morfología de las emulsiones

La primera descripción de las emulsiones múltiples fue en 1925 y no es sino hasta los últimos 25 a 30 años que se han estudiado con mayor detalle (Garti y Aserín, 1996) incrementando el interés por el uso de este tipo de emulsiones en diversos campos como la separación de hidrocarburos, tratamiento de aguas, inmovilización de enzimas, liberación prolongada de fármacos (Florence y Whitehill, 1981) así como en el área de alimentos, cosméticos y agricultura.

Las emulsiones múltiples ofrecen ventajas para su uso en la industria de los alimentos debido a la capacidad que tienen de encapsular en los compartimentos internos algunas sustancias solubles en agua o compuestos volátiles que pueden ser lentamente liberados, así como la formación de productos bajos en grasa, etc. (Garti, 1997b).

El tipo de emulsión formada depende principalmente del método de elaboración y de los agentes emulsificantes utilizados. El método de preparación de emulsiones múltiples más comúnmente utilizado es el de dos etapas (Koberstein y Dickinson, 1996). Por éste método se pueden obtener emulsiones múltiples estables de composición definida y con una distribución en el tamaño de

las partículas reproducibles. En la primera etapa del método se forma una emulsión simple (W/O) usando una gran cantidad de agente emulsificante lipofílico, posteriormente en la segunda etapa, la primera emulsión (W/O) es dispersada en agua usando una baja cantidad de emulsificante hidrofílico y una mezcla de biopolímeros para obtener la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$. La obtención de una emulsión tipo C depende principalmente de la eficiencia obtenida en la segunda etapa de la emulsificación (Jiao y col., 2002).

1.2 Formación y características de una emulsión

Es posible la formación de una emulsión constituida por aceite puro y agua pura por medio de homogeneización, sin embargo estas fases se separarán rápidamente en un sistema que consiste en una capa de aceite (de baja densidad) sobre una capa de agua (de alta densidad), debido a que las gotas de aceite tienden a unirse junto con sus vecinas cuando éstas chocan, lo que lleva a la separación de las fases. La fuerte tendencia hacia este proceso es el hecho de que el contacto de las moléculas de aceite y de agua es energéticamente desfavorable por lo que las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables. También es posible la formación de emulsiones que son cinéticamente estables (metaestables) por periodos de tiempo (días, semanas, meses o años) pero éstas incluyen sustancias conocidas como emulsificantes y/o agentes espesantes previos a la homogeneización. Los emulsificantes son moléculas con actividad superficial que se adsorben en la superficie de las gotas durante la homogeneización, formando una membrana protectora que previene la agregación de las gotas. La mayoría de los emulsificantes son moléculas anfifílicas (contienen regiones polares y no polares en la misma molécula). Los agentes espesantes son ingredientes que son usados para incrementar la viscosidad de la fase continua de la emulsión y refuerza la estabilidad retardando el movimiento de las gotas (McClements, 1999).

Se puede considerar que las emulsiones están constituidas por tres regiones que tienen diferentes propiedades fisicoquímicas: el interior de las gotas, la fase continua y la interfase. Las moléculas en una emulsión se distribuyen en las tres regiones de acuerdo a su concentración y polaridad. Las moléculas no polares tienden a localizarse en la fase oleosa, las moléculas polares en la fase acuosa y las moléculas anfifílicas en la interfase. Debe notarse que hay un intercambio continuo de moléculas entre las diferentes regiones, incluso en el equilibrio, dependiendo del transporte de masa a través de las moléculas en el sistema.

Alrededor de cada gota de emulsión se forma una interfase que consiste en una estrecha región (de unos pocos nanómetros) que puede estar constituida por una mezcla de aceite, agua y moléculas de emulsificante. La región interfacial solo tiene una fracción significativa del volumen total de la emulsión donde el tamaño de las gotas es cerca de 1 μm ; sin embargo juega un papel importante en las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de la emulsión, por esta razón es necesario elucidar los factores que determinan la composición, estructura, espesor, reología y carga de la región interfacial (McClements, 1999).

1.3 Estabilidad de emulsiones

El término “estabilidad de la emulsión” es ampliamente usado para describir la capacidad de la emulsión a resistir cambios en sus propiedades a través del tiempo, existe una variedad de mecanismos fisicoquímicos que pueden ser los responsables de las alteraciones en las propiedades de la emulsión.

La inestabilidad física es el resultado de la alteración en la distribución espacial o la organización estructural de las moléculas, mientras que la inestabilidad química es el resultado de los cambios estructurales en las moléculas.

El cremado, sedimentación, floculación, coalescencia e inversión de fases son los mecanismos responsables de la inestabilidad física de las emulsiones simples (Figura 2). El cremado y la sedimentación son ambas formas de separación gravitacional, el cremado describe el movimiento de las gotas hacia arriba debido a una menor densidad que el líquido circundante, mientras que la sedimentación describe el movimiento hacia abajo de las gotas debido a una mayor densidad que el líquido circundante. Floculación y coalescencia son tipos de agregación de gotas, la floculación ocurre cuando dos o más gotas forman un agregado en donde las gotas retienen su integridad individual, la coalescencia ocurre cuando dos o más gotas forman una gran gota. La inversión de fases es el proceso en que una emulsión O/W es convertida en una emulsión W/O o viceversa (Garti y Aserín, 1996).

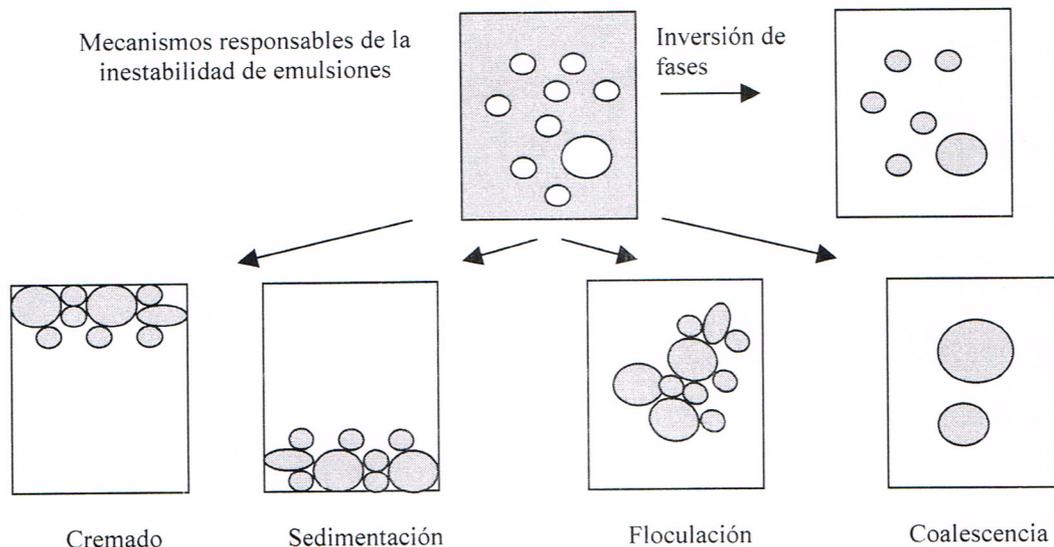


Figura 2. Mecanismos responsables de la inestabilidad de emulsiones simples

La oxidación e hidrólisis son ejemplos comunes de inestabilidad química. En la práctica dos o más de estos mecanismos de inestabilidad pueden ocurrir al mismo tiempo, esto es importante para los científicos ya que la contribución de

cada uno de estos mecanismos y su relación con los factores que influyen para controlar la estabilidad y las propiedades fisicoquímicas de las emulsiones pueden ser establecidas.

En una emulsión múltiple la variedad de mecanismos de desestabilización se incrementan (Florence y Whitehill,1981), pues además de presentar los ya mencionados, existen otros como los que se esquematizan en la Figura 3. En donde, por ejemplo, el proceso (b)-(c)-(d)-(e) representa un mecanismo mediante el cual las gotas acuosas internas son expulsadas de los glóbulos en forma individual y secuencial. También puede haber expulsiones simultáneas como los procesos (g) y (f). Cada uno de estos eventos involucra la ruptura de la película oleosa entre ambas fases acuosas.

Pueden presentarse procesos donde dos o más gotas internas coalescen, como por ejemplo en (h), (j) y (p). Por otro lado, debido a la diferencia de presión osmótica entre la fase acuosa interna y externa, puede haber migración de agua de la fase interna a la externa, proceso (l)-(m)-(n), o viceversa, proceso (b)-(o), dependiendo la dirección del gradiente de presión. Además, pueden presentarse combinaciones de los mecanismos ya descritos (Dickinson y McClements, 1996).

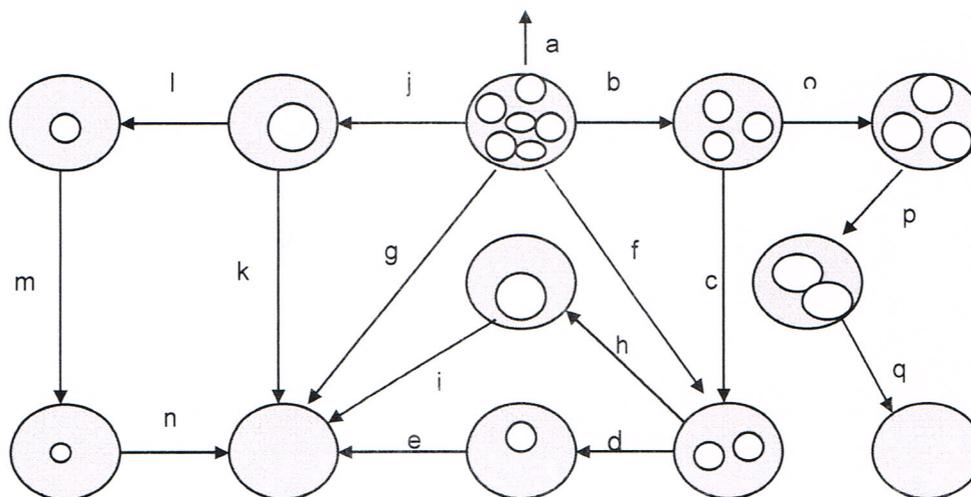


Figura 3. Representación global de los diferentes mecanismos de desestabilización de las emulsiones $W_1/O/W_2$.

Estos mecanismos de desestabilización son influenciados por la concentración de los emulsificantes en las fases acuosas, y en mayor grado, por la concentración del emulsificante liposoluble, la naturaleza y viscosidad de la fase oleosa, la naturaleza y concentración de los ingredientes que se encapsulan en la fase acuosa interna, o de aquellos que se piensan separar en la fase acuosa externa, así como la adsorción de moléculas en las interfases (Wen y Papadopoulos, 2001).

Se han estudiado diferentes técnicas enfocadas en la estabilidad de emulsiones $W_1/O/W_2$, como son, la técnica de "Coulter counter" para medir el tamaño de las gotas de aceite, la técnica microscópica de ataque del electrón libre para obtener la distribución del tamaño de gota interno y externo.

Kita y colaboradores (1997), miden el decremento en la viscosidad de sistemas $W_1/O/W_2$ tomando el agua que fue perdida desde la fase acuosa interna a la externa como índice de estabilidad, también estiman el número de gotas múltiples midiendo la migración de los iones desde la fase acuosa interna a la externa, ellos proponen que el agua es acarreada a través de la capa oleosa

posiblemente por la formación de micelas de surfactante a través de la delgada película de surfactante.

La naturaleza compleja de las emulsiones múltiples causa dificultad para evaluar la estabilidad y la detección de los fenómenos de coalescencia y ruptura de las gotas. La principal técnica está basada en medir el número y tamaño de gotas de emulsión múltiple durante un periodo de tiempo (Garti y Aserín, 1996).

Para la formulación de una emulsión múltiple estable se requiere del bloqueo de las vías que causan inestabilidad. Para prevenir la coalescencia de las gotas en la emulsión múltiple, se requiere la presencia de un surfactante efectivo soluble en agua o un polímero con actividad superficial, como el uso de proteínas o hidrocoloides (goma arábiga, goma de mezquite por ejemplo). El cambio en la distribución del tamaño de las gotas para la emulsión primaria y para la múltiple, es de igual importancia, se requiere adecuada estabilidad contra la coalescencia de las gotas acuosas internas haciéndolas más pequeñas que las gotas de emulsión múltiple, aunque también las gotas externas pueden ser pequeñas para reducir la inestabilidad con respecto a la floculación y cremado (Dickinson, 2003).

La estabilidad contra la coalescencia de las gotas de emulsión múltiple puede contrarrestarse con la adición de polímeros solubles en agua (hidrocoloides) en la fase continua ya que pueden actuar como agentes gelantes o espesantes retardando el movimiento Browniano de las gotas.

Para prevenir la expulsión de las gotas acuosas internas que han coalescido se requiere la presencia de un surfactante efectivo con alta solubilidad en aceite que se adsorba en la interfase interna W/O (alrededor de la superficie de las gotas acuosas internas). Las fuerzas termodinámicas por difusión de agua (u otras pequeñas moléculas hidrofílicas) que intervienen a través de la capa oleosa pueden ser atacadas teniendo un balance en la presión osmótica entre la fase

acuosa interna y externa. El transporte de masa se reduce con la elección adecuada del aceite debiendo ser poco soluble en agua.

Para mejorar la estabilidad por un lapso de tiempo se ha propuesto el uso de un agente polimérico gelante o espesante (goma xantana, alginato, gelatina) dentro de la fase acuosa interna en la emulsión primaria, específicamente si es adicionado para formar una red polimérica a través de las gotas internas de agua o una capa de gel en la interfase interna W/O (Dickinson, 1992).

Aún es difícil determinar la estabilidad relativa de emulsiones múltiples. Algunos mecanismos posibles por los que los materiales pueden ser transportados a través de la capa oleosa en sistemas $W_1/O/W_2$ son principalmente difusivos. La difusión molecular es controlada por un mecanismo de materia soluble en aceite, la difusión a través de la capa oleosa, puede controlarse mediante la disociación de materia ionizable. Los compuestos ionizables no son solo materiales que pueden ser transportados a través de la membrana oleosa. Se ha demostrado que el agua y la materia soluble en agua, pueden fácilmente migrar por la membrana oleosa sin afectar la estabilidad de emulsiones múltiples. También se ha demostrado que el transporte micelar se puede controlar a través de la membrana de aceite cambiando la naturaleza del aceite, o bien incrementando la viscosidad por la adición de moléculas acarreadoras (Garti, 1997 a).

Los emulsificantes monoméricos tienen algunas limitaciones en términos de estabilización de la emulsión. Los investigadores por consiguiente buscan nuevas estructuras mejoradas y sugieren el uso de sustancias macromoleculares naturales, tales como gomas, y proteínas. Las proteínas y los polisacáridos son biopolímeros que se usan como los ingredientes más importantes para la formación de emulsiones en alimentos, tienen la capacidad de modificar la apariencia, textura, estabilizan emulsiones, forman espumas, geles y mejoran la viscosidad de las soluciones (Garti, 1997 b).

acuosa interna y externa. El transporte de masa se reduce con la elección adecuada del aceite debiendo ser poco soluble en agua.

Para mejorar la estabilidad por un lapso de tiempo se ha propuesto el uso de un agente polimérico gelante o espesante (goma xantana, alginato, gelatina) dentro de la fase acuosa interna en la emulsión primaria, específicamente si es adicionado para formar una red polimérica a través de las gotas internas de agua o una capa de gel en la interfase interna W/O (Dickinson, 1992).

Aún es difícil determinar la estabilidad relativa de emulsiones múltiples. Algunos mecanismos posibles por los que los materiales pueden ser transportados a través de la capa oleosa en sistemas $W_1/O/W_2$ son principalmente difusivos. La difusión molecular es controlada por un mecanismo de materia soluble en aceite, la difusión a través de la capa oleosa, puede controlarse mediante la disociación de materia ionizable. Los compuestos ionizables no son solo materiales que pueden ser transportados a través de la membrana oleosa. Se ha demostrado que el agua y la materia soluble en agua, pueden fácilmente migrar por la membrana oleosa sin afectar la estabilidad de emulsiones múltiples. También se ha demostrado que el transporte micelar se puede controlar a través de la membrana de aceite cambiando la naturaleza del aceite, o bien incrementando la viscosidad por la adición de moléculas acarreadoras (Garti, 1997 a).

Los emulsificantes monoméricos tienen algunas limitaciones en términos de estabilización de la emulsión. Los investigadores por consiguiente buscan nuevas estructuras mejoradas y sugieren el uso de sustancias macromoleculares naturales, tales como gomas, y proteínas. Las proteínas y los polisacáridos son biopolímeros que se usan como los ingredientes más importantes para la formación de emulsiones en alimentos, tienen la capacidad de modificar la apariencia, textura, estabilizan emulsiones, forman espumas, geles y mejoran la viscosidad de las soluciones (Garti, 1997 b).

La adsorción de macromoléculas en la interfase es un proceso lento pero una vez adsorbidas se puede formar una capa interfacial, comprendida entre cabeza y cola que están bien ancladas en las fases acuosa y oleosa. El efecto estabilizador que provee la capa polimérica es conocido como “estabilización estérica”. La selección de un surfactante polimérico apropiado para la emulsión múltiple debe hacerse considerando que los segmentos hidrofílicos del polímero tengan una buena solubilidad en agua (Dickinson, 2001).

La masa molecular del polímero tiene un efecto significativo en términos del mezclado por lo que se sugiere el uso de polímeros con alto peso molecular pero de cadena corta. Con estas consideraciones la elección del emulsificante polimérico para la emulsión múltiple debe contar con las siguientes propiedades:

- Molécula anfifílica con flexibilidad significativa (proteína o hidrocoloides)
- Capacidad de adsorberse efectivamente en la fase dispersada y capacidad de proveer cobertura en la superficie
- Buena solubilidad en el medio de dispersión

1.4 Hidrocoloides

Los hidrocoloides son biopolímeros hidrofílicos de alto peso molecular usados como ingredientes funcionales en la industria de los alimentos para el control de microestructuras, textura, sabor y vida de anaquel. El término hidrocoloide abarca todos aquellos polisacáridos que son extraídos de plantas, algas y fuentes microbianas así como gomas derivadas de exudados de plantas y biopolímeros modificados por tratamiento químico o enzimático de almidón o celulosa (Dickinson, 2003).

Existen grandes diferencias en las propiedades funcionales de varios tipos de biopolímeros usados en la industria de los alimentos dependiendo de la

estructura química y la sensibilidad en las condiciones de solución (pH, fuerza iónica, iones específicos). La funcionalidad de los biopolímeros en alimentos es afectada por las interacciones con otros componentes como proteínas, polisacáridos, lípidos, azúcares, sales, etc.

Generalmente los hidrocoloides son usados como agentes estabilizantes en dispersiones alimenticias debido a la propiedad de gelificar y aumentar la viscosidad de la fase acuosa. Existen algunos hidrocoloides que presentan actividad superficial por lo cual pueden ser usados como agentes emulsificantes además de estabilizantes tal es el caso de la goma arábiga (*Acacia senegal* y *A. seyal*) y la goma de mezquite (*Prosopis juliflora*, *P. laevigata*).

La goma de mezquite es un polisacárido altamente ramificado con características de polielectrolito, es un efectivo estabilizante en emulsiones O/W debido a que tiene la capacidad de formar una película protectora alrededor de las gotas de aceite (Vernon-Carter y Sherman, 1980)

Estudios realizados por Vernon-Carter y col. (2000) muestran que la goma de mezquite tiene la capacidad de sustituir aceptablemente a la goma arábiga, además de que presenta la ventaja económica de que se obtiene de un árbol que crece en territorio nacional.

Los análisis químicos practicados a la goma de mezquite (*Prosopis juliflora*) indican que es una sal neutra de un polisacárido ácido altamente ramificado constituido principalmente por residuos de β -D-galactosa, L-arabinosa (formando anillos de piranosa y furanosa), L-ramnosa, β -D-glucuronato y ácido 4-O-metil- β -D-glucurónico. Como azúcar simple de cadenas de oligosacárido, la goma de mezquite contiene una pequeña fracción proteínica (0.7-5.8%) (Orozco y col, 2003) asociada covalentemente a la fracción de polisacárido, proporcionándole alta capacidad emulsificante (Vernon Carter y col. 2000).

La goma arábica es comúnmente reconocida como hidrocoloide emulsificante, es ampliamente usada en la industria de bebidas como emulsificante de sabores oleosos bajo condiciones ácidas. Tiene la capacidad de formar películas, el nivel de actividad superficial es bajo comparado con proteínas emulsificantes, pero se compensa porque brinda estabilidad ya que puede formar una red polimérica a través de las gotas internas de agua o una capa de gel en la interfase interna W/O retrasando el movimiento de las gotas de emulsión que es muy necesario en la práctica (Dickinson, 2003).

1.5 Microencapsulación

Durante los últimos 20 a 25 años la microencapsulación de pequeñas partículas envueltas de un material de pared protector, se ha establecido como una tecnología para aislar sustancias líquidas y sólidas durante un tiempo de almacenaje.

Las principales razones para el uso de microencapsulados son:

- Protección de los productos a encapsular del medio ambiente (temperatura, humedad, radiación UV, interacción con otros materiales)
- Protección al medio ambiente de productos tóxicos manejándolos como materiales más seguros para maniobrar
- Decremento en la evaporación de material encapsulado hacia el medio ambiente
- Conversión de líquidos a polvos más estables, mejorando el mezclado e impidiendo la formación de aglomerados
- Enmascaramiento de propiedades indeseables de componentes activos
- Control de la liberación del material a las condiciones deseadas

Los beneficios que dan a los microencapsulados la liberación controlada son aprovechados por la industria farmacéutica, de cosméticos y de alimentos.

Algunos métodos han sido propuestos para la producción de microencapsulados y pueden dividirse en tres grupos:

- Proceso fisicoquímico: coacervación simple o compleja (separación de fase acuosa), evaporación del solvente de la emulsión (separación de la fase orgánica), emulsión-solidificación, atrapamiento del liposoma
- Proceso químico: polimerización interfacial, inclusión molecular

- Proceso físico: secado por aspersión, extrusión, recubierta por aspersión

La elección del proceso de encapsulación para una aplicación específica está basada en parámetros tales como el tamaño promedio de partícula requerido, propiedades fisicoquímicas del material a encapsular y del material encapsulante, aplicaciones del material a microencapsular, mecanismos de liberación deseados, visualización de la escala de manufactura industrial y la aceptación de los costos del proceso.

Los microencapsulados tienen un tamaño entre 0.2 y 5000 μm en contraste con los macroencapsulados que son mayores a los 5000 μm . Diferentes términos se usan para describir el contenido interior de las microcápsulas, incluyendo centro, material central, ingrediente, sustrato, agente activo, material a encapsular. El material de pared también es llamado acarreador, material encapsulante y puede ser seleccionado de una amplia variedad de polímeros sintéticos y naturales, dependiendo del agente activo que va ser cubierto y de las características finales deseadas para los microencapsulados.

La liberación depende de las posibles interacciones entre el material de pared y el material a encapsular, las características de la pared de los microencapsulados tales como la estructura química, el espesor, el tamaño de poro e integridad superficial, ya que juegan un papel determinante en la difusión del material a encapsular.

Numerosos materiales son usados como agentes encapsulantes principalmente:

- Carbohidratos (almidones, maltodextrinas, ciclodextrinas, sólidos de jarabe de maíz)
- Éteres y ésteres de celulosa (carboximetilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa)

- Gomas (goma arábica, agar, alginato de sodio)
- Lípidos (parafinas, grasas, aceites, ceras)
- Proteínas (gelatina, proteína de soya)

Para el método de microencapsulación por secado por aspersión, el cambio en el agente encapsulante es crítico ya que el material puede influir en la estabilidad de la emulsión, estabilidad mecánica y la vida de anaquel después del secado. Los materiales de pared deben ser: altamente solubles, tener buena capacidad emulsificante y espumante, ser eficientes durante el secado y tener baja viscosidad a altas concentraciones.

Los materiales que funcionan como mejores agentes encapsulantes en el secado por aspersión son gomas (Acacia) y los almidones hidrolizados y modificados.

Una proporción típica entre el material de pared y el material encapsulado es 4:1 ésta proporción ha sido reportada como óptima para materiales de pared como goma arábica y otros carbohidratos derivados (Ré, 1998).

1.6 Importancia de los carotenoides

En particular los carotenoides se consideran como aditivos funcionales, se les asocia una capacidad antioxidante que inhibe la formación de radicales libres producidos por el metabolismo aeróbico normal dañinos al DNA, proteínas, lípidos y carbohidratos (Hendry y Houghton 1996); como precursores del retinol y retinoides (Stahl y col., 1994); y se les relaciona inversamente con el riesgo de contraer cáncer. Así pues es de suma importancia el estabilizar estos colorantes contra los efectos ambientales adversos para hacerlos accesibles económicamente y para que desarrollen su funcionalidad potencial.

Los carotenoides presentan una estructura química básica poliénica de 40 átomos de carbono, formada por ocho unidades de isopreno (Figura 4), cuyo arreglo se hace inverso en el centro, y pueden ser de cadena lineal o tener ciclizaciones en los extremos. El nombre genérico deriva de la zanahoria (*Daucus carota*), ya que fue de ella de donde se aisló por primera vez (Forman, 1997).

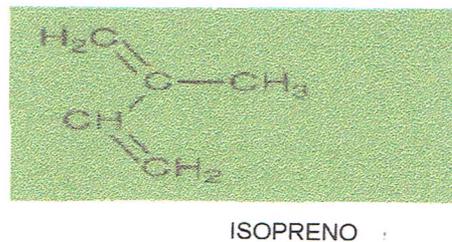


Figura 4. Unidad de Isopreno.

Las oleoresinas de la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) y chile ancho, guajillo, pasilla (*Capsicum annum*) se encuentran como carotenoides esterificados con ácidos grasos y por ende son liposolubles. En ambas oleoresinas estos carotenoides se encuentran oxigenados y se les conoce como xantofilas. Ambos productos están caracterizados por contener un amplio rango de xantofilas, siendo la luteína la que predomina en la flor de cempasúchil y que tiene un color

característico amarillo, y la capsantina que predomina en los chiles teniendo un color característico naranja rojo (Figura 5)

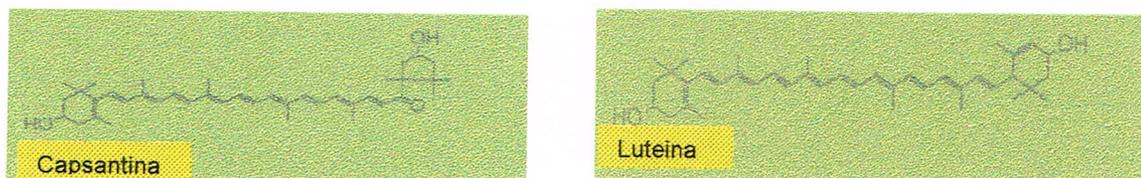


Figura 5. Carotenoides del Chile Rojo y de la Flor de Cempasúchil.

Estas oleoresinas se pueden saponificar para desesterificar a las xantofilas de los ácidos grasos y hacerlas hidrosolubles. Las xantofilas y los carotenoides en general se degradan con altas temperaturas, oxígeno, luz y metales pesados debido principalmente al mecanismo de autooxidación (Forman, 1997).

2 JUSTIFICACIÓN

Las aplicaciones potenciales de las emulsiones múltiples son mayores cada día, particularmente en la industria de los alimentos, farmacéutica y cosmética, principalmente como vehículos de liberación prolongada.

Las emulsiones múltiples ofrecen ventajas para su aplicación en la industria de los alimentos debido a su capacidad para encapsular sustancias solubles en agua que pueden ser lentamente liberadas.

A pesar de sus aplicaciones, las emulsiones múltiples se ven limitadas debido a su inestabilidad termodinámica y a la complejidad de sus estructuras. Se han identificado diversos factores que afectan la estabilidad de las emulsiones múltiples, desde su método de preparación, la naturaleza de los materiales encapsulados, el volumen de las fases, concentración y tipo de agentes emulsificantes y aún hace falta conocer acerca de sus propiedades funcionales y de estabilidad.

Por lo anteriormente expuesto, se pretende estudiar la estabilidad de emulsiones múltiples $W_1/O/W_2$ utilizando goma de mezquite como agente emulsificante secundario en la fase acuosa externa, solo o en combinación con otros biopolímeros. Se busca darle un valor agregado a esta goma, con la finalidad de contribuir al desarrollo regional de las zonas áridas de nuestro país donde crece el árbol que la produce. Además se pretende incorporar a las xantofilas lipo e hidrodispersables de la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) y chile rojo (*Capsicum annuum*) para lograr una mayor gama de tonalidades que permitan competir contra la diversidad de colorantes artificiales existentes en el mercado ya que se estima que el 80% de los colorantes artificiales utilizados en el mercado abarcan tonalidades que van del amarillo al rojo

3 OBJETIVOS

Objetivo General

- Formular y desarrollar una emulsión múltiple del tipo $W_1/O/W_2$ que sea estable a través del tiempo y que permita la encapsulación de carotenoides naturales hidro y lipo dispersables.

Objetivos Particulares

- Establecer las relaciones de fase dispersa / fase continua de la emulsión interna, y de ésta con la fase acuosa externa que permitan obtener una emulsión múltiple estable.
- Establecer la naturaleza, concentración y mezcla de los agentes emulsificantes para obtener una emulsión múltiple estable.
- Establecer la concentración de goma gelana en la fase acuosa interna para obtener una emulsión múltiple estable.
- Establecer la relación de colorantes lipo e hidrodispersables dentro de una emulsión múltiple estable, para obtener una tonalidad en particular del abanico colorimétrico usado en la industria para la pigmentación de la yema de huevo.
- Estudiar los cambios morfológicos de la emulsión múltiple por análisis de imágenes.
- Determinar las cinéticas de coalescencia de las emulsiones interna y múltiple como criterio de estabilidad.

4 HIPÓTESIS

La selección adecuada de la mezcla de agentes emulsificantes, lipofílico e hidrofílico, induce la formación de un complejo interfacial en la interfase interna agua-aceite que evita la difusión de agua y de los agentes emulsificantes hacia la fase acuosa externa, favoreciendo la estabilidad de la emulsión múltiple.

La selección adecuada del tipo de biopolímeros y su concentración, brinda mayor estabilidad a la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ proveyéndola de un potencial de repulsión estérico que retarda su floculación, y propiedades mecánicas y estructurales que actúan como barrera contra la coalescencia de las gotas y difusión de agentes promotores de la oxidación de los colorantes.

5 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

5.1 Materiales y Equipo

Material

- Goma de mezquite (*Prosopis laevigata*) fue recolectada a mano en forma de lágrimas en el Estado de San Luis Potosí, se purificó como lo indica Vernon-Carter y col., (1996).
- Panodán SDK (Ésteres de mono y diglicéridos de ácido diacetil tartárico), Danisco Cultor, México.
- Grinsted PGPR (Ésteres de poliglicerol de poliricinoleato), Danisco Cultor, México.
- Carotenoides esterificados de la flor de cempasuchil (MEC), Bioquimex Reka, México.
- Carotenoides esterificados del chile rojo, (REC), Bioquimex Reka México.
- Carotenoides saponificados de la flor de cempasuchil (MUC), Bioquimex Reka, México.
- Carotenoides saponificados del chile rojo (RUC), Bioquimex Reka, México.
- Suero de Leche, Ingredientes Funcionales de México.
- Aceite vegetal comestible (Cristal), Aceites, Grasas y Derivados S.A., México.

Equipo

- Sistema analizador de imágenes:
 - o Microscopio óptico Olympus BX 45, Olympus optical CO Ltd, Japón
 - o Cámara digital Olympus C-3030, Olympus optical CO Ltd, Japón
 - o Software Image-pro plus versión 4.5, Media Cybernetics, Inc
- Abanico colorimétrico para la pigmentación de yema de huevo, Roche, Suecia.

- Homogenizador Silverson L4R, Silverson Machines Ltd, Inglaterra
- Analizador de partículas Malvern serie 2600, Malvern Instruments Limited

5.2 Formulación de las emulsiones múltiples $W_1/O/W_2$

Para la selección de los agentes emulsificantes que brinden una mayor estabilidad a la emulsión interna y externa, se llevó a cabo un análisis morfológico midiendo como variables de respuesta los diámetros medios de las emulsiones formadas, los cuales pueden definirse mediante las siguientes expresiones:

$$D_{3,2} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad \text{Diámetro medio volumétrico-superficial} \quad (1)$$

$$D_{4,3} = \sqrt[3]{\frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i}} \quad \text{Diámetro medio volumétrico} \quad (2)$$

donde n_i es la gota i , y d_i es el diámetro de la gota i . Estos diámetros fueron obtenidos a partir del uso del Analizador de Imágenes y/o el analizador de tamaño y distribución de partícula Malvern serie 2600 (Ver apéndice A).

La metodología usada fue la siguiente:

5.2.1 Selección de la concentración del agente emulsificante lipofílico en la emulsión primaria W_1/O , se formularon emulsiones W_1/O (200g) con concentraciones del 1, 3, 5, 8 y 10 % en peso del agente emulsificante lipofílico (Grinsted PGPR). Las emulsiones W_1/O se elaboraron añadiendo gota a gota la fase acuosa en la fase oleosa (conteniendo las diferentes concentraciones de agente emulsificante lipofílico), y fueron

emulsificadas con un homogeneizador Silverson L4R a una velocidad de 5800 rpm durante 5 minutos, manteniéndose la temperatura a 30°C.

De las emulsiones formadas, se tomó 1 mL y se diluyó en 10 mL de agua, si la emulsión se diluye entonces es del tipo aceite en agua (O/W), se tomó otra muestra de 1 mL de emulsión W_1/O y se diluyó en 10 mL de aceite, si la emulsión se diluye entonces es del tipo agua en aceite (W/O), una vez comprobado que las emulsiones son W_1/O se observaron al microscopio y por medio del analizador de imágenes se determinó el diámetro de 90 unidades experimentales por triplicado para el cálculo del diámetro medio volumétrico $D_{4,3}$ por medio de la ecuación (2), que se tomó como criterio para evaluar la concentración de agente emulsificante lipofílico que formó una emulsión con un tamaño de partícula lo más pequeño posible (Garti, 1997 b). Por medio de un análisis de comparación de medias se eligió la concentración de agente emulsificante lipofílico que proporcionó el menor tamaño de partícula.

5.2.2 Determinación de la relación de la mezcla de agentes emulsificantes lipofílico-hidrofílico. Con base en la concentración de emulsificante lipofílico establecida en el punto 5.2.1, se formularon emulsiones W_1/O (200g) variando la relación de agentes emulsificantes lipofílico (Grinsted PGPR) e hidrofílico (Panodán SDK), en 90:10, 80:20, 60:40, 40:60 respectivamente (Garti, 1997 b). Las emulsiones W_1/O se elaboraron añadiendo gota a gota la fase acuosa (conteniendo el agente emulsificante hidrofílico en las diferentes relaciones) a la fase oleosa (conteniendo el agente emulsificante lipofílico en las diferentes relaciones), fueron emulsificadas con un homogeneizador Silverson L4R a una velocidad de 5800 rpm durante 5 minutos, manteniéndose la temperatura a 30°C.

De las emulsiones formadas, se tomó 1 mL y se diluyó en 10 mL de agua, si la emulsión se diluye entonces es del tipo aceite en agua (O/W), se tomó otra muestra de 1 mL de emulsión W_1/O y se diluyó en 10 mL de aceite, si la emulsión se diluye entonces es del tipo agua en aceite (W/O), una vez comprobado que las emulsiones son W_1/O se observaron al microscopio y por medio del analizador de imágenes se determinó el diámetro de 70 unidades experimentales por triplicado para el cálculo del diámetro medio volumétrico $D_{4,3}$ por medio de la ecuación (2), se analizó el efecto del tiempo (72h) sobre $D_{4,3}$ para elegir que relación de agentes emulsificantes lipofílico-hidrofílico proporcionó la mejor estabilidad a la emulsión W_1/O .

5.2.3 Estudio morfológico de las emulsiones W_1/O variando el contenido de fracción de fase dispersa (\emptyset). Utilizando la relación y concentración de la mezcla de agentes emulsificantes determinados en los puntos 5.2.1 y 5.2.2, se elaboraron emulsiones W_1/O (200g) variando la fracción de fase dispersa desde 0.1 hasta 0.5. Las emulsiones W_1/O se elaboraron añadiendo gota a gota la fase acuosa (conteniendo el agente emulsificante hidrofílico) a la fase oleosa (conteniendo el agente emulsificante lipofílico), fueron emulsificadas con un homogeneizador Silverson L4R a una velocidad de 5800 rpm durante 5 minutos, manteniéndose la temperatura a 30°C.

De las emulsiones formadas, se tomó 1 mL y se diluyó en 10 mL de agua, si la emulsión se diluye entonces es del tipo aceite en agua (O/W), se tomó otra muestra de 1 mL de emulsión W_1/O y se diluyó en 10 mL de aceite, si la emulsión se diluye entonces es del tipo agua en aceite (W/O), una vez comprobado que las emulsiones son W_1/O se observaron al microscopio y por medio del analizador de imágenes se determinó el diámetro de 70 unidades experimentales por triplicado

para el cálculo del diámetro medio volumétrico $D_{4,3}$ por medio de la ecuación (2), se analizó el efecto del tiempo (72h) sobre $D_{4,3}$ para elegir que fracción de fase dispersa proporcionó la mejor estabilidad a la emulsión W_1/O . (Dickinson y McClements, 1996)

Una vez analizados los parámetros que componen a la emulsión interna W_1/O se procedió a analizar el comportamiento de la fase externa de la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$.

Para determinar las condiciones de la fase externa de la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ se formularon emulsiones O/W_2 donde se supuso que la fase oleosa se comportaba semejante a la emulsión interna W_1/O esto con el fin de ahorrar materia prima en la formación de la emulsión interna W_1/O

5.2.4 Selección de la concentración de biopolímeros: goma de mezquite (GM) y suero de leche (SL) se formularon emulsiones O/W_2 (200g) con concentraciones de goma de mezquite de (1.0%, 3.0%, 5.0%, 8.5%, 10.5%, 25% p/p) y emulsiones O/W_2 con concentraciones de suero leche de (1.0%, 3.0%, 8.5%, 10.5%, 25% p/p). Las emulsiones O/W_2 se elaboraron añadiendo gota a gota la fase oleosa a la fase acuosa (conteniendo las diferentes concentraciones biopolímeros), fueron emulsificadas con un homogeneizador Silverson L4R a una velocidad de 5000 rpm durante 3 minutos, manteniéndose la temperatura a 30°C. De las emulsiones formadas, se tomó 1 mL y se diluyó en 10 mL de agua, si la emulsión se diluye entonces es del tipo aceite en agua (O/W), se tomó otra muestra de 1 mL de emulsión O/W_2 y se diluyó en 10 mL de aceite, si la emulsión se diluye entonces es del tipo agua en aceite (W/O), una vez comprobado que las emulsiones son O/W_2 se

observaron al microscopio y por medio del Analizador de partículas Malvern serie 2600 se determinó diámetro medio volumétrico $D_{4,3}$ por triplicado, el cual se tomó como parámetro para estudiar el efecto que tiene la concentración de biopolímero a través del tiempo sobre diámetro medio volumétrico $D_{4,3}$ (Ré, 1998, Dickinson, 2003).

5.2.5 Determinación de la mezcla de biopolímeros goma de mezquite-suero de leche. con la concentración de biopolímeros obtenida en el punto 5.2.4 se formularon emulsiones O/W_2 (200g) variando la mezcla de biopolímeros goma de mezquite-suero de leche desde 100, 80:20, 60:40, 50:50, 40:60, 20:80, 100 respectivamente. Las emulsiones O/W_2 se elaboraron añadiendo gota a gota la fase oleosa a la fase acuosa (conteniendo las diferentes concentraciones biopolímeros), fueron emulsificadas con un homogeneizador Silverson L4R a una velocidad de 5000 rpm durante 3 minutos, manteniéndose la temperatura a 30°C. De las emulsiones formadas, se tomó 1 mL y se diluyó en 10 mL de agua, si la emulsión se diluye entonces es del tipo aceite en agua (O/W), se tomó otra muestra de 1 mL de emulsión O/W_2 y se diluyó en 10 mL de aceite, si la emulsión se diluye entonces es del tipo agua en aceite (W/O), una vez comprobado que las emulsiones son O/W_2 se observaron al microscopio y por medio del Analizador de partículas Malvern serie 2600 se determinó diámetro medio volumétrico $D_{4,3}$ por triplicado el cual se tomó como parámetro para estudiar su comportamiento a través del tiempo a las diferentes mezclas de biopolímeros.

5.2.6 Selección del tiempo de agitación de la emulsión externa O/W_2 . Se realizaron emulsiones O/W_2 (200g) utilizando la mezcla de biopolímeros establecida en el punto 5.2.5. Las emulsiones O/W_2 se elaboraron

añadiendo gota a gota la fase oleosa a la fase acuosa (conteniendo las diferentes concentraciones biopolímeros), fueron emulsificadas con un homogeneizador Silverson L4R a una velocidad de 5000 rpm, se varió el tiempo de agitación de 1 a 5 min, manteniéndose la temperatura a 30°C. De las emulsiones formadas, se tomó 1 mL y se diluyó en 10 mL de agua, si la emulsión se diluye entonces es del tipo aceite en agua (O/W), se tomó otra muestra de 1 mL de emulsión O/W₂ y se diluyó en 10 mL de aceite, si la emulsión se diluye entonces es del tipo agua en aceite (W/O), una vez comprobado que las emulsiones son O/W₂ se observaron al microscopio y por medio del Analizador de partículas Malvern serie 2600 se determinó diámetro medio volumétrico D_{4,3} por triplicado, observándose los cambios en D_{4,3} a través del tiempo.

5.2.7 Selección de la concentración de goma gelana en la fase acuosa interna. Con los datos obtenidos en los puntos anteriores se formularon emulsiones múltiples (200g), variando la concentración de goma gelana (0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1% p/p). Las emulsiones se elaboraron por el método de dos etapas, en la primera etapa se formó la emulsión interna W₁/O añadiendo gota a gota la fase acuosa (conteniendo las diferentes concentraciones de goma gelana) a la fase oleosa, fueron emulsificadas con un homogeneizador Silverson L4R a una velocidad de 5800 rpm, durante 5 min, manteniéndose la temperatura a 30°C, de las emulsiones formadas, se tomó 1 mL y se diluyó en 10 mL de agua, si la emulsión se diluye entonces es del tipo aceite en agua (O/W), se tomó otra muestra de 1 mL de emulsión W₁/O y se diluyó en 10 mL de aceite, si la emulsión se diluye entonces es del tipo agua en aceite (W/O), una vez comprobado que las emulsiones son W₁/O se adicionan gota a gota a la fase acuosa externa para formar la emulsión múltiple W₁/O/W₂ y se emulsificaron en un homogeneizador

Silverson L4R a una velocidad de 5000 rpm durante 4 min, se observaron al microscopio para distinguir la morfología de una emulsión múltiple y por medio del analizador de imágenes se determinó el diámetro de 70 unidades experimentales por triplicado de emulsión múltiple para el cálculo del diámetro medio volumétrico $D_{4,3}$ por medio de la ecuación (2) para evaluar su efecto a través del tiempo en la emulsión interna.

5.2.8 Selección de los colorantes lipo e hidrodispersables. Se realizaron 11 mezclas de los colorantes hidrodispersables (carotenoides saponificados de la flor de cempasuchil "MUC", carotenoides saponificados del chile rojo "RUC") y los colorantes lipodispersables (carotenoides esterificados de la flor de cempasuchil "MEC", carotenoides esterificados del chile rojo "REC") para obtener tonalidades específicas del abanico colorimétrico de pigmentación de yema de huevo (Roche) con una concentración total de carotenoides del 5%.

Tabla 1. Mezclas de los colorantes naturales.

Colorantes	MUC	RUC	MEC	REC
Mezcla				
1	✓	✓	✓	✓
2	✓	✓	✓	
3		✓	✓	✓
4	✓	✓		✓
5	✓		✓	✓
6		✓		✓
7	✓		✓	
8	✓	✓		
9		✓	✓	
10			✓	✓
11	✓			✓

5.2.9 Estabilidad de la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ a través del tiempo conteniendo colorantes lipo e hidrodispersables. Integrando los datos obtenidos desde el punto 5.2.1 hasta el punto 5.2.8 se formularon emulsiones múltiples $W_1/O/W_2$ (200g). Las emulsiones se elaboraron por el método de dos etapas, en la primera etapa se formó la emulsión interna W_1/O añadiendo gota a gota la fase acuosa a la fase oleosa, fueron emulsificadas con un homogeneizador Silverson L4R a una velocidad de 5800 rpm, durante 5 min, manteniéndose la temperatura a 30°C, para comprobar que las emulsiones son W_1/O se tomó 1 mL y se diluyó en 10 mL de agua, si la emulsión se diluye entonces es del tipo aceite en agua (O/W), se tomó otra muestra de 1 mL de emulsión W_1/O y se diluyó en 10 mL de aceite, si la emulsión se diluye entonces es del tipo agua en aceite (W/O), una vez que se comprobó que las emulsiones son W_1/O , se adicionan gota a gota a la fase acuosa externa para formar la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ y se emulsificaron en un homogeneizador Silverson L4R a una velocidad de 5000 rpm durante 4 min, se observaron al microscopio comprobando por la morfología la formación de una emulsión múltiple.

Se tomó 1 mL de emulsión múltiple y se diluyó en 10 mL de agua, si la emulsión se diluye entonces es del tipo $W/O/W$, se tomó 1 mL de emulsión múltiple y se diluyó en 10 mL de aceite, si la emulsión se diluye entonces es del tipo $O_1/W/O_2$ una vez comprobado el tipo de emulsión múltiple y por medio del analizador de imágenes se determinó el diámetro de 70 unidades experimentales por triplicado de emulsión múltiple, para el cálculo del diámetro medio volumétrico $D_{4,3}$ por medio de la ecuación (2) y el cálculo del diámetro medio volumétrico superficial $D_{3,2}$, por medio de la ecuación (3) observándose su comportamiento a través del tiempo (192h). Además se calculó la cinética de coalescencia

de la emulsión interna y de la emulsión externa por medio de la siguientes ecuaciones:

$$N_t = N_o \exp^{-Ct} \quad (3)$$

$$N_t = 6\phi * 10^{12} / \pi D_{3,2}^3 t \quad (4)$$

$$\ln(N_t) = \ln(N_o) - Ct \quad (5)$$

Donde N_o = número de glóbulos por unidad de volumen

N_t = número de glóbulos por unidad de volumen después de un tiempo t

ϕ = fracción volumétrica de la emulsión

D = diámetro medio volumétrico superficial

Estos criterios fueron tomados como parámetros de estabilidad. (Sherman, 1968)

5.2.10 Rendimiento de las emulsiones múltiples $W_1/O/W_2$. Con el objetivo de analizar si se obtienen emulsiones múltiples de alto rendimiento se analizó la relación $D_{3,2}/D_{4,3}$, suponiendo que si esta relación tiende a cero, la emulsión obtenida es de alto rendimiento y si esta relación se mantiene constante durante el tiempo, la emulsión es estable, ya que indica que el área superficial de las gotas internas en relación al tamaño volumétrico de las gotas externas, se mantiene constante a través del tiempo, de lo contrario, la emulsión es inestable.

6 RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Emulsión Interna W_1/O

6.1.1 Selección de la concentración del agente emulsificante lipofílico en la emulsión interna W_1/O .

Los agentes emulsificantes juegan un papel importante para la prevención de los fenómenos de desestabilización de las emulsiones (floculación y coalescencia) debido a que se adsorben en la interfase agua-aceite promoviendo la rápida formación y estabilización de las gotas de emulsión por acción interfacial que previene la agregación con gotas vecinas. Se ha encontrado que los agentes emulsificantes pueden migrar de una interfase a otra alterando la organización interfacial; una combinación de agentes emulsificantes en la fase interna así como en la fase externa tienen un efecto benéfico en la estabilidad de la emulsión, además se ha encontrado que la proporción de los agentes emulsificantes lipofílicos a hidrofílicos debe estar en el orden de 2 a 20 para obtener el mejor rendimiento (Garti, 1997a).

La adecuada concentración de agente emulsificante lipofílico para la formación de la emulsión interna W_1/O es un factor de considerable importancia ya que influye en el tamaño de partícula que es determinante para la estabilidad y textura de la emulsión interna y múltiple. La estabilidad de la emulsión se atribuye a la formación de una capa alrededor de las gotas.

En la preparación de emulsiones múltiples por el método de dos etapas; en la primera etapa de emulsificación, la emulsión W_1/O debe contener gran cantidad de agente emulsificante lipofílico (5-30% p/p de la emulsión interna) y se debe aplicar una fuerte homogeneización para formar las gotas lo más pequeñas posibles entre 0.5 y 2 μm (Garti, 1997b). Con esto en mente en este trabajo el diámetro volumétrico promedio de partícula ($D_{4,3}$) fue tomado como criterio para

evaluar la concentración de agente emulsificante lipofílico más adecuada para formar una emulsión con un tamaño de partícula lo más pequeño posible para obtener un alto rendimiento durante la formación de la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$.

En la Figura 6 se muestra el comportamiento del diámetro volumétrico promedio de partícula ($D_{4,3}$) de las emulsiones hechas con las cinco diferentes concentraciones de agente emulsificante lipofílico Grinsted PGPR (1%, 3%, 5%, 8% y 10% p/p) observándose que todas las emulsiones obtenidas tienen un tamaño de partícula menor al reportado en la literatura para obtener un alto rendimiento en la formación de emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ (Anexo B, tabla B1).

Conforme la concentración de agente emulsificante lipofílico aumentó, el tamaño en el diámetro medio volumétrico $D_{4,3}$ disminuyó, obteniéndose gran cantidad de gotas de emulsión interna perfectamente distinguibles bajo el microscopio con un $D_{4,3}$ entre 0.0799 y 0.2049 μm . Sin embargo, hay que considerar que bajas concentraciones de agente emulsificante lipofílico pueden provocar la migración de la fase acuosa interna hacia la fase acuosa externa de la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$, provocando la desestabilización de la emulsión interna W_1/O y por consecuencia la desestabilización de la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$. Se observó que el tamaño más pequeño se obtuvo para la concentración de agente emulsificante lipofílico de 10%.

Un análisis de comparación de medias (Tabla 2) donde se muestra el $D_{4,3}$ a las diferentes concentraciones de agentes emulsificantes indicó que no hay diferencia significativa en $D_{4,3}$ conforme se incrementó la concentración de agente emulsificante lipofílico de 8% a 10% p/p, por lo que considerando costo-beneficio de la materia prima la concentración de agente emulsificante lipofílico de 8% se seleccionó para formar la emulsión interna W_1/O teniéndose un $D_{4,3}$ a esta concentración de alrededor de 0.1 μm .

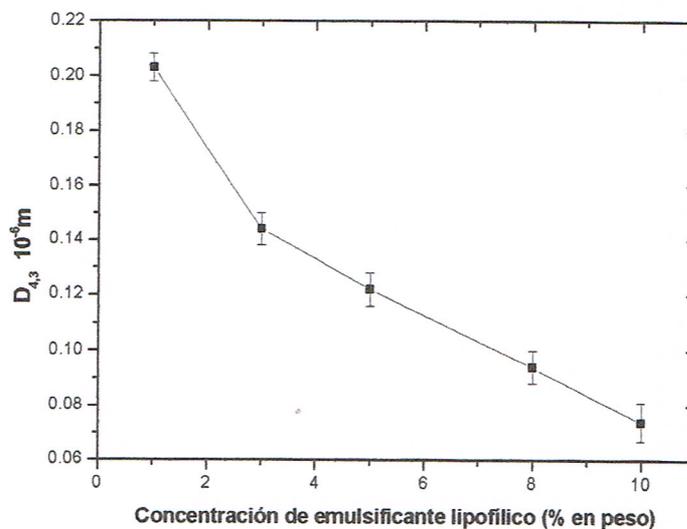


Figura 6 Comportamiento del diámetro medio volumétrico de la emulsión interna W_1/O a diferentes concentraciones de emulsificante lipofílico

Tabla 2. Comparación de tamaño medio de partícula en la emulsión W_1/O a diferente concentración de emulsificante.

Concentración de emulsificante lipofílico	N	$D_{4,3}$		
(10% peso)	90	.079 ^a		
		.006		
(8% peso)	90	.089 ^a		
		.006		
(5% peso)	90		.119 ^b	
			.006	
(3% peso)	90			.137 ^b
				.006
(1% peso)	90			.204 ^b
				.006

Las medias con letras distintas difieren significativamente de las demás
 $P \leq 0.05$

6.1.2 Determinación de la relación de la mezcla de agentes emulsificantes hidrofílico-lipofílico (Panodán SDK – Grinsted PGPR)

El uso de mezclas de dos diferentes tipos de agentes emulsificantes (hidrofílico-lipofílico) pueden ser usados el hidrofílico para estabilizar la emulsión

emulsificantes que forman películas viscoelásticas alrededor de las gotas son mejores protectores de la emulsión ya que retardan la inversión de fases y la coalescencia de las gotas (McClements, 1999). Además una mezcla de agentes emulsificantes hidrofílico-lipofílico puede interactuar en la interfase interna agua-aceite formándose una película interfacial fuerte que retarda el transporte de moléculas de emulsificante desde la interfase interna hacia la interfase externa dando como resultado una emulsión múltiple más estable. En este trabajo fue encontrado que los emulsificantes Panodán SDK (naturaleza hidrofílica) y Grinsted PGPR (naturaleza lipofílica) interactúan en la interfase agua-aceite formando una capa alrededor de las gotas, disminuyendo la tensión interfacial facilitando y proveyendo al sistema de una barrera protectora que mejora la estabilidad estérica y mecánica, estabilizando la emulsión al protegerla contra la coalescencia y contra la migración de la fase acuosa interna hacia el exterior, dando estabilidad a la emulsión, esto se ve reflejado en el comportamiento del diámetro a través del tiempo.

En la Figura 7 se muestra el comportamiento del diámetro medio volumétrico $D_{4,3}$ de la emulsión interna a diferentes mezclas de agentes emulsificantes hidrofílico-lipofílico a través del tiempo, todas las emulsiones obtenidas tuvieron un tamaño medio volumétrico de partícula $D_{4,3}$ (Anexo B, Tabla B2) menor comparado con otros trabajos (Garti, 1997a) y al obtenido con emulsiones elaboradas con un solo emulsificante debido a que la interacción de los emulsificantes hidrofílico y lipofílico pueden formar estructuras que minimicen el área de contacto entre las cabezas no polares y las colas polares que los componen, además de que su adsorción durante el proceso de homogeneización determinó el mínimo tamaño de las gotas. Observándose que, conforme disminuía el emulsificante hidrofílico en la mezcla de agentes emulsificantes, la emulsión presentó menor cambio en el $D_{4,3}$ a través de las 72 horas de observación,

Se ha demostrado que el emulsificante hidrofílico tiene un efecto negativo en el flujo de moléculas de agua de la fase interna hacia la fase externa (Garti, 1997b) que se ve reflejado en el cambio en $D_{4,3}$ a través del tiempo de la emulsión formulada con 60:40 Panodan SDK-Grinsted PGPR.

Las emulsiones que muestran un menor cambio en el $D_{4,3}$ a través del tiempo se obtienen con una mezcla de agentes emulsificantes de 20:80 y 10:90 Panodan SDK-Grinsted PGPR teniendo un tamaño de partícula entre 0.082 y 0.097 μm , sin embargo concentraciones bajas de agente emulsificante hidrofílico puede llevar a la inversión de fases al formar la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ a una emulsión O/W (Garti, 1997a), con esto en mente la mejor mezcla de agentes emulsificantes se consideró la de 20:80 Panodan SDK-Grinsted PGPR.

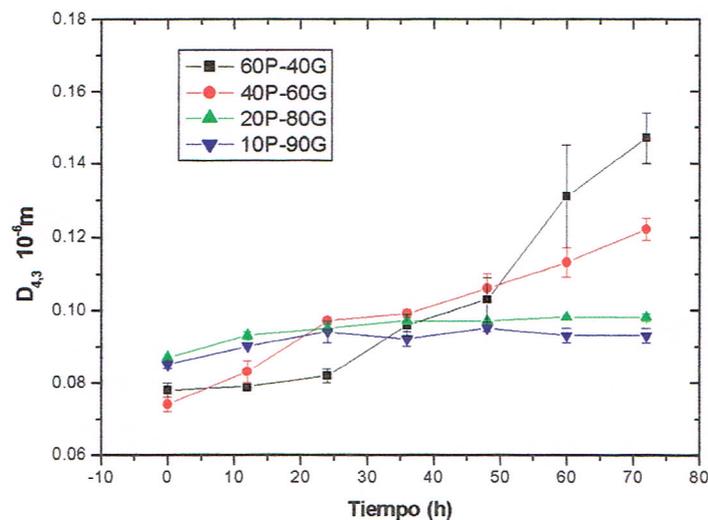


Figura 7. Comportamiento del diámetro medio volumétrico en la emulsión interna W_1/O a través del tiempo usando mezclas de agentes emulsificantes

6.1.3 Selección de la fracción volumétrica de fase dispersa (ϕ)

La fracción volumétrica de fase dispersa (ϕ) es un factor importante que afecta la estabilidad y el rendimiento de las emulsiones y sus propiedades funcionales como apariencia, textura, estabilidad y costo. En términos generales una mayor concentración de fase dispersa requiere de mayor concentración de agente emulsificante y da una mayor viscosidad a la emulsión W_1/O . Esta situación no favorece a la estabilidad de la emulsión $W_1/O/W_2$, ya que una mayor concentración de agente emulsificante, aumenta la probabilidad de que las moléculas de éste migren a la interfase externa desestabilizando la emulsión $W_1/O/W_2$. Una mayor viscosidad de la emulsión W_1/O requiere de una mayor energía durante la segunda etapa de emulsificación para lograr una distribución homogénea de la emulsión W_1/O , pero esto a la vez tiende a disminuir el tamaño de gota de la emulsión $W_1/O/W_2$, desestabilizando el sistema (McClements, 1999).

Considerando lo antes expuesto, se llevó a cabo la formación de emulsiones W_1/O con fracciones volumétricas entre 0.1 y 0.5 observándose el comportamiento del diámetro medio volumétrico $D_{4,3}$ a través del tiempo (ver Figura 8). Como se puede apreciar a medida que se incrementó la fracción volumétrica de fase dispersa el diámetro medio volumétrico $D_{4,3}$ aumentó, esto se atribuyó a que al aumentar la fase dispersa es necesario el uso de mayor cantidad de agentes emulsificantes lo que implica que a las mismas condiciones de emulsificación (5800 rpm durante 5 min) la adsorción de los emulsificantes sea menor dando como resultado un mayor tamaño de gota, además de que las concentraciones altas de emulsificantes favorecen la migración de éstas moléculas hacia la interfase externa que provoca la desestabilización del sistema.

Aunque todos los diámetros se encuentran por debajo del tamaño de gota reportado para obtener emulsiones múltiples estables de alto rendimiento (Anexo B, tabla B3), se tomó como parámetro discriminatorio seleccionar una fracción

volumétrica de fase dispersa ϕ durante la cual la emulsión tuviera el tamaño de partícula más pequeño además de mantenerse estable a través del tiempo de observación (72h).

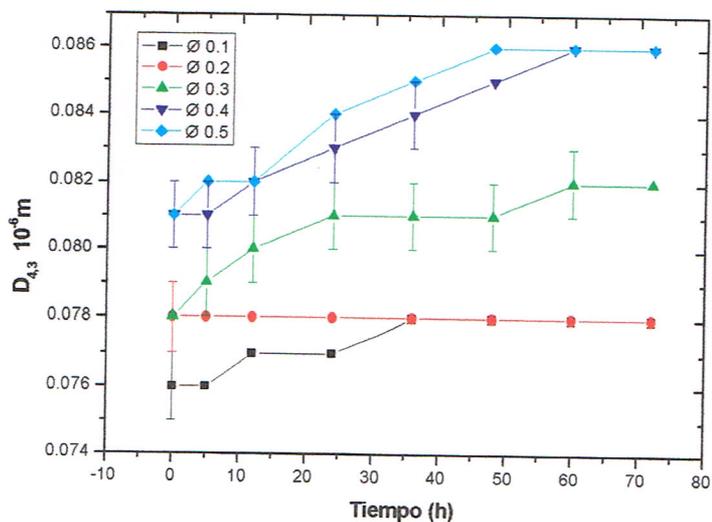


Figura 8. Comportamiento del diámetro medio volumétrico de la emulsión interna W_1/O a través del tiempo a diferentes fracciones volumétricas de fase dispersa (ϕ)

6.2 Determinación de las condiciones de la fase externa de la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ por medio del comportamiento de emulsiones O/W_2

6.2.1 Selección de la concentración de biopolímeros goma de mezquite (GM) y suero de leche (SL)

Macromoléculas, tales como gomas y proteínas han sido utilizadas en los últimos años para brindar estabilidad adicional a las emulsiones múltiples (Garti y Aserin, 1996, McClements, 1999, Dickinson, 1992); las macromoléculas se adsorben en la interfase en un lento proceso pero una vez adsorbidas forman una capa interfacial conformada por lazos y colas bien ancladas dentro de las fases oleosa y acuosa, lo que provee de una fuerza repulsiva a las gotas de aceite que se acercan entre sí por el movimiento Browniano. El efecto estabilizante que la capa polimérica adsorbida provee, se conoce como estabilización estérica (Garti, 1997b).

El diámetro medio volumétrico $D_{4,3}$ puede ser considerado como un criterio para seleccionar la concentración más adecuada de biopolímeros para obtener una emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ estable. Para lo cual es necesario que el tamaño de partícula de la emulsión externa sea mayor que el obtenido en las emulsiones internas además de ser estable a través del tiempo para así poder encapsular más gotas de emulsión interna en la emulsión múltiple y obtener un alto rendimiento de la emulsión (Garti y Aserin, 1996; Garti, 1997a, Dickinson, 2003).

Para la formación de una emulsión múltiple estable y con alto rendimiento, la literatura recomienda (Garti 1997b) que el tamaño de las gotas en la emulsión externa sea lo suficientemente grande, entre 10 y 60 μm para encapsular la mayor cantidad de gotas de emulsión interna, con un tamaño entre 0.5 y 2 μm , es decir, que el tamaño de partícula de la emulsión externa sea entre 20 y 30 veces más grande que el de la emulsión interna.

En la Figura 9 se muestra el comportamiento del diámetro medio volumétrico $D_{4,3}$ de emulsiones O/W_2 a través del tiempo, preparadas con diferentes concentraciones de goma de mezquite, conforme se aumenta la concentración de goma de mezquite, el diámetro medio volumétrico disminuye aunque su comportamiento a través del tiempo fue más estable.

El tamaño de partícula de las emulsiones O/W_2 realizadas con concentraciones de goma de mezquite entre 1% y 10.5% (ver Figura 9) a través del tiempo se encuentra entre 10 y 30 μm , sin embargo estas concentraciones de goma de mezquite, no garantizan la formación de una emulsión estable que tenga las condiciones adecuadas para formar microencapsulados, ya que se requieren altas concentraciones de material de pared, pues autores como (Ré, 1998, Beristain y col., 1999, Pedroza Islas y col., 2002), indican que para obtener emulsiones estables y de alto rendimiento que sean capaces de formar microencapsulados funcionales, necesitan tener concentraciones de material de pared arriba del 20% p/p por lo que se elaboró una emulsión O/W_2 con una concentración de goma de mezquite del 25% p/p observándose que el diámetro medio volumétrico $D_{4,3}$ permaneció estable a través del tiempo alrededor de 2.74 μm que se encuentra entre 20 y 30 veces más grande que el tamaño obtenido de la emulsión interna W_1/O obtenidas en la primera parte de la investigación, por lo que se seleccionó ésta concentración de goma de mezquite (Anexo B, tabla B4).

Para las emulsiones O/W_2 elaboradas con diferentes concentraciones de suero de leche (ver Figura 10), conforme aumentó la concentración, el diámetro medio volumétrico $D_{4,3}$ aumentó excepto para la concentración del 25% esto se debe a que las proteínas tienden a adsorberse en la interfase aceite agua para formar una capa alrededor de las gotas durante el proceso de emulsificación (Dickinson, 2003), por lo que presentan mejor estabilidad que las formadas con goma de mezquite.

Se tomó como criterio de selección, la emulsión O/W₂ con una concentración de suero de leche que tenga diámetro medio volumétrico D_{4,3} entre 20 y 30 veces más grande que los diámetros obtenidos en la emulsión interna como lo mencionado en la literatura (Garti, 1997a), que fue la del 25% con un diámetro volumétrico promedio D_{4,3} de 2.74 μm (Anexo B, tabla B5).

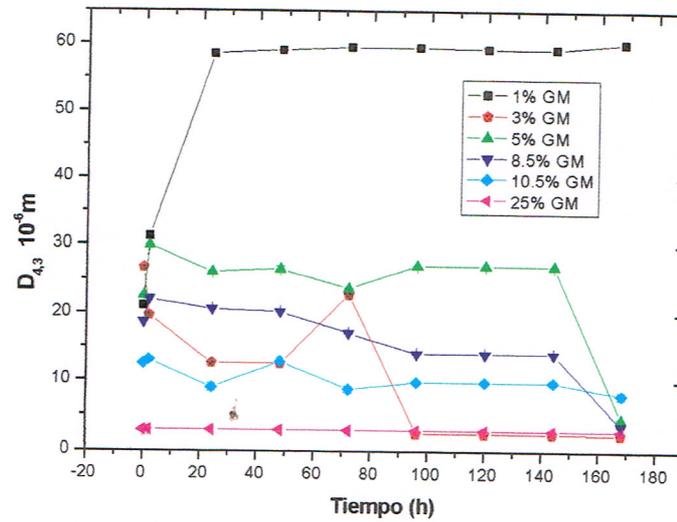


Figura 9 Comportamiento de $D_{4,3}$ a través del tiempo de la emulsión externa O/W_2 a diferentes concentraciones de goma de mezquite.

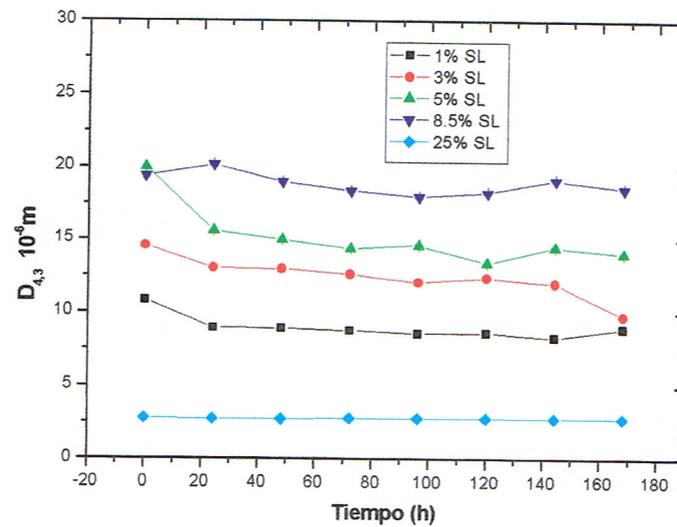


Figura 10 Comportamiento de $D_{4,3}$ a través del tiempo de la emulsión externa O/W_2 a diferentes concentraciones de suero de leche.

6.2.2 Determinación de la mezcla de biopolímeros Goma de Mezquite - Suero de Leche (GM-SL)

Las proteínas y los polisacáridos son dos de los más importantes biopolímeros usados como ingredientes en emulsiones, tienen la capacidad de estabilizar emulsiones debido a que, las interacciones entre proteínas y polisacáridos pueden conducir a la reducción de la actividad superficial por coacervación electrostática (McClements 1999), también pueden incrementar la estabilidad con respecto a la coalescencia debido a la formación de un complejo covalente (Dickinson 2003), esto dependiendo de la carga neta de cada biopolímero.

Una mezcla entre estas macromoléculas aumenta la posibilidad de obtener emulsiones más estables a través del tiempo debido a que la interacción entre las macromoléculas, hace que el desdoblamiento de las proteínas aumente la flexibilidad molecular lo que trae consigo un re-arreglo en la interfase haciéndola viscoelástica y brindando estabilidad contra fenómenos de floculación y coalescencia.

La Figura 11 muestra el comportamiento del diámetro medio volumétrico $D_{4,3}$ de emulsiones O/W_2 a través del tiempo, hechas con diferentes mezclas de biopolímeros (goma de mezquite-suero de leche) con una concentración total de biopolímeros del 25%. Todas las mezclas probadas formaron emulsiones O/W_2 estables en un rango de 480 h, las emulsiones formadas con 100% goma de mezquite y 100% suero de leche se comportaron igual que las realizadas en el punto 6.2.1, en las emulsiones donde se varió la mezcla se observó que cuando la mezcla presenta una concentración de goma de mezquite-suero de leche de 60:40, 50:50, 20:80, se obtiene el diámetro medio volumétrico alrededor de 2.63 μm al aumentar la cantidad de goma de mezquite y disminuir el suero de leche (80:20), el tamaño medio volumétrico disminuye a 2.54 μm , pero al tener una

mezcla de 40:60 goma de mezquite y suero de leche respectivamente el diámetro medio volumétrico aumenta hasta 3.01, esto pudo deberse a que la interacción entre la goma de mezquite y el suero de leche dejó menos disponible a la proteína en sus configuraciones macromoleculares teniendo menos capacidad de emulsificación incrementando el $D_{4,3}$.

Como la finalidad es obtener un tamaño de partícula que sea entre 20 a 30 veces mayor al obtenido para las emulsiones internas W_1/O , para así poder encapsular la mayor cantidad de gotas de emulsión interna, se seleccionó la mezcla de goma de mezquite-suero de leche de 40:60.

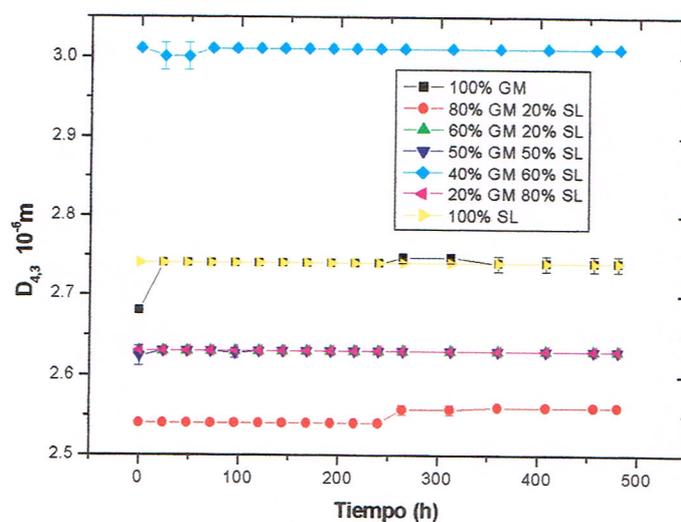


Figura 11 Comportamiento del $D_{4,3}$ a través del tiempo de la emulsión externa O/W_2 con mezclas de goma de mezquite y suero de leche (GM-SL).

6.2.3 Selección del tiempo de agitación de la emulsión externa O/W₂

El tiempo de agitación está relacionado con el tamaño de las gotas formadas, la estabilidad, la textura y la apariencia de la emulsión, por lo cual es un factor importante a considerar para crear una emulsión que contenga el mayor número de gotas en un rango óptimo que brinde la mayor estabilidad posible.

Una vez establecida la mezcla y concentración de biopolímeros, se observó el efecto que tiene el tiempo de agitación sobre el $D_{4,3}$ a través del tiempo, usando tiempos de agitación de 1 a 5 min a una velocidad de 5000 rpm, (ver Figura 12), se observa que conforme el tiempo de agitación aumenta el diámetro medio volumétrico $D_{4,3}$ a través del tiempo disminuye, formando emulsiones más estables. El tiempo de agitación influye en la disminución del tamaño de las gotas de la emulsión ya que las moléculas de proteína y suero de leche se adsorben rápidamente formando una capa interfacial alrededor de las gotas que las protege y previene la coalescencia.

El tamaño de partícula de las emulsiones O/W₂ varió entre 2.55 y 3.2 μm que es capaz de emulsificar las gotas obtenidas para las emulsiones W₁/O (Anexo B, tabla B7); no obstante, los tiempos de agitación de 1 a 3 min no resultaron idóneos pues no se logró una buena dispersión de la fase oleosa, en cambio a partir de los 4 min el proceso de dispersión fue más eficiente dando mayor cantidad de gotas manteniendo el diámetro a través del tiempo, por lo que se seleccionó como el tiempo de emulsificación más conveniente.

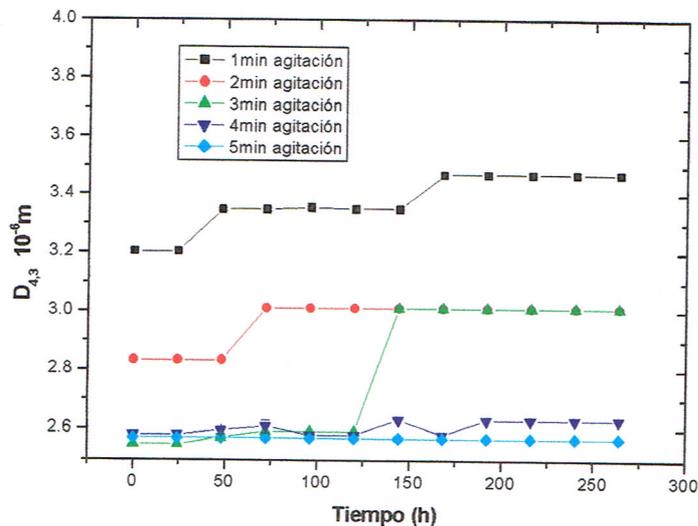


Figura 12 Comportamiento del $D_{4,3}$ a través del tiempo de la emulsión externa O/W_2 a diferentes tiempos de agitación.

6.3 Emulsión múltiple $W_1/O/W_2$

6.3.1 Selección de la concentración de goma gelana en la fase acuosa interna

Los agentes espesantes o gelantes son usados para incrementar la viscosidad y reforzar la estabilidad de la emulsión retardando el movimiento de las gotas y los mecanismos de inestabilidad como floculación y coalescencia (Mc Clements, 1999). La incorporación de un agente espesante como la goma gelana dentro de la fase acuosa de la emulsión interna mejora la estabilidad a largo plazo, especialmente si forma una red polimérica en la interfase aceite-agua; también tiene la capacidad de aumentar la viscosidad en la emulsión interna que ayuda a la estabilidad, disminuyendo el movimiento Browniano de las gotas retrasando así los mecanismos de inestabilidad. Las emulsiones realizadas a diferentes concentraciones de goma gelana en la fase acuosa interna presentan emulsiones

múltiples estables, el diámetro de la emulsión interna se encuentra entre 0.078 y 0.088 μm (ver Figura 13), conforme se aumentó la concentración de goma gelana el diámetro aumentó esto debido a que el aumento en la viscosidad de la fase acuosa interna no permite la adsorción completa en la interfase de los agentes emulsificantes formando gotas más grandes. Comparando los diámetros de la emulsión W_1/O con respecto a los experimentos antes realizados no hay diferencia manteniéndose alrededor de 0.08 μm , además de mantenerse estable a través del tiempo (Anexo B, tabla B8), sin embargo, el agente espesante proporciona estabilidad a largo plazo contra fenómenos de desestabilización de la emulsión.

Considerando costo-beneficio de la materia prima se tomó la concentración de 0.4% de goma gelana que ofrece una emulsión estable y sin cambios.

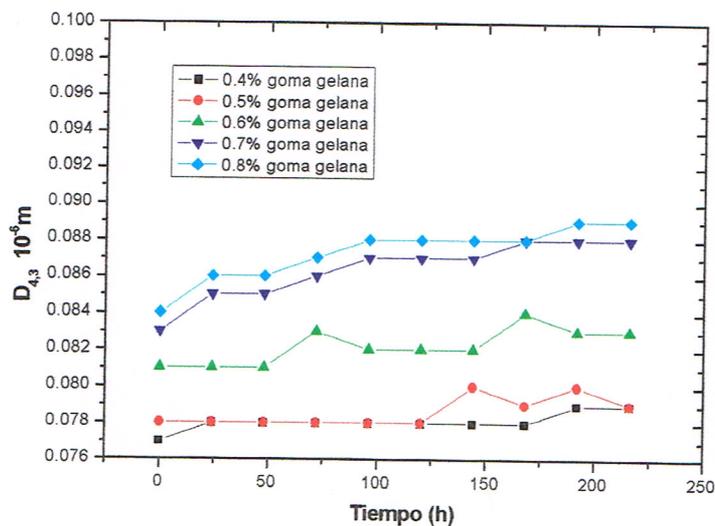


Figura 13 Comportamiento del $D_{4,3}$ a través del tiempo de diferentes concentraciones de goma gelana dentro de la fase acuosa interna de la emulsión $W_1/O/W_2$

6.3.2 Selección de los colorantes lipo e hidrodispersables

La selección de los colorantes lipo e hidrodispersables se realizó con la finalidad de obtener emulsiones múltiples que ofrezcan una tonalidad del abanico colorimétrico de pigmentación de yema de huevo. Se realizaron diferentes mezclas de colorantes hidrodispersables (carotenoides saponificados de la flor de cempasúchil "MUC") y colorantes lipodispersables (carotenoides esterificados del chile rojo "REC") (Tabla 1), observándose que colocando en una proporción de 2.6 "REC" por 1 "MUC" con una concentración de carotenoides totales de 0.5% en la emulsión total se alcanzó la tonalidad #15 del abanico colorimétrico de pigmentación de yema de huevo como se muestra en la Figura 14.

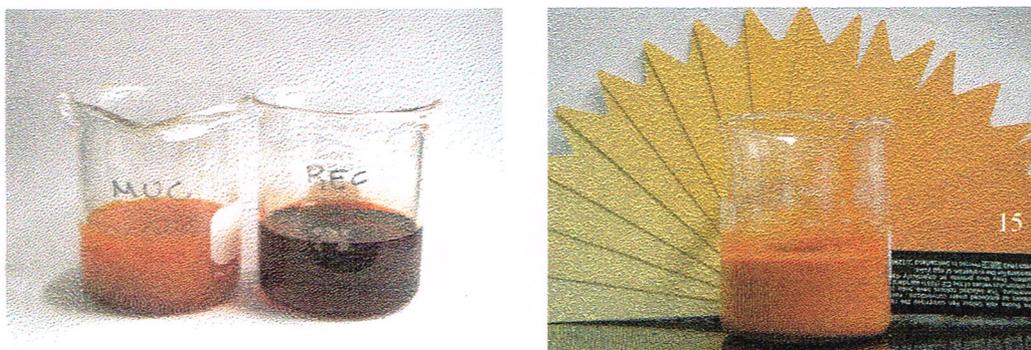


Figura 14 Combinación de colorantes hidrodispersables (MUC) y lipodispersables (REC)

Una vez seleccionados los parámetros descritos en las secciones anteriores, se estableció la formulación óptima de la emulsión múltiple.

Tabla 3 Formulación de la emulsión múltiple

Emulsión Múltiple W ₁ /O/ W ₂		(g)
Fracción volumétrica (\emptyset W₁/O)	0.2	
Fase acuosa interna		40
Goma gelana		0.2
Panodan SDK		3.2
Colorante acuoso (MUC)		26
Agua		10.6
Fase oleosa		160
Grinsted PGPR		12.8
Aceite vegetal		78.88
Colorante oleoso (REC)		68.32
Fracción volumétrica (\emptyset W₁/O/W₂)	0.2	
Fase acuosa externa		800
Goma de mezquite		80
Suero de leche		120
Agua		600
Total de emulsión múltiple		1000

6.3.3 Estabilidad y rendimiento de la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ a través del tiempo conteniendo colorantes lipo e hidrodispersables.

En la Figura 15 se observa el comportamiento del diámetro volumétrico superficial promedio de las gotas internas $D_{3,2}$ y el diámetro volumétrico promedio de las gotas externas $D_{4,3}$ de la emulsión múltiple conteniendo colorantes lipo e hidrodispersables a una concentración de 0.5% de carotenoides totales a través del tiempo (Anexo B, tabla B9). El diámetro medio volumétrico superficial $D_{3,2}$ está relacionado con el área superficial de las gotas expuestas a la fase continua por unidad de volumen de emulsión, mientras que el diámetro medio volumétrico de las gotas externas $D_{4,3}$ esta relacionado con el volumen de la fase externa.

Observamos que a través del tiempo las gotas tienden a crecer ligeramente en ambas emulsiones, este incremento puede atribuirse a una ligera coalescencia de las gotas de debido a que la barrera protectora formada alrededor de las gotas se ve afectada por las interacciones moleculares de los colorantes, los agentes emulsificantes y el agente espesante.

La relación entre el $D_{3,2} / D_{4,3}$ puede usarse como un indicativo del rendimiento de la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ así como para monitorear la estabilidad a través del tiempo. Si esta relación se encuentra entre 1 y 0.5 es indicativo de bajo rendimiento ya que el tamaño promedio de las gotas en la emulsión interna se aproximan al de la emulsión múltiple. Si se encuentra entre 0.5 y 0.35 es de rendimiento intermedio y si se encuentra entre 0.35 y 0 es un indicativo de alto rendimiento de la emulsión múltiple porque el tamaño promedio de las gotas en la emulsión interna son muy pequeñas en comparación con la emulsión múltiple (Anexo B, tabla B11).

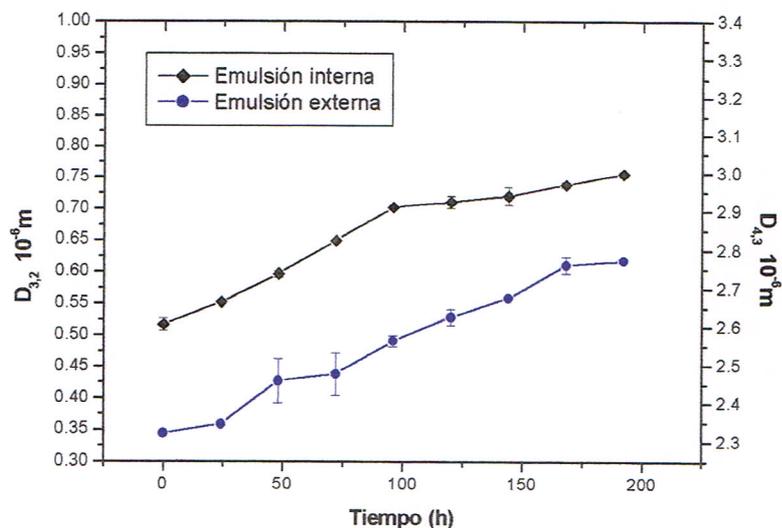


Figura 15 Comportamiento del $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ a través del tiempo de la emulsión interna y externa en la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$

Como se aprecia en la Figura 16 la relación entre $D_{3,2} / D_{4,3}$ resultó ser pequeña, se encuentra entre 0.22 a 0.27 μm lo que indica que hay un alto rendimiento de la emulsión múltiple que además se mantiene estable a través del tiempo.

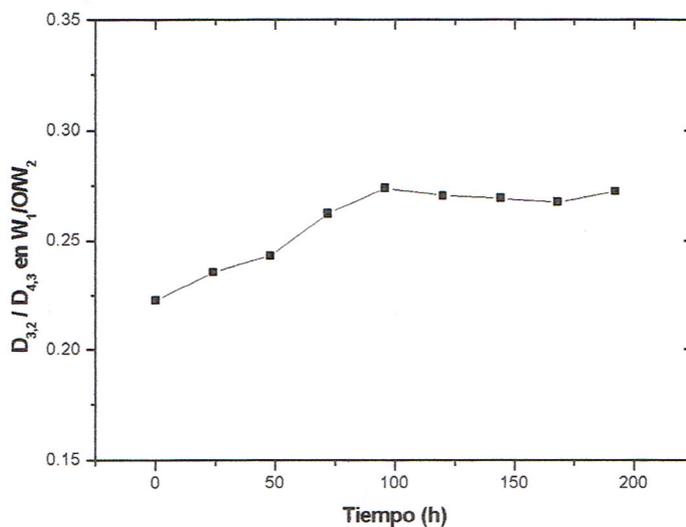


Figura 16 Relación entre diámetro interno y externo de la emulsión $W_1/O/W_2$ a través del tiempo

La cinética de coalescencia es utilizada para estimar la estabilidad de las emulsiones, en el caso de las emulsiones sencillas los valores de la cinética de coalescencia (C) se encuentran para emulsiones inestables alrededor de 10^{-3} s^{-1} y para emulsiones estables alrededor de 10^{-7} s^{-1} (Sherman, 1968). En la Tabla 3 se encuentran los valores de la cinética de coalescencia determinadas por las ecuaciones (1,2 y 3), para la emulsión interna y para la emulsión múltiple observándose que ambas se mantienen estables (Anexo B, tabla B10).

Tabla 4. Cinética de coalescencia

	C (s ⁻¹)
Emulsión interna	2x10 ⁻⁶
Emulsión externa	8x10 ⁻⁷

En la Figura 17 se observa la morfología de la emulsión múltiple obtenida, la cual presentó los tres tipos de morfología que existen. La tipo A que se caracteriza por tener una sola gota de fase acuosa interna, las tipo B que pueden contener de 2 hasta 50 gotas y las tipo C que contiene múltiples gotas de fase acuosa interna, estos tipos de morfología se mantienen a través del tiempo.

Finalmente se obtuvieron microencapsulados por secado por aspersion de la emulsión múltiple con una temperatura de secado de 175 °C, con una relación de material de pared a material encapsulado 1:1, no se observa colorante en la superficie de las gotas lo cual es indicativo de una buena retención de los colorantes a esta relación de material de pared a material encapsulado (ver Figura 18).



0 h



48 h



120 h



192 h

Figura 17 Microfotografías de emulsiones múltiples a través del tiempo

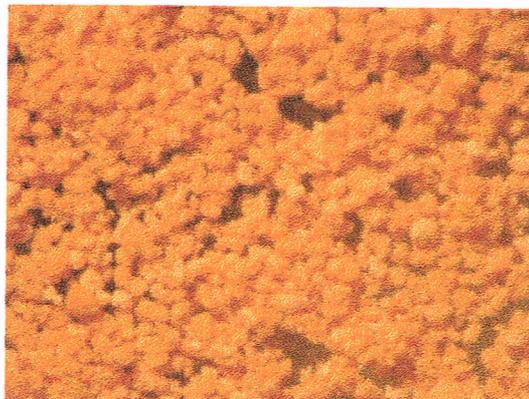


Figura 18. Microfotografía de microcapsulas obtenidas de la emulsión $W_1/O/W_2$ conteniendo colorantes hidro y lipodispersables

7 CONCLUSIONES

- Para la formulación de la emulsión primaria W_1/O se debe emplear una concentración del 8% p/p de la mezcla de agentes emulsificantes Grinsted PGPR – Panodan SDK con una relación de 80:20 para obtener el diámetro de partícula más pequeño (.070-.750 μ .) esta mezcla fue de gran ayuda para evitar los procesos de destabilización en la emulsión primaria.
- Se recomienda trabajar con una $\phi_{W/O}$ de 0.2 ya que ofrece emulsiones estables contra los fenómenos de desestabilización y una distribución más homogénea de la emulsión interna W_1/O .
- El uso de una mezcla entre goma de mezquite y suero de leche en una relación de 40:60 y con una concentración del 25% p/p resultó benéfica para la formación de la fase externa de la emulsión múltiple, ya que la combinación de éstas macromoléculas ofrece mejores efectos de estabilización posiblemente debido a la formación de complejos electrostáticos en la interfase que reduce la actividad superficial incrementando la estabilidad con respecto a la coalescencia.
- El uso de goma gelana en una concentración de 0.4% p/p dentro de la emulsión interna brindó protección contra floculación y coalescencia ya que aumentar la viscosidad disminuyó el movimiento Browniano de las gotas de emulsión.
- Morfológicamente se obtuvo una emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ conteniendo los tres tipos existentes predominando el tipo C que fue estable a través del tiempo y que pudo formar microencapsulados de colorantes lipo e hidrodispersables. El rendimiento que se tuvo de la emulsión fue alto.

- La cinética de coalescencia obtenida para la emulsión interna y para la emulsión múltiple refleja la formación de emulsiones estables.
- La emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ formulada con una concentración del 8% p/p de la mezcla de agentes emulsificantes Grinsted PGPR – Panodan SDK con una relación de 80:20, con una $\phi_{W/O}$ de 0.2, una mezcla entre goma de mezquite y suero de leche en una relación de 40:60 y con una concentración del 25% p/p y una concentración de goma gelana 0.4% p/p, es una emulsión estable, ya que retardo la floculación ya que los diámetros de las gotas permanecieron constantes y mantuvieron su individualidad a través del tiempo.

8 BIBLIOGRAFIA

- Beristain, C.I., García, H.S., E.J. Vernon-Carter, (1999). *Mesquite gum (Prosopis juliflora) and maltodextrin blend as wall material for spray-dried encapsulated orange peel oil*, Food Science Technology, International 5(4), 353-356.
- Dickinson, E. (1992). *Introduction to Food Colloids*, Oxford University Press, Oxford, 280-299.
- Dickinson, E. (2001). *Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology*, Colloid and Surfaces B: Biointerfaces 20, 197-210.
- Dickinson, E. (2003). *Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems*, Food Hydrocolloids 17,25-39.
- Dickinson, E. y McClements D.J. (1996). *Advances in Food Colloids*, Blackie Academic & Profesional, Glasgow.
- Florence, A.T. y Whitehill, D. (1981). *Some features of breakdown in water-in-oil-in-water multiple emulsions*, Journal of Colloid and Interface Science 79, 243-256.
- Forman, A. (1997). *As beta-carotene promise fades, focus turns to the other carotenoids*, Environmental Nutrition, 20, 1-2.
- Garti, N. y Aserin A. (1996). *Microencapsulation, Methods and Industrial Applications*, Edited by Simon Benita, Marcel Dekker Inc. Nueva York, 411-535.
- Garti, N. (1997a). *Double emulsions – scope, limitations and new achievements*, Colloids and Surfaces A: physicochemical and Engineering Aspects 123-124, 233-246.
- Garti, N. (1997b). *Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food applications*, Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie 30, 222-235.

- Hendry, G. y Houghton J., (1996). *Natural Food Colorants*, 2a Ed, Blackie Academic and Professional, 197-203.
- Jiao, J., Rhodes, D.G. y Burgess, D.J., (2002). *Journal of Colloid and Interface Science* 250, 444-450.
- Kita, Y., Matsumoto, S. y Yonezawa, D. (1997). *Viscometric method for estimating the stability of W/O/W-type, multiple-phase emulsions*, *Journal of Colloid and Interface Science* 62, 87-94.
- Koberstein, H. y Dickinson E. (1996). *Stability of water-in-oil-in-water emulsions containing faba bean proteins*, *Food Hydrocolloids* 10, 251-254.
- McClements, D.J. (1999). *Food Emulsions. Principles, Practice and Techniques*, CRC Press, FL.
- Moshe, F., Rosi, S., and Garti, Ni. (1983). *Multiple emulsions I. Stability: Inversion, apparent and weighted HLB*, *Journal of Colloid and Interface Science* 94, 174-178.
- Orozco, V. J., Cruz-Sosa, F., Ponce-Alquicira, E., Vernon-Carter, E.J. (2003). *Mesquite gum: fractionation and characterization of the gum exuded from Prosopis laevigata obtained from plant tissue culture and from wild trees*, *Carbohydrate Polymers* 54, 327-333
- Pedroza Islas, R., Macías-Bravo, S., Vernon-Carter, E.J., (2002). *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 1, 37-44.
- Ré, M. (1998). *Microencapsulation by spray drying*, *Drying Technology* 16 (6) 1195-1236.
- Sherman, P. (1968). *Emulsion Science*. Pergamon Press, London 332-334.
- Sholmo, M., Moshe, F., Garti, N. y Rodney, K. (1984). *Multiple emulsions II: HLB shift caused by emulsifier migration to external interface*, *Journal of Colloid and Interface Science* 97, 374-379.

- Stahl W., Sies H., y Sundquist A.R. (1994). *Role of carotenoids in antioxidant defense*. In: Rune Blomhoff, ed. *Vitamin A in health and disease*. New York, NY, 275-287.
- Vernon-Carter, E.J. y Sherman, P. (1980). *Rheological properties and applications of mesquite tree (Prosopis juliflora) gum 2. Rheological properties and stability of O/W emulsions containing mesquite gum*, *Journal Texture Studies*, 11, 351-365.
- Vernon Carter, E.J., Gómez, S.A., Beristain, C.I., Mosqueira G., Pedroza Islas, R. y Moreno-Terrazas F.C. (1996). *Color degradation and coalescence kinetics of Aztec Marigold oleoresin in water emulsions stabilized by mesquite or arabic gums and their blends*, *Journal Texture Studies*, 27, 625-641.
- Vernon Carter, E.J., Beristain, C.I. y Pedroza Islas, R. (2000). *Mesquite gum (Prosopis gum) en: Novel Macromolecules in Food Systems*, Elsevier 217-238.
- Wen, I. y Papadopoulos, K.D. (2001). *Effects of osmotic pressure on water transport in $W_1/O/W_2$ emulsions*, *Journal of Colloid and Interface Science* 235, 398-404.

ANEXOS

Anexo A

Métodos para la determinación del diámetro en la emulsión interna y externa

Determinación del diámetro por medio del sistema de Analizador de Imágenes

El sistema de analizador de imágenes está compuesto por un microscopio óptico BX 45, una cámara digital Olympus zoom 3030 y un software Image Pro-Plus versión 4.5. Para la determinación del diámetro se toma una fotografía de la emulsión montando la cámara con el zoom al 100 %, en el microscopio óptico utilizando un objetivo de 100x, dicha fotografía es digitalizada para ser analizada en el software del equipo que es calibrado a un objetivo de 100x, la fotografía digitalizada es transformada a escala de grises (escala 8), se mejora el contraste y se selecciono al azar un número determinado de gotas (90) se dibuja cada una de las gotas y se seleccionan las medidas para el cálculo el diámetro promedio de las gotas, éstos diámetros se transforman a excel y por medio de las siguientes expresiones se calculan:

$$D_{3,2} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad \text{Diámetro promedio volumétrico superficial}$$

$$D_{4,3} = \sqrt[3]{\frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i}} \quad \text{Diámetro promedio volumétrico}$$

Determinación del diámetro por medio del analizador de partículas Malvern series 2600

El equipo utiliza un paquete estadístico, para realizar las mediciones utiliza la difracción del rayo láser, las partículas dentro de la celda de medición esparcirán la luz la cual llega a los lentes de medición en donde se concentra el haz y el detector reunirá la luz esparcida mediante los ángulos de esparcimiento.

Para la determinación del tamaño de la gota se agito la muestra para que fuera lo más homogénea posible, posteriormente se lleno la tina del analizar de partículas con agua y con una pipeta pasteur se tomo una alícuota de aproximadamente 0.5 mL, que fue agregada gota a gota en la tina del analizador hasta llegar a una concentración de aproximadamente 0.20 unidades con volumen de concentración de 0.0019%. Estos datos fueron registrados e impresos por un equipo de computo directamente conectado al analizador.

Anexo B

Diámetros a través del tiempo de la emulsión interna, externa y múltiple.

Datos para la determinación del diámetro en la emulsión interna W_1/O .

Para el análisis de la emulsión interna W_1/O se utilizó el analizador de imágenes cuyos datos se muestran a continuación:

Tabla B1 Diámetros a diferente concentración de agente emulsificante lipofílico en la emulsión W_1/O

Concentración de emulsificante lipofílico	
Grinsted PGPR (%)	$D_{4,3} 10^{-6} \text{ m}$
1	0.203
3	0.144
5	0.122
8	0.094
10	0.074

Tabla B2 Diámetros a través del tiempo a diferente mezcla de agentes emulsificantes en la emulsión interna W_1/O

Tiempo (h)	$D_{4,3} 10^{-6} \text{ m}$ 60P*-40G**(%)	$D_{4,3} 10^{-6} \text{ m}$ 40P-80G (%)	$D_{4,3} 10^{-6} \text{ m}$ 20P-80G (%)	$D_{4,3} 10^{-6} \text{ m}$ 10P-90G (%)
0	0.078	0.074	0.087	0.085
12	0.079	0.083	0.093	0.090
24	0.082	0.097	0.095	0.094
36	0.096	0.099	0.097	0.092
48	0.103	0.106	0.097	0.095
60	0.131	0.113	0.098	0.093
72	0.147	0.122	0.098	0.093

* Emulsificante hidrofílico Panodan SDK

** Emulsificante lipofílico Grinsted PGPR

Tabla B3 Diámetros a través del tiempo para la selección de la fracción volumétrica ϕ en la emulsión interna W_1/O

Tiempo (h)	$D_{4,3} 10^{-6} \text{ m}$ $\phi 0.1$	$D_{4,3} 10^{-6} \text{ m}$ $\phi 0.2$	$D_{4,3} 10^{-6} \text{ m}$ $\phi 0.3$	$D_{4,3} 10^{-6} \text{ m}$ $\phi 0.4$	$D_{4,3} 10^{-6} \text{ m}$ $\phi 0.5$
0	0.076	0.077	0.078	0.080	0.081
5	0.076	0.077	0.079	0.081	0.082
12	0.077	0.078	0.080	0.082	0.082
24	0.077	0.078	0.081	0.083	0.084
36	0.078	0.078	0.081	0.084	0.085
48	0.078	0.078	0.081	0.085	0.086
60	0.078	0.078	0.082	0.086	0.086
72	0.078	0.078	0.082	0.086	0.086

Datos para la determinación del diámetro en la emulsión externa O/W_2

Para el análisis de la emulsión externa O/W_2 se utilizó el analizador de partículas Malvern series 2600.

Tabla B4 Diámetros a través del tiempo de la emulsión O/W_2 a diferentes concentraciones de goma de mezquite

Tiempo (h)	$D_{4,3} 10^{-6} \text{ m}$ 1%	$D_{4,3} 10^{-6} \text{ m}$ 3%	$D_{4,3} 10^{-6} \text{ m}$ 5%	$D_{4,3} 10^{-6} \text{ m}$ 8.5%	$D_{4,3} 10^{-6} \text{ m}$ 10.5%	$D_{4,3} 10^{-6} \text{ m}$ 25%
0	21.06	26.65	22.49	18.63	12.38	2.68
2	31.19	19.61	29.82	22.02	12.97	2.74
24	58.66	12.45	25.91	20.57	8.22	2.74
48	59.03	12.45	26.33	20.15	12.73	2.74
72	59.43	22.76	23.67	17.1	8.38	2.74
96	59.43	2.44	26.96	13.97	9.74	2.74
120	59.29	2.44	26.96	13.97	9.74	2.74
144	59.29	2.44	26.96	13.97	9.74	2.74
168	60.17	2.34	4.2	3.47	7.26	2.74

Tabla B5 Diámetros a través del tiempo de la emulsión O/W₂ a diferentes concentraciones de suero de leche

Tiempo (h)	D _{4,3} 10 ⁻⁶ m 1%	D _{4,3} 10 ⁻⁶ m 3%	D _{4,3} 10 ⁻⁶ m 5%	D _{4,3} 10 ⁻⁶ m 8.5%	D _{4,3} 10 ⁻⁶ m 25%
0	10.81	14.5	19.9	19.35	2.74
24	8.9	12.9	15.56	20.1	2.61
48	8.89	12.87	14.9	18.9	2.56
72	8.75	12.5	14.31	18.3	2.74
96	8.56	12.01	14.5	17.9	2.74
120	8.6	12.3	13.32	18.2	2.74
144	8.3	11.9	14.4	19.1	2.74
168	8.9	9.7	13.9	18.5	2.74

Tabla B6 Diámetros a través del tiempo de la emulsión O/W₂ a diferentes mezclas de biopolímeros

Tiempo (h)	D _{4,3} 10 ⁻⁶ m 100GM* (%)	D _{4,3} 10 ⁻⁶ m 80-20 GM-SL (%)	D _{4,3} 10 ⁻⁶ m 60-40 GM-SL (%)	D _{4,3} 10 ⁻⁶ m 50-50 GM-SL (%)	D _{4,3} 10 ⁻⁶ m 40-60 GM-SL (%)	D _{4,3} 10 ⁻⁶ m 20-80 GM-SL (%)	D _{4,3} 10 ⁻⁶ m 100SL** (%)
0	2.68	2.54	2.63	2.61	3.01	2.63	2.74
24	2.74	2.54	2.63	2.63	2.98	2.63	2.74
48	2.74	2.54	2.63	2.63	2.98	2.63	2.74
72	2.74	2.54	2.63	2.63	3.01	2.63	2.74
96	2.74	2.54	2.63	2.62	3.01	2.63	2.74
120	2.74	2.54	2.63	2.63	3.01	2.63	2.74
144	2.74	2.54	2.63	2.63	3.01	2.63	2.74
168	2.74	2.54	2.63	2.63	3.01	2.63	2.74
192	2.74	2.54	2.63	2.63	3.01	2.63	2.74
216	2.74	2.54	2.63	2.63	3.01	2.63	2.74
240	2.74	2.54	2.63	2.63	3.01	2.63	2.74
264	2.75	2.55	2.63	2.63	3.01	2.63	2.74
312	2.75	2.55	2.63	2.63	3.01	2.63	2.74
360	2.73	2.56	2.63	2.63	3.01	2.63	2.74
408	2.73	2.56	2.63	2.63	3.01	2.63	2.74
456	2.73	2.56	2.63	2.63	3.01	2.63	2.74
480	2.73	2.56	2.63	2.63	3.01	2.63	2.74

*Goma de mezquite

**Suero de leche

Tabla B7 Diámetros a través del tiempo de la emulsión O/W₂ a diferentes tiempos de agitación

Tiempo (h)	D _{4,3} 10 ⁻⁶ m 1 min	D _{4,3} 10 ⁻⁶ m 2 min	D _{4,3} 10 ⁻⁶ m 3 min	D _{4,3} 10 ⁻⁶ m 4 min	D _{4,3} 10 ⁻⁶ m 5 min
0	3.20	2.83	2.55	2.58	2.57
24	3.20	2.83	2.55	2.58	2.57
48	3.35	2.83	2.57	2.60	2.57
72	3.35	3.01	2.59	2.63	2.57
96	3.35	3.01	2.59	2.58	2.57
120	3.35	3.01	2.59	2.58	2.57
144	3.35	3.01	3.01	2.63	2.57
168	3.47	3.01	3.01	2.58	2.57
192	3.47	3.01	3.01	2.63	2.57
216	3.47	3.01	3.01	2.63	2.57
240	3.47	3.01	3.01	2.63	2.57
264	3.47	3.01	3.01	2.63	2.57

Datos para la determinación del diámetro en la emulsión múltiple W₁/O/W₂

Para el análisis de la emulsión múltiple W₁/O/W₂ se utilizó el analizador de imágenes cuyos datos se muestran a continuación.

Tabla B8 Diámetros a través del tiempo de la emulsión múltiple W₁/O/W₂ a diferentes concentraciones de goma gelana

Tiempo (h)	D _{4,3} 10 ⁻⁶ m 0.4%	D _{4,3} 10 ⁻⁶ m 0.5%	D _{4,3} 10 ⁻⁶ m 0.6%	D _{4,3} 10 ⁻⁶ m 0.7%	D _{4,3} 10 ⁻⁶ m 0.8%
0	0.0772	0.0779	0.0813	0.0829	0.0837
24	0.0775	0.0780	0.0813	0.0847	0.0855
48	0.0777	0.0779	0.0813	0.0853	0.0859
72	0.0780	0.0781	0.0825	0.0857	0.0869
96	0.0779	0.0782	0.0821	0.0868	0.0875
120	0.0780	0.0784	0.0823	0.0866	0.0875
144	0.0782	0.0795	0.0823	0.0869	0.0878
168	0.0784	0.0792	0.0835	0.0877	0.0879
192	0.0788	0.0797	0.0833	0.0875	0.0885
216	0.0792	0.0792	0.0832	0.0878	0.0889

Tabla B9 Diámetros a través del tiempo de la emulsión interna y externa de la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$

Tiempo (h)	$D_{3,2} 10^{-6} \text{ m}$ emulsión interna	$D_{4,3} 10^{-6} \text{ m}$ Emulsión externa
0	0.51163	2.31881
24	0.55147	2.34605
48	0.59131	2.42456
72	0.6482	2.49811
96	0.7051	2.57165
120	0.71556	2.61274
144	0.72671	2.67155
168	0.73969	2.77145
192	0.75752	2.77176

Tabla B10 $\ln(Nt)$ para la determinación de la cinética de coalescencia de la emulsión interna y externa

Tiempo (h)	$\ln(Nt)$ emulsión interna	$\ln(Nt)$ emulsión externa
0	28.6790	24.1454
24	28.4541	24.1104
48	28.2448	24.0116
72	27.9692	23.9220
96	27.7168	23.8349
120	27.6726	23.7874
144	27.6262	23.7206
168	27.5731	23.6105
192	27.5017	23.6101

Tabla B11 Relación entre el diámetro de la emulsión interna y el diámetro de la emulsión externa a través del tiempo

Tiempo (h)	$D_{3,2}/D_{4,3}$ (-)
0	0.22064
24	0.235
48	0.24388
72	0.25948
96	0.27418
120	0.27387
144	0.27202
168	0.2669
192	0.2733

GLOSARIO

Emulsificante: Sustancia o mezcla de sustancias que disminuye la tensión superficial en la interfase aceite-agua, y tiene la capacidad de formar una emulsión estable por corto tiempo.

Lipofílico: Sustancia capaz de disolverse en grasas.

Lipofóbico: Sustancia incapaz de disolverse en grasas.

Hidrofílico: Sustancia capaz de disolverse en agua.

Hidrofóbico: Sustancia incapaz de disolverse en agua.

Biopolímero: Moléculas de proteína o polisacárido.

Amfifílico: Moléculas que tienen una cola hidrofóbica larga y una cabeza hidrofílica.

Homogenización: Proceso para convertir dos líquidos inmiscibles en una emulsión, o la reducción del tamaño de partícula de las gotas en una emulsión ya existente.

Espesante: Sustancia capaz de aumentar la viscosidad de una solución.

Presión Osmótica: Fuerza ejercida en el transporte de un líquido a través de una membrana.

Viscosidad: Medida de la resistencia que un fluido ofrece bajo la acción de una fuerza aplicada (específica para cada fluido).

Coalescencia: Dos o más gotas de la emulsión se juntan para formar una gran gota.

Floculación: Asociación de las gotas de la emulsión bajo la influencia de fuerzas atractivas entre partículas, cada gota mantiene su individualidad.

Cremado: Separación gravitacional de gotas de aceite hacia arriba debido a una menor densidad que el líquido circundante.

Hidrocoloide: Biopolímeros hidrofílicos de alto peso molecular.

Gelante: Sustancia capaz de formar un gel en solución.

Surfactante: Molécula de bajo o alto peso molecular que presenta actividad superficial.

Goma: Polímero exudado de plantas (goma arábica, goma de mezquite)

HLB: Balance hidrofílico-lipofílico de los surfactantes que significa la solubilidad que tienen en agua o aceite.

Tensoactivo: Molécula anfifílica de bajo peso molecular que presenta actividad superficial.