

UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA

Estudios con Reconocimiento de Validez Oficial por Decreto Presidencial
del 3 de abril de 1981



“DISEÑO DE UNA EMULSIÓN MÚLTIPLE $W_1/O/W_2$ COMPATIBLE CON UN YOGUR, PORTADORA DE DOS PROBIÓTICOS (LACTOBACILLUS HELVETICUS Y BIFIDOBACTERIUM LONGUM) Y EVALUACIÓN DE SU SUPERVIVENCIA BAJO CONDICIONES IN VITRO”

TESIS

Que para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

Presenta

CÉSAR ARTURO GUTIÉRREZ DE LARA

Director

DRA. RUTH PEDROZA ISLAS

Lectores

DR. IVÁN RAFAEL QUEVEDO PARTIDA

M. EN C. DORA LUZ VILLAGÓMEZ ZAVALA

El comité tutor de este trabajo estuvo integrado por:

M. en C. Lorena Pedraza Segura

M. en C. Dora Luz Villagómez Zavala

Agradecimientos

A la UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA CIUDAD DE MÉXICO, al CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA, al INSTITUTO DE BEBIDAS PARA LA SALUD Y EL BIENESTAR y a la FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN-UNAM; por el financiamiento, apoyos y facilidades para la realización y conclusión de este trabajo.

A mi directora la Dr. Ruth Pedroza y mi codirector el Dr. Iván Quevedo y mis tutores la M. en C. Lorena Pedroza y la M. en C. Dora Luz Villagómez por sus consejos, sugerencias, apoyo y conocimientos.

Y a todos los que apoyaron y colaboraron para la realización de este trabajo:

Departamento de Ciencias en Ingeniería Química: Samuel Macías, I. A. Francisco López y Norma Ramírez.

Laboratorio de bioingeniería: Dr. Héctor Toribio.

Laboratorio de microbiología: Dr. Rubén Moreno y M. en C. Mayela de la Rosa.

Planta piloto: Miguel Sánchez y Juan Romero.

Almacén de química: Ingrid Hernández, Ana Elena Sagüés y José Alfredo Iturbe.

Almacén del Departamento de Salud: M. en C. Fernando Isoard, Noemí Martínez, Claudia Martínez, Arturo Alpizar, Victor Hugo Acevedo, Samuel Pérez, Óscar Zarate.

FES-Cuautitlán-UNAM: Dr. María Eugenia Ramírez e I. A. Edith Fuentes

Dedicatoria

A mi padre y a mi madre les dedico este trabajo como admiración, respeto y amor.

A mis hermanos y hermanas por su apoyo y confianza.

A mis amigos por su compañía.

Índice general

Resumen	8
Capítulo 1. Antecedentes	10
Capítulo 2. Objetivos	25
Capítulo 3. Metodología	26
Capítulo 4. Resultados y discusión de resultados	37
Capítulo 5. Conclusiones	56
Glosario	57
Bibliografía	63

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de los sitios y condiciones del TGI	13
Figura 2. Porcentaje de sinéresis de geles de pectina y iones calcio	37
Figura 3. Dureza de geles de pectina y iones calcio	38
Figura 4. Dureza de varios tipos de yogur	39
Figura 5. Superficie de contorno del % de precipitado vs velocidad de emulsificación (homogenización) y concentración de emulsionantes	40
Figura 6. Turbidez en función al pH para distintas proporciones de WPI/HMP	41
Figura 7. Imágenes de turbidez en función al pH para WPI:HMP (4:1)	42
Figura 8. Valores promedio de pH de distintos tipos de yogur	43
Figura 9. Potencial Z respecto al pH para WPI y HMP	44
Figura 10. Superficie de respuesta del % Volumen de separación contra % p/p de complejo y % p/p de emulsionante	45
Figura 11. Superficie de contorno del % Volumen de separación contra % p/p de complejo y % p/p de emulsionante	45
Figura 12. Curva de crecimiento <i>Bifidobacterium longum</i>	46
Figura 13. Curva de crecimiento <i>Lactobacillus helveticus</i>	46
Figura 14. Viscosidad aparente de varios tipos de yogur y emulsión múltiple	47
Figura 15. Viscosidad aparente de varios tipos de yogur y emulsión múltiple	48
Figura 16. Curva de flujo del sistema yogur Y	49
Figura 17. Micrografías de emulsión múltiple (resolución 100x).	53
Figura 18. Imágenes de simulación gastrointestinal de emulsión múltiple al término de cada sitio del TGI con adición de enzimas y sales biliares.	54
Figura 19. Gráfica del logaritmo de UFC/mL para el yogur, emulsión y emulsión con yogur antes y después de simulación del TGI.	55

Índice de cuadros

Cuadro 1. Concentración de pectina y cloruro de calcio para la formación de los geles	26
Cuadro 2. Velocidades de homogenización y % en p/p de emulsionantes para la formación de la emulsión simple	28
Cuadro 3. Proporciones de Aislado de proteína de suero de leche (WPI) y Pectina de alto metoxilo (HMP) y porcentaje de sólidos p/p, para la formación de complejos	29
Cuadro 4. Concentraciones p/p de complejo soluble (WPI:HMP) (1:4) y emulsionante (ésteres de ácido acetyl tartárico) (Panodan 205K), para la elaboración de la emulsión múltiple ($W_1/O/W_2$)	31
Cuadro 5. Caracterización reológica de muestras en un viscosímetro rotacional Haake	33
Cuadro 6. Metodología de digestión <i>in vitro</i> .	34
Cuadro 7. Componentes de jugos gastrointestinales de digestión <i>in vitro</i> .	35
Cuadro 8. Índice de consistencia (K) e índice de comportamiento (n)	49
Cuadro 9. Efecto de los días de almacenamiento en índice de consistencia (k) para el sistema yogur	50
Cuadro 10. Efecto de los días de almacenamiento en índice de consistencia (k) para el sistema emulsión múltiple	50
Cuadro 11. Efecto de los días de almacenamiento en índice de consistencia (k) para el sistema emulsión múltiple + probióticos	50
Cuadro 12. Efecto de los días de almacenamiento en índice de consistencia (k) para el sistema emulsión múltiple + yogur	51
Cuadro 13. Efecto de los días de almacenamiento en índice de consistencia (k) para el sistema emulsión múltiple + probióticos + yogur	51

Resumen

El propósito de esta trabajo fue diseñar una emulsión múltiple $W_1/O//W_2$ (agua en aceite en agua) que cumpliera con dos funciones principales: ser un sistema de entrega compatible con un yogur, y brindar protección a una mezcla probiótica encapsulada en el mismo de *Lactobacillus helveticus* y *Bifidobacterium longum* bajo condiciones simuladas del tracto gastrointestinal (TGI por sus siglas en inglés). Esto con el fin de comprobar si la emulsión múltiple obtenida podría brindar la protección adecuada a los probióticos en el ambiente gastrointestinal bajo condiciones controladas *in vitro*. La metodología del trabajo se basó en dos ejes rectores: el diseño de la emulsión desde lo interno hacia lo externo midiendo la estabilidad de la misma y la compatibilidad con un yogur mediante la medición de ciertas variables como la fuerza de gel, pH y textura, tanto de la emulsión como de varios tipos de yogures.

Para la formación de la emulsión múltiple se empleó el método de dos etapas: En la primera se formó una emulsión W_1/O usando un agente gelificante, para obtener una película viscoelástica, y aceite de linaza a concentraciones fijas y, como variables de estudio la velocidad de homogenización y la concentración de emulsionantes. Se utilizó un diseño factorial donde se midió como variable de respuesta el % de precipitado después de centrifugar las muestras, identificando que para una velocidad de 9000 rpm y una concentración de 12% p/p de emulsionantes se obtenía la emulsión simple con mejor estabilidad. Para la segunda etapa, se determinó a qué proporción y rango de pH se obtendrían complejos solubles proteína-polisacárido (WPI-HMP), utilizando como variable de respuesta la turbidez de las dispersiones, posterior a esto, se utilizó un diseño de superficie de respuesta y como variables de estudio la concentración del complejo soluble (WPI:HMP) y la concentración de emulsionante (Panodan). La variable de respuesta fue el porcentaje de precipitado obtenido después de centrifugar las muestras. El resultado óptimo para obtener una emulsión

múltiple más estable fue para la concentración de 7.82 % de complejo y 0.79 % de emulsionante. Una vez que se obtuvo la emulsión múltiple con mejor estabilidad, se procedió a la evaluación de la compatibilidad con el yogur, donde se midieron como variables de respuesta el índice de consistencia (k) y el índice de comportamiento (n) para los sistemas en el equilibrio, siguiendo el modelo de la potencia. Del análisis de resultados se encontró, que existieron diferencias significativas entre los sistemas: emulsión, yogur, emulsión + probióticos, emulsión + yogur y emulsión + yogur + probióticos. Los resultados obtenidos mostraron que la emulsión múltiple fue compatible con el yogur y que además, el yogur le brindó estabilidad a la emulsión al no haber cambios significativos en el índice de consistencia (k), es decir, sin mostrar cambios en la textura del sistema yogur + emulsión y el sistema yogur + emulsión + probióticos.

La simulación del TGI se basó en el consenso de un protocolo aceptado internacionalmente y algunos estudios de emulsiones simuladas bajo condiciones *in vitro* para un modelo estático. De forma general los resultados de esta simulación muestran que la emulsión múltiple propuesta aportó protección a los probióticos; ya que en un experimento donde se empleó yogur que contenía probióticos sin encapsular no hubo supervivencia y en el experimento realizado con los probióticos encapsulados en la emulsión se contabilizaron 5.6×10^6 UFC/mL (concentraciones recomendadas para que los probióticos puedan tener efectos benéficos en el huésped) después de la simulación bajo condiciones del TGI. Con lo anterior podría aseverarse que la emulsión múltiple es adecuada para proteger a los probióticos contra el ambiente del TGI *in vitro* y posiblemente pueda funcionar de igual manera para las condiciones *in vivo*. No obstante, este estudio es una primera aproximación por lo que será importante realizar estudios futuros para tener mayor conocimiento sobre efectos particulares de cada tipo de enzima y los distintos componentes de cada fluido simulado del tracto gastrointestinal, así como, el uso de modelos dinámicos para la simulación *in vitro*.

Capítulo 1. Antecedentes

1.1 Las emulsiones como sistemas de entrega.

1.1.1 Sistemas de entrega

Diversos estudios han alertado de la importancia de suministrar ingredientes funcionales en sitios específicos del tracto gastrointestinal que permitan reducir el riesgo de enfermedades asociadas a la alimentación (Jiménez, 2013; McClements et al., 2010). Al día de hoy, se han logrado importantes avances en la encapsulación de compuestos bioactivos dentro de sistemas de entrega de grado alimenticio que permitan la liberación de los mismos (McClements, 2015). De forma general, el proceso consta de dos fases; i) el diseño del sistema de entrega con materiales de soporte que permitan controlar la liberación y absorción de los componentes bioactivos o funcionales en lugares específicos del TGI (McClements et al., 2010) y ii) la encapsulación de componentes bioactivos dentro de los materiales de soporte del sistema de entrega (Chávarri et al., 2012). Sin embargo, el consumo de nutrientes que mejoren la salud y bienestar de los consumidores, constituye un reto para asegurar que dichos componentes conserven sus funciones bioactivas durante su paso por el TGI y que los componentes encapsulados se liberen en el sitio deseado.

1.1.2 Características de los sistemas de entrega de componentes bioactivos

Los sistemas de entrega requieren de características especiales tanto funcionales como técnicas para asegurar su incorporación en los alimentos y la protección y liberación de los componentes encapsulados a través del TGI. Algunas de las características funcionales de gran importancia son: la capacidad de carga, la eficiencia de carga, el mecanismo de entrega, la protección contra la degradación química y la biodisponibilidad (McClements et al, 2007; 2010). Y algunas características técnicas que deberán cumplir son: ser de grado alimenticio, compatibilidad con la matriz del alimento, resistencia a

las distintas etapas de procesamiento del alimento y de producción económica. (McClements et al., 2007; 2010).

1.1.3 Procesos fisicoquímicos y fisiológicos en el TGI

Los sistemas de entrega experimentan cambios importantes en sus propiedades fisicoquímicas (ej., tamaño de partícula, estructura, carga, composición, etc.) a medida que interactúan con las condiciones del medio como pH, fuerza iónica, actividad enzimática, temperatura, entre otros, propios de cada sitio del TGI. (McClements, 2015).

Con el fin de ilustrar el proceso en la Figura 1 se presenta un esquema del TGI. La boca es la primera parte del TGI donde interactúan los sistemas de entrega, pudiéndose presentar la ruptura de la matriz del sistema de entrega debido a los movimientos mecánicos y por el contacto con la lengua, paladar, dientes, paredes bucales y garganta. Ahí, los sistemas de entrega se mezclan con la saliva equilibrándose hasta alcanzar la temperatura corporal ($\sim 37^\circ \text{C}$) (McClements, 2015).

El alimento que contiene el sistema de entrega (bolo alimenticio) se traga y pasa por el esófago por movimientos peristálticos, donde una vez procesado llega al estómago (Guerra et al., 2012, McClements, 2015). Ahí puede experimentar varios cambios en sus propiedades debido a los fluidos gástricos y al pH ácido entre 1 y 3. Las propiedades de los sistemas de entrega también pueden ser alteradas por las enzimas digestivas excretadas en el estómago, como las lipasas y proteasas (McClements, 2015).

En el estómago comúnmente se da la ruptura de las partículas formadas y pueden presentarse interacciones moleculares; al final, se da un vaciado selectivo de partículas pequeñas (quimo) a través del esfínter pilórico hacia el intestino delgado (McClements, 2015); mientras que las moléculas más grandes

se mantienen en el estómago, por un mecanismo de retropulsión, para seguir siendo degradadas (Guerra et al., 2012).

El intestino delgado está constituido por tres regiones principales : el duodeno (sección corta donde se descargan las secreciones del páncreas y el hígado), y las secciones largas tales como; el yeyuno y el íleon, donde se da la mayor absorción de los compuestos bioactivos debido a las enzimas digestivas, sales biliares, carbonatos y otras sales (Guerra et al., 2012; McClements, 2015). En el intestino delgado ocurre un incremento en el pH debido a los fluidos presentes que se mezclan con el material proveniente del estómago.

Todos los componentes que forman parte de la estructura del sistema de entrega que sean difíciles de digerir podrán llegar hasta el colon. En el colon se encuentra una población altamente diversa de bacterias denominada *microbiota* (Marchesi et al., 2015) que genera varias enzimas digestivas que pueden romper y absorber diversos componentes de los alimentos; como por ejemplo, las fibras dietéticas a partir de las cuales se pueden producir ácidos grasos de cadena corta y otros productos (McClements, 2015). En el colon también se da la absorción de agua y electrolitos, la reabsorción de sales biliares, y la formación, almacenamiento y eliminación de las heces (Guerra et al., 2012).

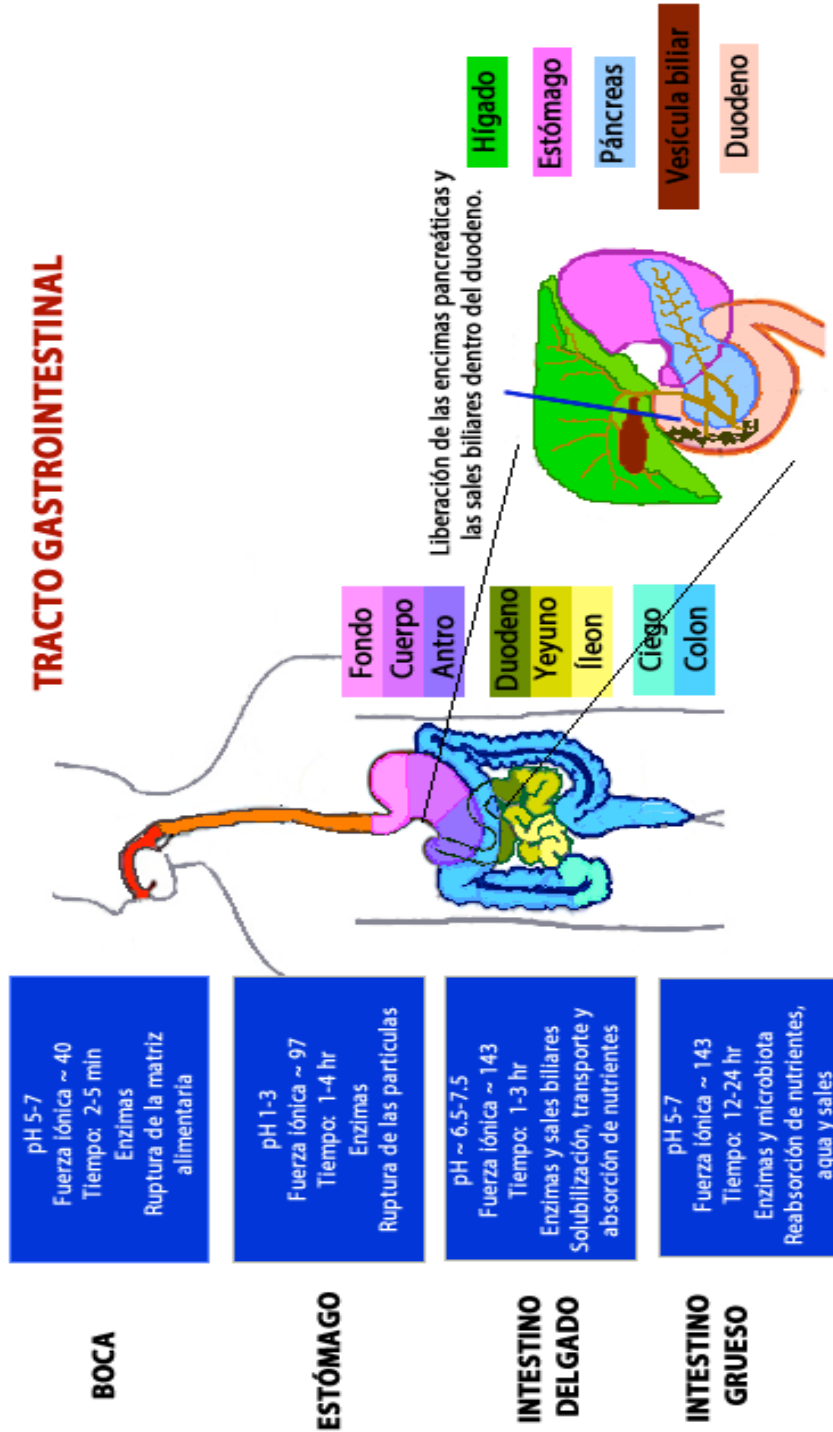


Figura 1 Esquema de los sitios y condiciones del TGI. (Adaptación de McClements et al., 2010; San Roman et al., 2011 y Flynn G. (*Digestive system with liver* 2011)).

1.1.4 El uso de emulsiones múltiples

Las emulsiones múltiples, particularmente agua en aceite en agua $W_1/O/W_2$ (por sus siglas en inglés) forman parte de los sistemas de entrega más utilizados para la encapsulación, protección y liberación de componentes bioactivos en la industria de alimentos (Özer et al., 2000; Shima et al., 2006; 2009; Fechner et al., 2007; Muschiolik, 2007; Bonnet et al., 2009; Pimentel et al., 2009; Murillo et al., 2011; Pérez et al., 2011; Kosegarten et al., 2012; Leal et al., 2012; McClements, 2012; Hernández et al., 2013; Jiménez, 2013 y 2013-A; Hattrem et al., 2014; McClements, 2015). Este tipo de emulsiones $W_1/O/W_2$ ofrecen ventajas sobre las emulsiones convencionales de aceite en agua O/W (por sus siglas en inglés), debido a la capacidad de atrapar componentes funcionales inmiscibles en alguna de las fases del sistema y, brindando mejoras en la protección contra la degradación, las condiciones de procesamiento y el control de la liberación, (Özer et al., 2000; Leal et al., 2007; McClements et al., 2007; Muschiolik, 2007; Murillo et al., 2011; Pérez et al., 2011; Leal et al., 2012; McClements, 2012; Hernández et al., 2013; Jiménez, 2013). Aunque se ha reportado que las emulsiones múltiples presentan inconvenientes tales como la difícil preparación, susceptibilidad a la descomposición durante el almacenamiento y el componente bioactivo puede filtrarse con el tiempo (McClements, 2015), pueden utilizarse para obtener productos bajos en calorías y reducidos en grasa, enmascarar sabores, prevenir la oxidación de componentes, mejorar las propiedades sensoriales de los alimentos, modular la velocidad de liberación de algún componente, proteger los ingredientes lábiles durante la digestión y en la elaboración de películas y recubrimientos comestibles (Muschiolik, 2007; Pérez et al., 2011; Kosegarten et al., 2012; Jiménez, 2013 y 2013-A).

La estabilidad de un sistema de entrega puede ser considerada en dos niveles: la estabilidad del propio sistema y la estabilidad cuando se incorpora a una matriz alimentaria (Jiménez, 2013). Por lo anterior, una emulsión múltiple debe ser estable por lo menos la vida de anaquel del alimento y ser compatible

con las propiedades sensoriales de la matriz del mismo. Actualmente, se requiere de un mayor conocimiento de los efectos de la adición de una emulsión múltiple sobre las distintas propiedades de una matriz alimentaria (Jiménez, 2013). Su aplicación más general ha sido encapsular compuestos bioactivos en la fase acuosa interna y medir la liberación del componente (Shima et al., 2006; 2009; Bonnet et al., 2009; Pimentel et al., 2009; Murillo et al., 2011; Chávarri et al., 2012; Jiménez, 2013; Rodríguez et al., 2014;). Sin embargo, en años recientes, se han hecho estudios para medir la estabilidad de las emulsiones múltiples como sistemas de entrega en alimentos lácteos (Lobato et al., 2008), y alimentos lácteos probióticos que cada vez son más reclamados por la población (Rodríguez et al., 2014).

1.1.5 Aspectos tecnológicos en la elaboración de emulsiones múltiples

Las emulsiones múltiples $W_1/O/W_2$ consisten en pequeñas gotas de agua contenidas dentro de gotas de aceite más grandes, las cuales se encuentran dispersas en una fase acuosa continua (Leal et al., 2007; McClements et al., 2007; Muschiolik, 2007; Bonnet et al., 2009; Murillo et al., 2011; Leal et al., 2012; Iqbal et al., 2013; Hattrem et al., 2014; Schuch et al., 2014; Oppermann et al., 2015). Los principales mecanismos de inestabilidad que presentan este tipo de emulsiones son: (1) Coalescencia de la gota exterior; (2) coalescencia de las gotas interiores; (3) coalescencia de la gota exterior y de las gotas interiores y (4) hinchamiento o encogimiento de las gotas internas, lo que provoca la liberación del componente encapsulado (Kosegarten et al., 2012).

El método de emulsificación de dos etapas es el más usado actualmente en la elaboración de emulsiones múltiples $W_1/O/W_2$ cinéticamente estables; consiste en una primera etapa donde se forma una emulsión simple W_1/O , y una segunda donde la emulsión simple se utiliza como fase dispersa de una segunda emulsificación donde la fase continua es agua (McClements et al., 2007; Kosegarten et al., 2012; Hernández et al., 2013; Jiménez, 2013; Sahu et al.,

2013). En las interfaces presentes se requiere de agentes tensoactivos o emulsionantes que ayuden a formar y estabilizar la emulsión. En la elaboración de emulsiones múltiples generalmente se utilizan dos tipos de emulsionantes y se debe tener en cuenta su naturaleza lipófila o hidrófila (Kosegarten et al., 2012; McClements, 2012; Tapan et al., 2012; Leal et al., 2012; Sahu et al., 2013).

Sin embargo, se ha demostrado que el uso de componentes poliméricos en la fase acuosa externa mejora la estabilidad de la emulsión, debido no sólo a sus propiedades de superficie, sino también a las contribuciones de repulsión estérica (Rodríguez et al., 2004). Así, se ha intensificado el uso de los complejos electrostáticos proteína-polisacárido que forman una membrana polimérica alrededor de los glóbulos, porque combinan la propiedad de una proteína hidrófoba que se une firmemente a las gotas de aceite y un polisacárido hidrófilo que se *solventa* en la fase acuosa externa, brindando mayor resistencia a las emulsiones contra el estrés del ambiente como el pH, la fuerza iónica, la temperatura, etc., además de ayudar a controlar la liberación del componente bioactivo encapsulado (Muschiolik, 2007; Fechner et al., 2007; Murillo et al., 2011; Pérez et al., 2011; Kosegarten et al., 2012; Hernández et al., 2013).

En los últimos años, para mejorar la estabilidad a largo plazo de las emulsiones múltiples, se ha propuesto la incorporación de un agente espesante o gelificante en la fase acuosa interna; el aumento de la viscosidad de la fase interna puede incrementar la capacidad de resistencia al cambio (la estabilidad) de las emulsiones, sobre todo durante el procesamiento y las condiciones del ambiente; (Rodríguez et al., 2004; McClements, 2012; Pérez et al., 2014, Oppermann et al., 2015) ya que se puede formar un recubrimiento interfacial alrededor de los glóbulos internos de agua que puede evitar cambios en el tamaño de partícula y controlar la “hinchazón” o el “encogimiento” osmótico de los glóbulos (Iqbal et al., 2013).

Un agente muy utilizado por su capacidad estabilizante, espesante y gelificante es la pectina que es un polisacárido rico en ácido galacturónico (Lootens et al., 2003; Dobies et al., 2005; Willats et al., 2006; Fraeye et al., 2010; 2010-A; Sundar et al., 2012). Específicamente, la pectina de bajo metoxilo puede formar geles en presencia de cationes divalentes (como el calcio), induciendo la asociación de cadena-cadena mediante enlaces iónicos entre los iones calcio y los grupos carboxilo libres (Thakur et al., 1997; Braccini et al., 2001; Narayanan et al., 2002; Dobies et al., 2005; Willats et al., 2006; Fraeye et al., 2010; 2010-A; Basak et al., 2014). La estructuración del gel responde a un modelo conocido como “caja de huevo”; Léase: Grant et al. (1973); Thakur et al. (1997); Braccini et al. (2001); Narayanan et al. (2002); Fraeye et al. (2010); (2010-A); Sundar et al. (2012) y Basak et al. (2014).

Además, existen otros parámetros importantes para lograr la estabilidad de la emulsión, como el método de preparación (velocidad de homogenización y tiempo de homogenización), la fracción de volumen de la fase dispersa y la naturaleza de los componentes bioactivos atrapados (Bonnet et al., 2009).

En resumen, una emulsión múltiple deberá ser compatible con la matriz del alimento al cual va a ser incorporada y mantener su estabilidad para conservar encapsulado al componente bioactivo. Esto con el fin de brindar protección bajo condiciones gastrointestinales y liberar adecuadamente al componente bioactivo en el sitio requerido. Lo anterior es posible estudiarlo con el empleo de modelos digestivos *in vitro*.

1.2 El TGI humano, la microbiota y los probióticos.

1.2.1 Aspectos importantes en la simulación del TGI humano

La digestión es uno de los procesos más complejos del cuerpo humano mediante el cual los alimentos son digeridos para obtener los nutrientes esenciales para el crecimiento, mantenimiento celular, y obtención de energía (Guerra et al., 2012). Durante el proceso de digestión las partículas alimentarias sufren transformaciones mecánicas y enzimáticas, para disminuir tamaño, romper estructuras, hidrolizar moléculas, transportar y absorber nutrientes. Estudiar el proceso digestivo humano ha sido técnicamente complejo y costoso (McClements et al., 2010-A; Guerra et al., 2012); la simulación de los diferentes sitios de acción es arduo (boca, estómago, intestino delgado e intestino grueso), debido a los movimientos mecánicos (como el masticado, vaciado gástrico y los movimientos peristálticos) y a las distintas composiciones de los fluidos de cada sitio (tipos de enzimas, pH, fuerza iónica, etc.) (Oomen et al., 2003; Kong et al., 2008; McConnell et al., 2008; McClements et al., 2010-A; Hur et al., 2011; Guerra et al., 2012; Juárez et al., 2013; Minekus et al., 2014).

Se han diseñado distintos modelos para simular el sistema digestivo, los modelos *in vitro* difieren unos de otros en: el número y tipo de etapas que incluyen en la simulación, la composición del fluido digestivo que se emplea en cada etapa y los movimientos mecánicos y los flujos de los fluidos (Hur et al., 2011). Los modelos *in vitro* se pueden dividir en estáticos y dinámicos, y ambos se subdividen en monocompartmentales o multicompartimentales dependiendo de la cantidad de sitios de acción que simulan. La diferencia reside en que los modelos estáticos no reproducen los procesos dinámicos de la digestión como el vaciado gástrico, los cambios continuos de pH o las tasas de flujo de secreción (Kong et al., 2008; Guerra et al., 2012) y mantienen las concentraciones constantes de las enzimas, fuerza iónica y sales biliares en cada compartimento (Minekus et al., 2014); mientras que los modelos dinámicos reproducen la temperatura, cambios de pH en los compartimentos, el vaciado gástrico, la

adición de componentes, etc., mediante el empleo de válvulas y bombas; además de que son controlados por computadora (Guerra et al., 2012). Sin embargo, los modelos estáticos son los más comunes y los más reportados en la literatura (Guerra et al., 2012; Minekus et al., 2014).

En años recientes varios científicos sumaron conocimientos para llegar a un consenso sobre las condiciones de la digestión humana para un modelo *in vitro*. El grupo “*COST Action INFOGEST*”, una red de científicos especializados en el campo de la digestión humana; trabajó en la elaboración de un protocolo para estandarizar las condiciones de simulación. Así, se logró el desarrollo de un modelo estático con condiciones de digestión armonizadas fácil de configurar. Con este modelo se pretende que una amplia comunidad de investigadores pueda hacer comparaciones entre los resultados de estudios, proponer mejoras y obtener información nueva (Minekus et al., 2014; Egger et al., 2016).

Del estudio de Minekus y colaboradores (2014) se obtuvo un protocolo para un modelo estático; donde se estandarizaron los tiempos de residencia, los valores de pH, fuerza iónica y tipos de sales, además de los tipos y concentración de enzimas para cada sitio del TGI. Cabe mencionar que para el protocolo no se toma en cuenta el intestino grueso; en la mayoría de los modelos *in vitro* es omitido este sitio porque la mayor absorción de nutrientes se da principalmente en el intestino delgado (Oomen et al., 2003; Hur et al., 2011). Aun así, se cuenta con un protocolo para estudiar la digestión de matrices alimentarias en condiciones específicas y poder predecir la bioaccesibilidad *in vivo* de los componentes específicos de dichas matrices; además que este protocolo, como sus autores mencionan “será probado y validado por diferentes grupos de investigación para una variedad de aplicaciones para determinar su uso y limitaciones” (Minekus et al., 2014), y en consecuencia, hacer mejoras y nuevos aportes.

1.2.2 Microbiota y microbioma

Los seres humanos viven en una “asociación de coevolución” con una enorme cantidad de microorganismos que residen en las superficies de sus cuerpos, tanto internas como las expuestas (Wang et al., 2014), denominada en su conjunto como microbiota (Icaza, 2012; Wang et al., 2014; Marchesi et al., 2015). El término fue empleado por primera vez por Lederberg y McCray en el 2001. Debido a dicha coevolución, estos microorganismos han formado una simbiosis a largo plazo en lugar de un parasitismo a corto plazo con los huéspedes humanos, cabe mencionar que la mayoría de la microbiota puede definirse como *simbiontes* o *patobiontes* dependiendo si son *mutualistas* que promueven la salud u *oportunistas* que inducen patologías en el huésped (Wang et al., 2014). La microbiota comienza a colonizar el cuerpo humano inmediatamente después del nacimiento y, la composición de cada individuo se establecerá durante los primeros años de vida (Bercik et al., 2012) siendo afectada por distintos factores como la genética, la edad, la vía de administración, la transferencia materna, la dieta, las condiciones del ambiente, el uso de antibióticos, infecciones gastrointestinales, el estrés, etc. (Bercik et al., 2012; Foster et al., 2013; Wang et al., 2014).

Existen distintos conceptos sobre la microbiota, que ayudan a hacer inferencias y predicciones, así como proporcionan un marco para el diseño de experimentos. Foxman et al., (2008) proponen cuatro conceptos: (1) La microbiota es considerada como una sola unidad que interactúa con el anfitrión y el ambiente externo, un órgano de células múltiples; (2) la microbiota consta de taxones múltiples, pero es considerada como una sola unidad en sus interacciones con el anfitrión; (3) la microbiota es un conjunto de taxones múltiples, que cada uno puede interactuar con el anfitrión y el medio ambiente de forma independiente y (4) la microbiota es como una comunidad ecológica dinámica que consiste de taxones múltiples, cada uno potencialmente interactuando con los otros, el anfitrión, y el medio ambiente.

En el TGI humano se encuentran alrededor de 100 billones de bacterias que son esenciales para la salud del huésped, tan sólo en el intestino se albergan un aproximado de 10^{14} - 10^{15} , esto es 10-100 veces más bacterias que células eucariotas en el cuerpo humano (Foster et al., 2013). Hay varios tipos de bacterias en el TGI, con un máximo aproximado de 1000 especies. Las dos familias más prominentes son los Firmicutes y Bacteroidetes, que representan al menos el 70% de la microbiota, además se encuentran Proteobacterias, Actinobacterias, Fusobacterias, y Verrucomicrobias, pero en proporciones menores. (Foster et al., 2013). Recientemente, la obesidad y el síndrome metabólico se han asociado con un perfil específico de la microbiota en el intestino, con una disminución de la proporción Bacteroidetes/Firmicutes (Icaza, 2012; Million et al., 2012).

La microbiota intestinal tiene un rol muy importante que incluso influye en el cerebro para tener una homeostasis normal y saludable (Foster et al., 2013). El cerebro y el intestino están comunicados por un sistema bidireccional conocido como eje intestino-cerebro, compuesto por las vías neurales tales como: el sistema nervioso central, el sistema nervioso autónomo (sistema nervioso entérico y el vago), el sistema inmune, los nervios simpáticos y de la columna vertebral y las vías humorales (Bercik et al., 2012; Foster et al., 2013). Cualquier alteración del TGI, del sistema nervioso central, del sistema nervioso autónomo o del sistema inmunológico en el huésped pueden dar lugar a modificaciones en: (1) El almacenamiento de grasa y el balance energético; (2) la función de la barrera del TGI; (3) inflamación de bajo grado general, tanto del TGI como sistémica; (4) aumento de la reactividad al estrés y (5) aumento de escenarios de depresión y ansiedad. (Foster et al., 2013).

Debido al papel tan importante que tiene la microbiota en el cuerpo humano, se ha intensificado la obtención del metagenoma de la misma. Así, se obtendrá un mayor conocimiento de la microbioma. (Marchesi et al., 2015). Se considera que la microbioma del TGI tiene cuatro funciones principales: (1) Defender al

huésped contra la colonización de patógenos mediante la competencia de nutrientes y la producción de sustancias antimicrobiales; (2) el fortalecimiento de la barrera epitelial e inducción de la inmunoglobulina A secretora (IgA); (3) facilita la absorción de nutrientes a partir de compuestos no digeribles como las fibras y (4) la maduración y funcionabilidad del sistema inmune del huésped. (Wang et al., 2014). Así, el perfil de la microbioma de cada individuo determinará las diferencias en cuanto al riesgo a desarrollar enfermedades, la respuesta inmune a las mismas y el tipo de tratamientos a emplear para su cura (Foster et al., 2013).

1.2.3 Los beneficios de los probióticos en el huésped

En la actualidad el uso de los probióticos se ha enfocado en la prevención y la terapia de diversos padecimientos; siendo estas bacterias la “fuerza impulsora” en el desarrollo de alimentos funcionales, en especial en una amplia variedad de productos lácteos fermentados como el yogur (de Vos et al., 2010; Burgarin et al., 2011). Sin embargo, no es sencillo lograr la supervivencia de estos probióticos a largo plazo en dichos alimentos. La supervivencia está influenciada por muchos factores como los cambios de pH en el producto, la toxicidad de oxígeno durante el procesamiento y almacenamiento, así como la falta de una fuente de nitrógeno debido a la ausencia de proteínas funcionales, etc. (de Vos et al., 2010).

Algunos beneficios que se conocen de los probióticos son: (1) Modulan la autoinmunidad del sistema nervioso central; (2) reducen los niveles de colesterol; (3) mejoran la intolerancia a la lactosa; (4) estimulan la absorción de calcio y vitaminas; (5) pueden aliviar trastornos neuropsiquiátricos a través de mecanismos hormonales y neuroquímicos, transmitir efectos ansiolíticos en varios tipos de trastornos, además que han mostrado propiedades anticancerígenas, etc. (Chávarri et al., 2012; Song et al., 2012; Wang et al., 2014). Cabe mencionar que entre los trastornos de la conducta alimentaria que conducen al sobreconsumo de alimentos, la depresión y la ansiedad son factores

importantes; al respecto, se ha encontrado que el consumo en la dieta de una mezcla probiótica que consiste de *Lactobacillus helveticus* y *Bifidobacterium longum* puede mitigar la angustia psicológica (Messaoudi et al., 2011), evitar la ansiedad y generar un efecto benéfico sobre la depresión post-infarto del miocardio (Arseneault-Bréard et al., 2012); además podrían proteger contra enfermedades relacionadas con el estrés y contribuir al bienestar mental de sujetos con niveles bajos del mismo. (Messaoudi et al., 2011 A). Para generar beneficios en el huésped los probióticos deben ser consumidos en cantidades adecuadas (Burgain et al., 2011; Chávarri et al., 2012; Song et al., 2012; Ozyurt et al., 2014; Wang et al., 2014); además tienen que llegar viables al sitio de acción del TGI.

1.2.4 Consideraciones finales

En la actualidad, se ha intensificado el uso de sistemas de entrega para aumentar la sobrevivencia de los probióticos, que mediante el entrampamiento o encapsulación les brindan la protección contra las condiciones adversas del TGI (Pimentel et al., 2009; de Vos et al., 2010; Burgain et al., 2011; Chávarri et al., 2012; McClements, 2015). En el presente estudio se pretende diseñar una emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ como sistema de entrega que contenga los probióticos (*Lactobacillus helveticus* y *Bifidobacterium longum*), de los cuales ya han sido mencionados sus posibles beneficios. Debido al incremento en el consumo de alimentos lácteos probióticos (Rodríguez et al., 2014), la emulsión múltiple será añadida a un yogur (matriz alimentaria) por lo que deberá ser compatible con el mismo, sin afectar sus propiedades de textura. Por lo que es importante evaluar el efecto que ejerza la emulsión en las propiedades del yogur.

En estudios recientes, los sistemas de entrega se han sometido a una serie de tratamientos que simulan una ubicación específica del TGI humano. Estos tratamientos implican generalmente mezclar el sistema de entrega con un fluido cuya composición, condiciones de mezclado y temperatura simulan la

parte del TGI; para después medir la liberación de los componentes bioactivos del sistema (McClements et al., 2010; Hur et al., 2011). Por lo que el sistema yogur-emulsión presentado aquí será sometido a condiciones gastrointestinales, teniendo como base el protocolo INFOGEST (Minekus et al., 2014), para después evaluar la supervivencia de los probióticos.

Capítulo 2. Objetivos

2.1 Objetivos Generales.

- Diseñar una emulsión múltiple agua-en-aceite-en-agua $W_1/O/W_2$ portadora de dos probióticos (*Lactobacillus helveticus* y *Bifidobacterium longum*), compatible con un yogur.
- Evaluar la sobrevivencia de los probióticos atrapados en la emulsión múltiple adicionada al yogur, en condiciones gastrointestinales simuladas.

2.2 Objetivos Particulares.

- Estimar el efecto de la formación de una película viscoelástica en la fase dispersa, sobre la estabilidad de la emulsión primaria agua en aceite W_1/O .
- Identificar el tiempo en alcanzar la fase logarítmica de crecimiento de los probióticos, *Lactobacillus helveticus* y *Bifidobacterium longum*, a partir del desarrollo de las curvas de crecimiento.
- Determinar las proporciones de WPI-Pectina de alto metoxilo y el pH adecuado para obtener un complejo soluble y evaluar su efecto en la estabilidad de la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$.
- Evaluar la sobrevivencia de la mezcla de probióticos (*Lactobacillus helveticus* y *Bifidobacterium longum*) entrampados en la emulsión múltiple bajo condiciones simuladas del tracto gastrointestinal.
- Estimar el efecto de la adición de la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ en las propiedades de textura del yogur.

Capítulo 3. Metodología

3.1 Formación de gel de pectina de bajo metoxilo en la fase acuosa interna de la emulsión primaria

Se elaboraron geles de pectina de bajo metoxilo (marca CPKelco, Dinamarca) y cloruro de calcio (Cloruro de calcio anhidro A.C.S. Marca Meyer, México) de acuerdo a lo propuesto por Dobies et al. (2005) con algunas modificaciones, las concentraciones de los componentes se muestran en el cuadro 1. Los componentes se pesaron y se colocaron por separado en recipientes con agua destilada. La pectina se agitó por un mínimo de 4 horas hasta su dispersión y se dejó reposar por la noche para su completa hidratación en refrigeración a $6 \pm 2^\circ \text{C}$, la solución con cloruro de calcio se refrigeró a la misma temperatura. Posteriormente, la dispersión con pectina se vertió en la solución de cloruro de calcio y se mezclaron lentamente hasta la formación del gel.

Cuadro 1. Concentración de pectina y cloruro de calcio para la formación de los geles.

Muestra	Pectina (% p/p)	[] CaCl ₂ (mM)
1	1	3.5
2	1	4.5
3	1	5.5
4	1	6.5
5	1	7.5

3.2 Medición del porcentaje de sinéresis de gel

Se formaron geles para cada una de las concentraciones del cuadro 1, los geles se colocaron en recipientes y se dejaron reposar por un periodo de 24 horas a una temperatura de $6 \pm 2^\circ \text{C}$. Posteriormente se separó el agua que había liberado cada gel en probetas graduadas. Y se midió el volumen de agua

liberada para así obtener el porcentaje de sinéresis de cada tipo de gel. La prueba se hizo por duplicado.

3.3 Medición de la dureza de gel

Se formaron geles para cada concentración de gel según el cuadro 1 y se les realizó una prueba de compresión con una geometría cilíndrica de 36 mm de diámetro en un Analizador de Textura (TA.TXplus, Marca Stable Micro Systems, Inglaterra). Del análisis se obtuvo el dato de dureza de cada gel. (estas pruebas se realizaron por duplicado).

3.4 Elaboración de la emulsión primaria agua en aceite

Se elaboraron emulsiones simples agua en aceite (W_1/O) con 70% en peso de fase continua y una fracción másica de fase dispersa de 30%, es decir, una ϕ_1 (ϕ_1) de 0.3. La fase dispersa (acuosa interna) estaba compuesta de un gel de pectina y iones calcio y la fase continua (oleosa) estaba compuesta de aceite extra virgen de linaza (Marca Inés, Guadalajara, México) y una mezcla de dos emulsionantes, Poliglicerol polirricinoleato (PGPR ®, marca Danisco, México) y ésteres de ácido acetil tartático (Panodan ®, marca Danisco, México).

La fase acuosa tenía una concentración de 3.5 mM de iones calcio y se elaboró de acuerdo al punto 3.1 de la metodología. Para la fase oleosa se mezclaron el aceite y los dos emulsionantes, éstos se encontraban en una proporción de 4:1, PGPR:Panodan respectivamente (Rodríguez et al., 2004; Lobato et al., 2008; Pimentel et al., 2009; Rodríguez et al., 2014), y se dejaron por la noche en refrigeración a $7 \pm 2^\circ \text{C}$ para su completa disolución en el aceite.

Se hizo un diseño factorial 2^3 (con réplicas) para evaluar los efectos de la velocidad de agitación y la concentración de emulsionantes (fijándose 10% p/p como valor medio según Murillo et al. (2011) y Hernández et al. (2013)) sobre la estabilidad de la emulsión como se muestra en el cuadro 2. Las fases se homogeneizaron en un homogeneizador Ultraturrax T-25 digital (con útil de

dispersión G18, marca IKA, Alemania), la fase continua se colocó en un baño de hielo para evitar el aumento de la temperatura mientras la fase dispersa se añadía poco a poco a una velocidad de homogenización de 5400 rpm; una vez que se añadió toda la fase dispersa a la continua se homogenizó a la velocidad según cuadro 2 para cada muestra por, un periodo de 12 minutos.

Cuadro 2 Velocidades de homogenización y (% p/p) de emulsionantes para la formación de la emulsión simple.

Muestra (con repetición)	Velocidad de homogenización (rpm)	Emulsionantes (% p/p)
1	7000	8
2	8000	8
3	9000	8
4	7000	10
5	8000	10
6	9000	10
7	7000	12
8	8000	12
9	9000	12

3.5 Elaboración de los complejos solubles WPI-HMP.

Se elaboraron complejos de aislado de proteína de suero de leche (Marca Hillmar, E.U.A.; WPI por sus siglas en inglés) y pectina de alto metoxilo (Marca CPKelco, Dinamarca; HMP por sus siglas en inglés) siguiendo metodología de Hernández et al. (2013). Las proporciones y las cantidades de los complejos se muestran en el cuadro 3. Se disolvió cada uno de los componentes por separado en agua destilada por un mínimo de 4 horas y se dejaron toda la noche en refrigeración a $6 \pm 2^{\circ} \text{C}$ para su completa hidratación. Se mezclaron la proteína y el polisacárido según cada proporción. Cada una de las muestras se dividió en 21 partes iguales a las cuales se les ajustó el pH de 2 hasta 6 con intervalos de 0.2 respectivamente, para observar

a que rango de pH se tiene la formación de complejos solubles; para lo que se hicieron diluciones 1:10 de cada muestra y se midió la transmitancia en un espectrofotómetro UV-VIS a 400nm (Agilent Technologies Cary 8454, Alemania y celda rectangular cell UV 10mm 3.5 ml, Alemania) , para después calcular la turbidez con la fórmula siguiente: Turbidez (τ) = $1/L \ln I_0/I_t$, donde τ es la turbidez (cm^{-1}), L es la longitud óptica (1 cm), I_0 es la intensidad de la luz incidente (100) y por último I_t es la intensidad de luz transmitida (% T) (Hernández et al., 2013).

Cuadro 3 Proporciones de Aislado de proteína de suero de leche (WPI) y Pectina de alto metoxilo (HMP) y (% p/p) de sólidos, para la formación de complejos

Muestra	Proporción	Sólidos
WPI-HMP	WPI:HMP	(% p/p)
1	2:1	1.5
2	3:1	2
3	4:1	2.5
4	5:1	3
5	6:1	3.5

3.6 Potencial Z.

Se determinó la movilidad electroforética para el aislado de suero de proteína (WPI) y la pectina de alto metoxilo (HMP) a una proporción 4:1 (WPI:HMP). Cada una de las moléculas se disolvió por separado en agua desionizada y se dejó toda la noche para su completa hidratación. Cada muestra se dividió en nueve partes iguales a las cuales se les ajustó el pH de 2 hasta 6 con intervalos de 0.5, respectivamente. La medición de la movilidad electroforética se realizó en un Zetasiser Nano (Malvern, Reino Unido). La medición se hizo por triplicado.

3.7 Elaboración de la emulsión múltiple.

Se elaboraron emulsiones múltiples mediante el método de dos etapas (Rodríguez et al., 2004; Lobato et al., 2008; Pimentel et al., 2009; Murillo et al., 2011; Pérez et al., 2011; Hernández et al., 2013; Rodríguez et al., 2014). En una primera etapa se elaboró una emulsión simple agua en aceite W_1/O como se describe en el punto 3.4 de la metodología, con una concentración de emulsionantes de 12% p/p a una velocidad de homogenización de 9000 rpm y por un tiempo de 12 minutos. En una segunda etapa, 20% p/p de emulsión primaria W_1/O se homogenizó en la fase acuosa externa W_2 , a una velocidad de 8000 rpm durante 10 minutos. Para la fase acuosa externa el WPI se desnaturalizó a 80° C por 20 minutos (Wagoner et al., 2016), y después se mezcló con la HMP y un emulsionante (Panodan 205K Danisco Mexicana, S. A. de C. V.); posteriormente se ajustó el pH a 4.3. Las concentraciones de complejo soluble (WPI/HMP) y emulsionante se muestran en cuadro 4. Con lo anterior, se realizó un diseño central compuesto en dos bloques para obtener una superficie de respuesta del efecto de la concentración de un complejo soluble (WPI:HMP) y la concentración del emulsionante, sobre la estabilidad de la emulsión múltiple.

Cuadro 4 Concentraciones (% p/p) de complejo soluble (WPI:HMP) (1:4) y emulsionante (ésteres de ácido acetil tartárico) (Panodan 205K), para la elaboración de la emulsión múltiple (W₁/O/W₂)

Muestra	Complejo WPI:HMP (% p/p)	Panodan 205K (% p/p)
1	5	1.5
2	7	1
3	5	1.5
4	7	2
5	3	1
6	3	2
7	5	1.5
8	5	2.21
9	7.83	1.5
10	5	1.5
11	5	1.5
12	2.17	1.5
13	5	0.79
14	5	1.5

3.8 Curvas de crecimiento de probióticos

3.8.1 Curva de crecimiento *Bifidobacterium longum*

Se preparó un inóculo del microorganismo en tubo de ensaye con 10 mL de medio MRS y se colocó en cámara de anaerobiosis (Marca BD GasPack, E.U.A.) y se dejó toda la noche en incubadora a 37 °C. Al día siguiente se vertió el inóculo en un matraz con 70 mL de medio MRS y se incubó a 37 °C y cada dos horas se determinó la absorbancia a 600 nm y se hizo el conteo de microorganismos en un microscopio (Marca Zeiss, Alemania) utilizando la cámara de Neubauer, para poder construir la curva de crecimiento.

3.8.2 Curva de crecimiento *Lactobacillus helveticus*

Se preparó un inóculo del microorganismo en tubo de ensaye con 10 mL de medio MRS y se dejó toda la noche en incubadora a 37° C. Posteriormente se vertió el inóculo en un matraz con 70 mL de medio MRS el cual se almacenó en incubadora a 37° C y cada tres horas se midió la absorbancia a 600 nm y se hizo el conteo de microorganismos en un microscopio (Marca Zeiss, Alemania) utilizando la cámara de Neubauer, para poder construir la curva de crecimiento.

3.9 Medición de la viscosidad aparente de diferentes tipos de yogur y emulsión múltiple

Se midió la viscosidad aparente de distintos tipos de yogur y la emulsión múltiple en un viscosímetro rotatorio (Brookfield RVT, E. U. A.). Cada muestra se colocó en un vaso de precipitados de 300 mL, donde se puso un volumen de muestra de 250 mL a una temperatura de 7 +/- 1 ° C y después se sumergió la aguja del viscosímetro, se hizo girar el viscosímetro por un tiempo de 60 s y después se tomó la lectura respectiva. La medición se hizo por duplicado.

3.10 Encapsulación de probióticos

Se prepararon los inóculos de cada uno de los microorganismos en tubos de ensaye con 10 mL de medio MRS y se dejaron toda la noche en incubadora a 37° C. (*B. longum* se colocó en cámara de anaerobiosis). Al día siguiente se vertieron por separado cada uno de los inóculos en matraces con 70 mL de medio MRS. Se midió la absorbancia de los cultivos a 600nm al momento en que el crecimiento estaba en fase logarítmica según curvas de crecimiento. Para obtener una pastilla de los microorganismos cada uno de los cultivos se vació en tubos Falcon y se centrifugaron a 2800 rpm por 20 minutos, cada una de las pastillas se resuspendió en solución salina estéril. Se colocó 1 mL de cada suspensión de microorganismos en la solución de pectina antes de formar el gel para la emulsión simple.

3.11 Caracterización reológica de emulsión múltiple, yogur y emulsión múltiple con yogur

Se realizó la caracterización reológica de la emulsión múltiple, el yogur y la emulsión múltiple con yogur. La emulsión múltiple y el yogur se mezclaron en una proporción 1:4 en un Caframo digital a 80 rpm por 4 minutos y el yogur utilizado fue un yogur batido natural sin azúcar (marca Alpura). La caracterización se hizo en un viscosímetro rotacional (Marca Haake, modelo RT 20 Rotovisco, con un instrumento Z20, E. U. A.) con las combinaciones como se muestran en cuadro 5. Se realizaron cuatro segmentos (ascenso, mantenimiento, descenso y segundo ascenso) a una temperatura de 7° C, empleando una velocidad de cizalla de 0 a 400 1/s durante 120 segundos en cada segmento. La caracterización se hizo al día 1, día 7, día 14 y día 21 de preparación, y se hizo por duplicado.

Cuadro 5 Caracterización reológica de muestras en un viscosímetro rotacional Haake

Muestra	Combinación
1	Emulsión múltiple
2	Yogur
3	Emulsión múltiple + yogur
4	Emulsión + probióticos
5	Emulsión múltiple + yogur + probióticos

3.12 Simulación gastrointestinal *in vitro* del sistema emulsión múltiple-yogur

Se realizó la simulación gastrointestinal *in vitro* empleando un modelo estático para la emulsión múltiple, el yogur y la emulsión múltiple-yogur; siguiendo la metodología de Versantvoort et al. (2005), Hur et al. (2009) y Lee et al. (2016), con el método modificado (ver cuadro 6). La simulación se hizo con fluidos que sólo contenían sales y con fluidos que contenían sales y enzimas.

Cuadro 6 Metodología de digestión *in vitro*.

Sitio	Boca	Estómago	Intestino delgado
			23 mL de paso 2
Volúmenes	5 mL	11 mL de paso 1	+
muestra y fluido	muestra	+	12 mL de jugo
simulado	+	12 mL jugo	duodenal
	6 mL saliva	gástrico	+
			5 mL de jugo biliar
Tiempo de agitación	5 minutos	2 horas	2 horas
Temperatura	37° C	37° C	37° C

Los jugos gastrointestinales para la digestión *in vitro*, se elaboraron siguiendo metodología de Rotard et al. (1995), Oomen et al. (2003), Versantvoort et al. (2005), Hur et al. (2009), Minekus et al. (2014) y Lee et al. (2016), con algunas modificaciones, una vez preparados se les ajustó el pH. Los componentes de la saliva, el jugo gástrico, el jugo duodenal y el biliar se pueden observar en el cuadro 7. (Sales: cloruro de potasio, fosfato biácido de potasio, cloruro de magnesio, carbonato de amonio, marca J. T. Baker; carbonato de sodio, marca Reasol; cloruro de calcio, marca Analytyca y cloruro de calcio anhidro, marca Mallinckrodt. Componentes orgánicos: ácido úrico, U2625, Sigma; glucosamina-D-hidroclorida, G4875, Sigma; albúmina sérica bovina, A7906, Sigma-Aldrich; extracto de sales biliares de cerdo, G1816, Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Enzimas: α -amilasa de *Aspergillus oryzae*, A6211, Sigma; mucina de estómago de cerdo tipo II, M2378, Sigma; pepsina de mucosa gástrica de cerdo, P7012, Sigma; pancreatina de páncreas de cerdo, P3292-100G, Sigma; y lipasa de páncreas de cerdo tipo II, L3126, Sigma.)

Cuadro 7 Componentes de jugos gastrointestinales de digestión *in vitro*.

		Boca	Estómago	Intestino delgado	
		Saliva	Jugo gástrico	Jugo duodenal	Jugo biliar
Componentes inorgánicos	KCl (0.5 mol/L)	15.1 mL	6.9 mL	6.8 mL	6.8 mL
	KH ₂ PO ₄ (0.5 mol/L)	3.7 mL	0.9 mL	0.8 mL	0.8 mL
	NaHCO ₃ (1 mol/L)	6.8 mL	12.5 mL	42.5 mL	42.5 mL
	NaCl (2 mol/L)		11.8 mL	9.6 mL	9.6 mL
	MgCl ₂ (H ₂ O) ₆ (0.15 mol/L)	0.5 mL	0.4 mL	1.1 mL	1.1 mL
	(NH ₄) ₂ CO ₃ (0.5 mol/L)	0.06 mL	0.5 mL		
	CaCl(H ₂ O) ₂ (0.3 mol/L)	2.5 mL	0.25 mL	2.5 mL	2.5 mL
	HCl (mol/L)	0.09 mL	1.3 mL	0.7 mL	0.7 mL
Fuerza iónica		~40	~84	~136	~136
Componentes orgánicos	ácido úrico	15 mg			
	glucosamina		10 mL		
	hidrocloroide				
	BSA		1 g	1 g	1.8 g
	sales biliares				30 g
Enzimas	α -amilasa	145 mg			
	mucina	50 mg	3 g		
	pepsina		1 g		
	pancreatina			3 g	
	lipasa			0.5 g	
pH		6.8±0.2	3.0±0.2	7.0±0.2	7.0±0.2

3.13 Conteo de probióticos en placa después de digestión *in vitro*

La emulsión múltiple, el yogur y la emulsión múltiple con yogur fueron centrifugados a 13500 rpm por 25 minutos a 10 °C (centrífuga 5402 Eppendorf) una vez terminada la simulación, bajo estas condiciones se produjo el rompimiento de los glóbulos de la emulsión; esto se comprobó mediante observación al microscopio. Posteriormente se suspendió el centrifugado en 1 mL de solución salina. El número de células vivas fue determinado por el método de conteo en placa, utilizando medio MRS, las muestras fueron incubadas a 37 °C por 48 horas (Pimentel et al, 2009; Sandoval et al., 2010; Eslami et al., 2016).

Capítulo 4. Resultados y discusión de resultados

4.1 Efecto de la concentración de iones Calcio en la formación de geles de pectina de bajo metoxilo.

Se formaron distintos geles de pectina de bajo metoxilo variando la concentración de cloruro de calcio y se realizó una inspección visual de los mismos, siguiendo el criterio de Garnier et al. (1993) y Dobies et al. (2005), para observar las diferencias en los estados físicos. Para las concentraciones de cloruro de calcio 6.5 y 7.5 mM se obtuvieron geles con sinéresis como se puede apreciar en la figura 2.

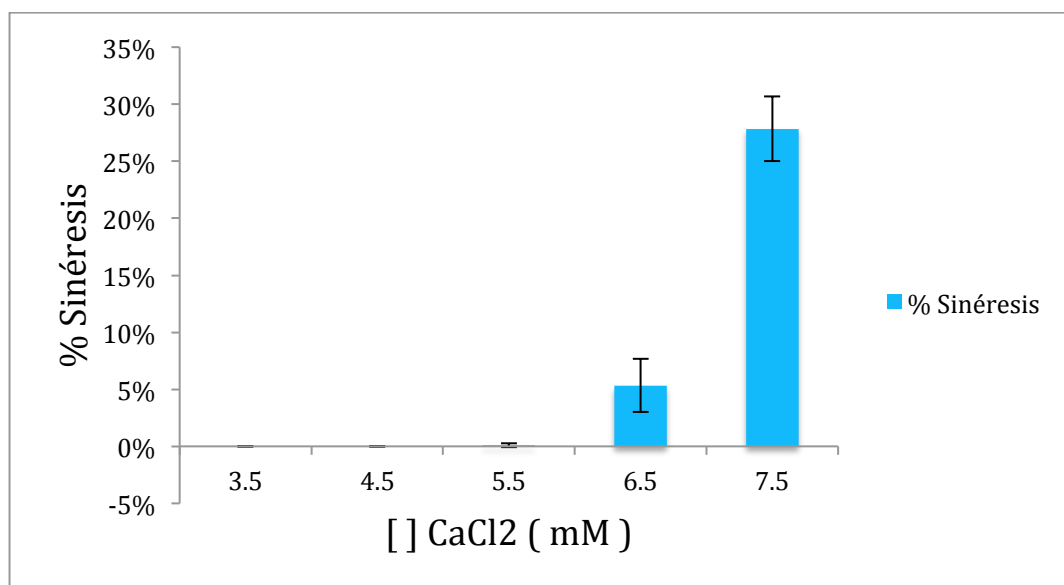


Figura 2 Porcentaje de sinéresis de geles de pectina y iones calcio. Las barras de error representan la desviación estándar.

Para las concentraciones de cloruro de calcio de 4.5 y 5.5 mM se observaron geles homogéneos y para la concentración de 3.5 mM, se observó un pregel (debido a la deformación del “menisco” cuando el recipiente que contenía el gel se colocó en posición horizontal (Garnier et al., 1993).

En la figura 3 se presenta la dureza de los distintos tipos de geles. Se observó que los geles con concentraciones de cloruro de calcio de 4.5 y 5.5 mM fueron los

que presentaron mayor dureza; esto pudiera atribuirse a una formación homogénea de la red; mientras que la dureza fue menor para los geles con concentraciones de 6.5 y 7.5 mM, pudiéndose deber al aumento de la concentración de iones calcio que incrementan los enlaces intramoleculares entre las cadenas poliméricas, conduciendo a la contracción o agregación de las mismas, dándose la exclusión del agua, presentando sinéresis (Cardoso et al., 2003; Braccini et al., 2011). El gel con una concentración de cloruro de calcio de 3.5 mM aunque no presentó sinéresis, su dureza fue similar a la de los geles con 6.5 y 7.5 mM; la concentración de calcio de 3.5 mM fue la idónea para tener un gel adecuado para encapsular a los probióticos y que no altere de manera significativa las propiedades sensoriales del yogur.

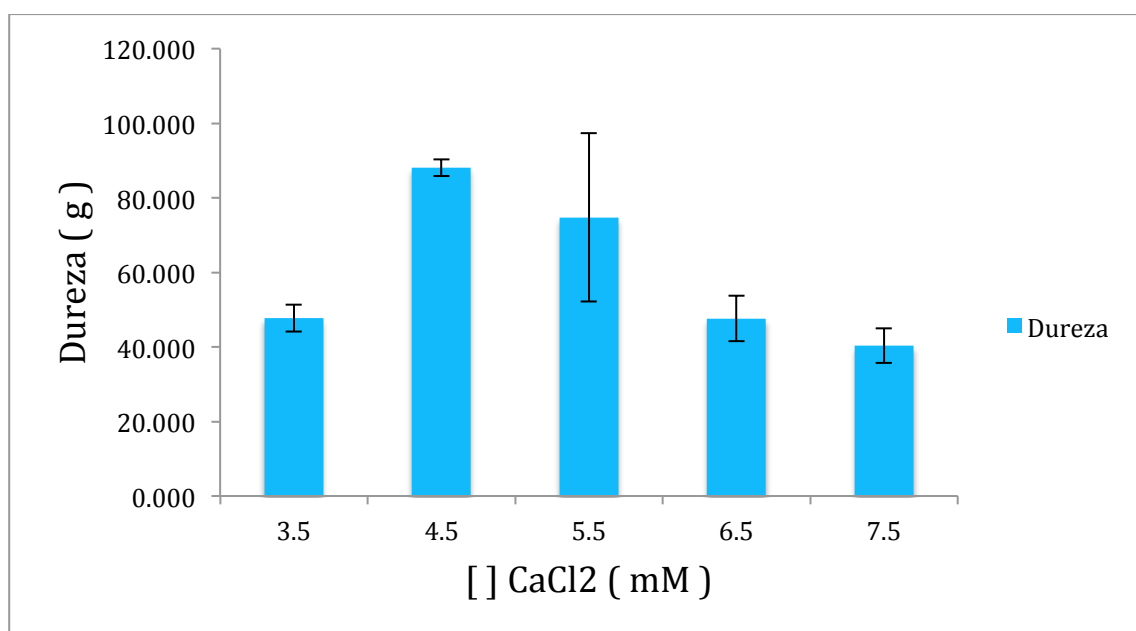


Figura 3 Dureza de geles de pectina y iones calcio. Las barras de error representan la desviación estándar.

Además, se midió la dureza de distintos tipos de yogur, (véase figura 4). Se pudo observar que el yogur que presenta menor dureza es el tipo bebible, seguido del yogur tipo batido; el yogur tipo griego presenta la mayor dureza, este valor de dureza del yogur griego se encuentra cercano al valor de los geles de pectina con concentración de iones calcio de 3.5, 6.5 y 7.5 mM.

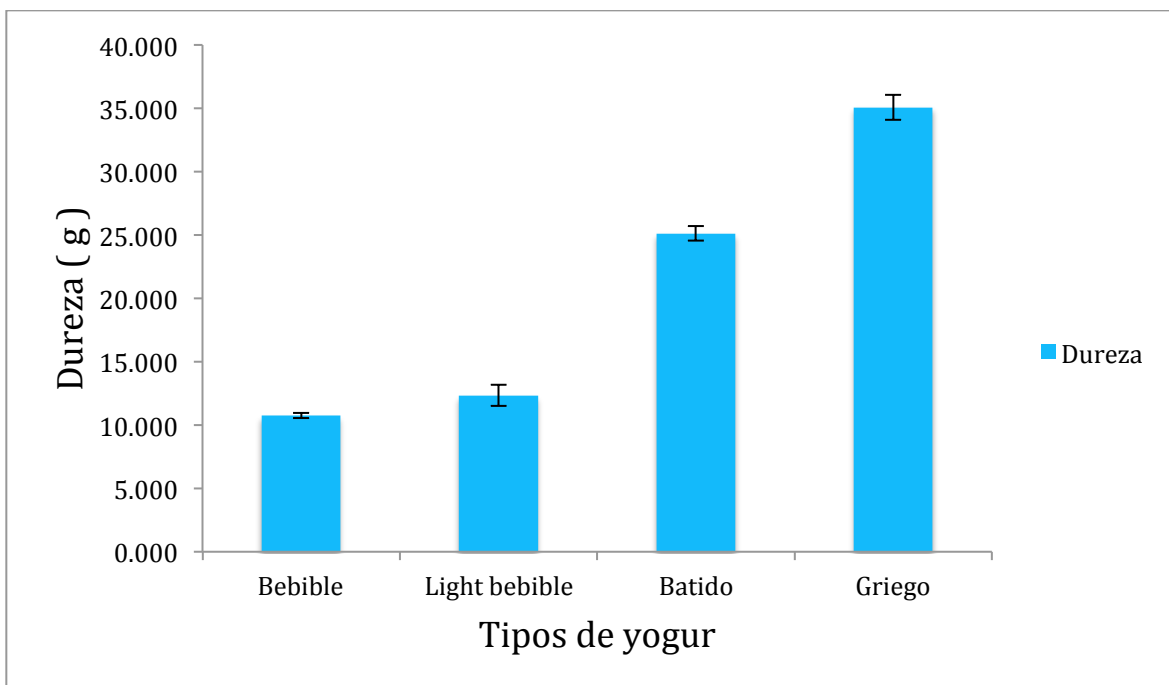


Figura 4 Dureza de varios tipos de yogur. Las barras de error representan la desviación estándar.

4.2 Efecto de la velocidad de agitación y concentración de emulsionantes en la estabilidad de la emulsión simple.

En este experimento se midió como variable de respuesta el porcentaje de precipitado obtenido después de centrifugar las muestras, se consideró que la emulsión fue más estable cuando el porcentaje de precipitado fue menor. Los datos se procesaron en un programa estadístico (Minitab17). En la figura 5 puede observarse un plano de contorno del porcentaje de precipitado en función de la velocidad de homogenización y la concentración de emulsionantes; en la zona en la que el color azul es más intenso, es donde se puede obtener el menor porcentaje de precipitado, mientras que en la zona donde el verde es más intenso, se pueden obtener porcentajes de precipitado más altos. Los valores de 12% p/p de emulsionantes y 9000 rpm de velocidad de homogenización fueron los idóneos para obtener el mínimo de porcentaje de precipitado, después de realizar una optimización en el mismo programa.

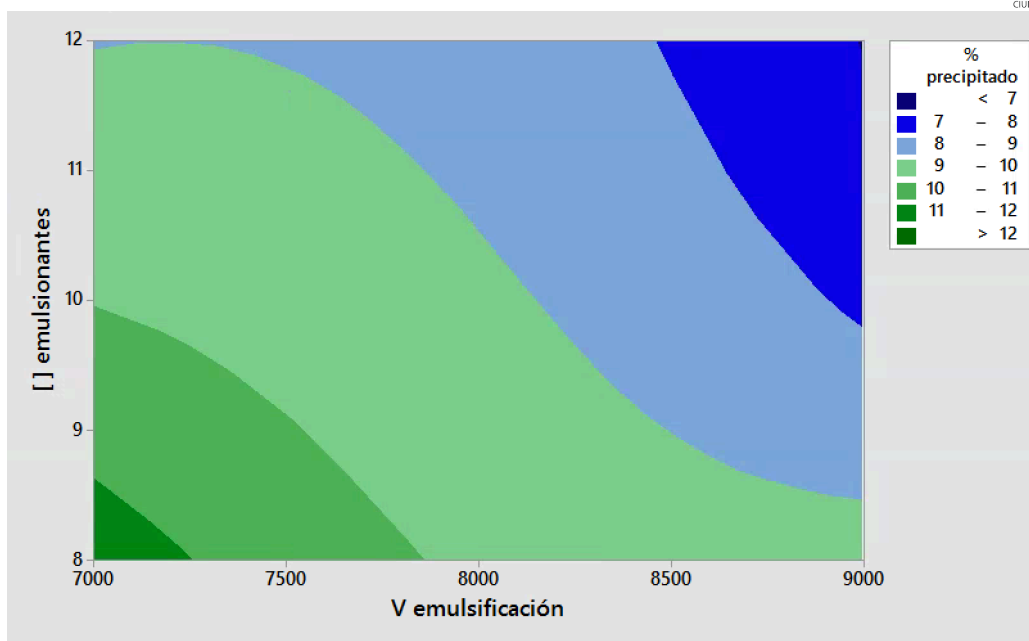


Figura 5 Superficie de contorno del % de precipitado vs velocidad de emulsificación (homogenización) y concentración de emulsionantes

4.3 Formación de complejos solubles.

En la figura 6 se presenta la turbidez en función del pH para cada una de las proporciones de WPI/HMP, éstas presentaron perfiles de interacción con tendencias similares, donde se observaron 4 regiones de interacción: Una región (I) con valores de pH < 2.4 donde se dio la incompatibilidad (separación) de las moléculas dándose el aumento de la turbidez. Una región (II) con la turbidez mínima donde se dio la formación de complejos insolubles (coacervados) a valores de pH entre 2.4 y 3.8 aproximadamente; para las proporciones 2:1 y 3:1 esta región de interacción fue más corta. Una región (III) en forma de meseta donde se dio la turbidez máxima, presentándose la mayor formación de complejos solubles a valores de pH aproximados entre 4 y 4.8; la meseta se encontró desplazada a la izquierda para las proporciones de 2:1 y 3:1 y también fue más corta. Y finalmente, una región (IV) a valores de pH > 5 donde la turbidez disminuyó porque se presentó la cosolubilidad de ambas moléculas (Hernández et al., 2013).

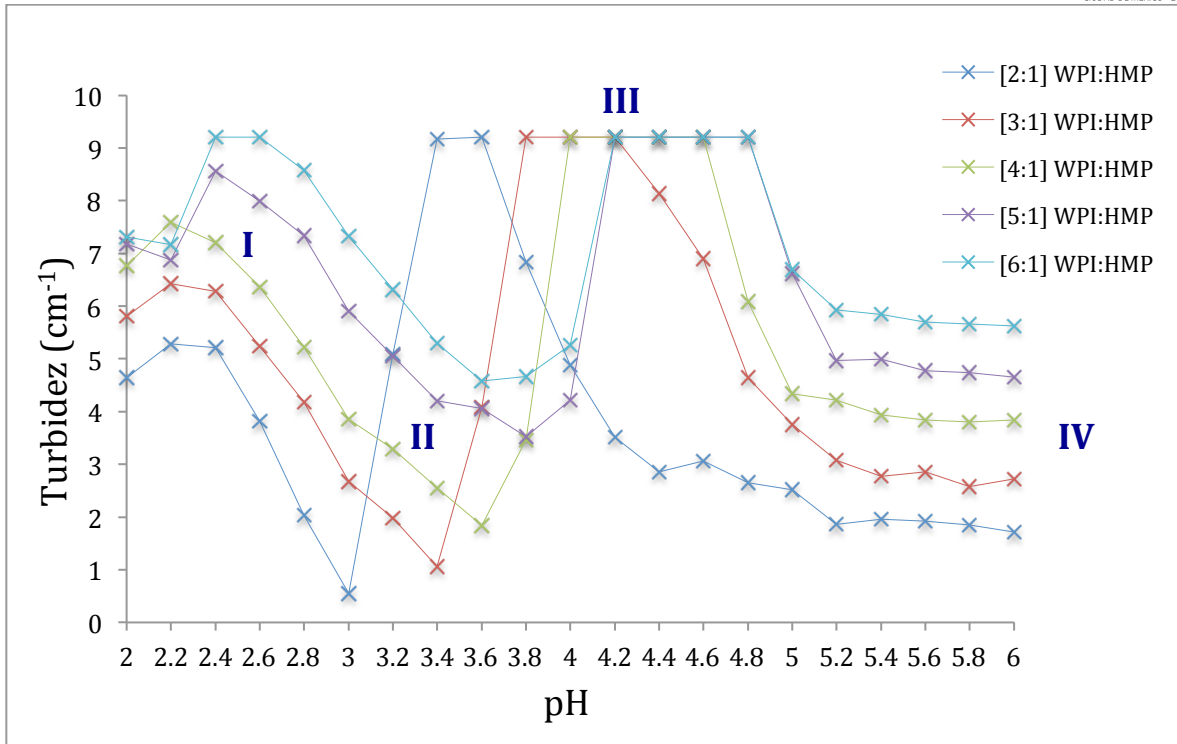


Figura 6 Turbidez en función al pH para distintas proporciones de WPI/HMP

Un ejemplo de las regiones descritas corresponden a las imágenes presentadas en la figura 7 para la proporción 4:1 WPI:HMP. En la región II (intervalo de pH de 2.4 a 3.8) se observa precipitado en los tubos debido a la formación de complejos insolubles; en la región III (intervalo de pH 4.0 a 4.6) se observa la máxima turbidez debido a la máxima formación de complejos solubles, y en las regiones I (intervalo de pH de 2.4 a 2.0) y IV (intervalo de pH de 4.8 a 6.0) se observa menos turbidez debido a la cosolubilidad de ambas moléculas (Hernández et al., 2013). Las imágenes de la figura 7 corresponden a la proporción 4:1 de WPI:HMP, ésta se seleccionó para la formulación de la emulsión múltiple ya que a la mitad de su meseta de interacción se encuentra el valor de pH ≈ 4.3 (promedio de pH de distintos tipos de yogur, figura 8).

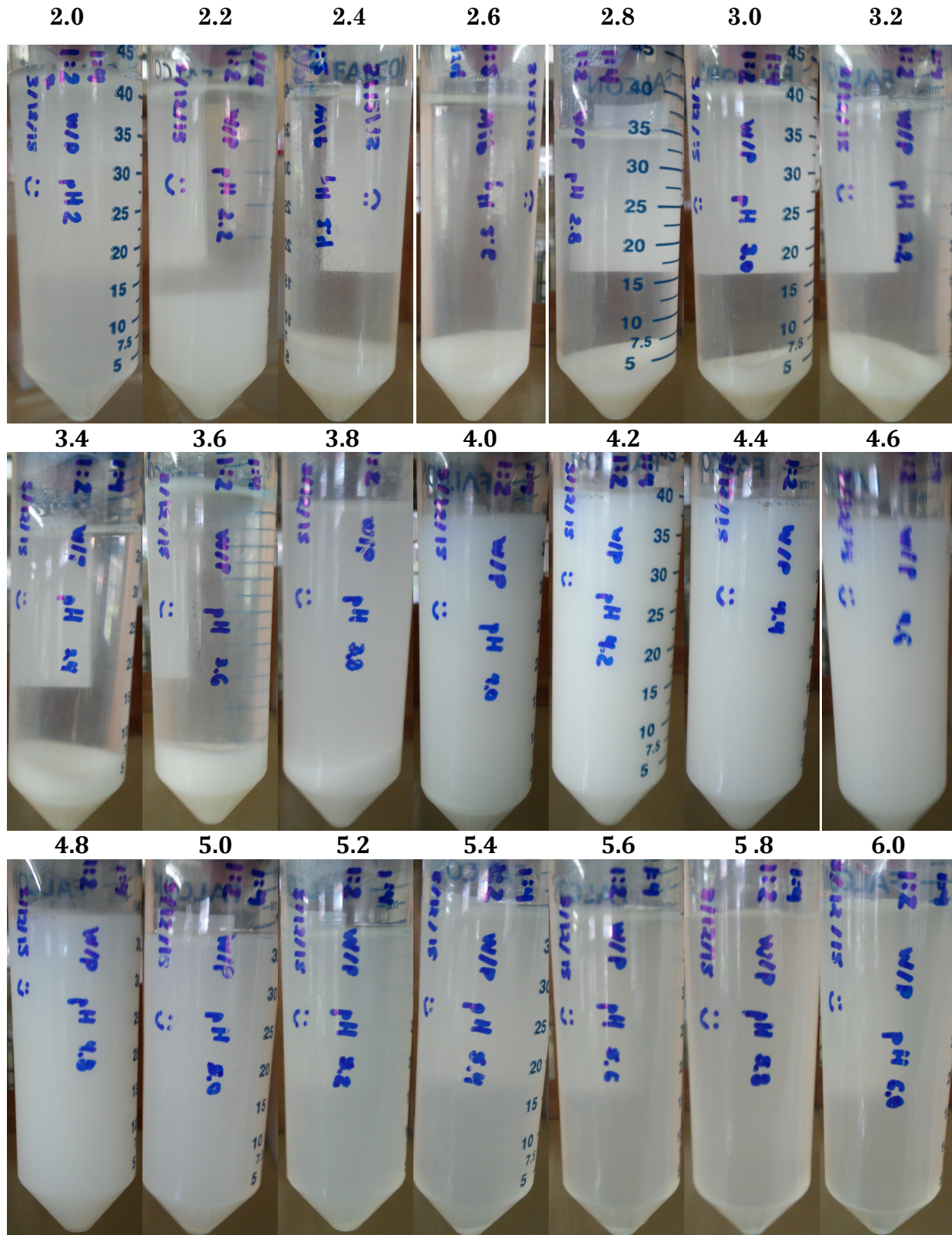


Figura 7 Imágenes de turbidez en función al pH para WPI:HMP (4:1)

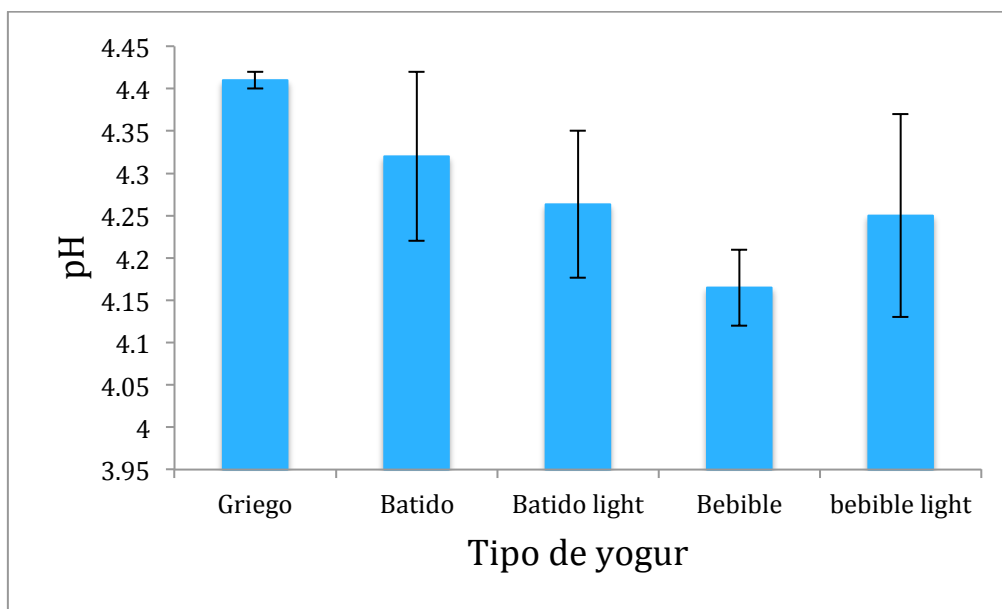


Figura 8 Valores promedio de pH de distintos tipos de yogur

Adicional a la medición de la turbidez donde se observaron las regiones de interacción para la formación de complejos de WPI-HMP, en la figura 9 se pueden apreciar los valores de potencial Z para ambas moléculas. La interacción de éstas se debe principalmente a las fuerzas electrostáticas; cuando el pH se encuentra entre 2.4-3.8 aproximadamente, se favorece la formación de complejos insolubles ya que se tiene una relación cuasi equidistante entre las cargas positivas de la proteína y las cargas negativas del polisacárido dándose una alta interacción que equilibra las cargas netas alcanzando la mínima solubilidad; por otro lado, la formación de complejos solubles se dio a valores de pH entre 4-4.8 aproximadamente, entre el punto isoeléctrico de la proteína (≈ 4.5); ligeramente debajo de éste donde las cargas positivas de la proteína son menores en comparación a las cargas negativas del polisacárido pero con suficientes interacciones para formar complejos solubles; y por arriba del punto isoeléctrico donde ambas moléculas presentan una carga neta negativa pero dándose la interacción del polisacárido con regiones positivas que quedan cargadas en la superficie de la proteína formando también complejos solubles (Hernández et al., 2013).

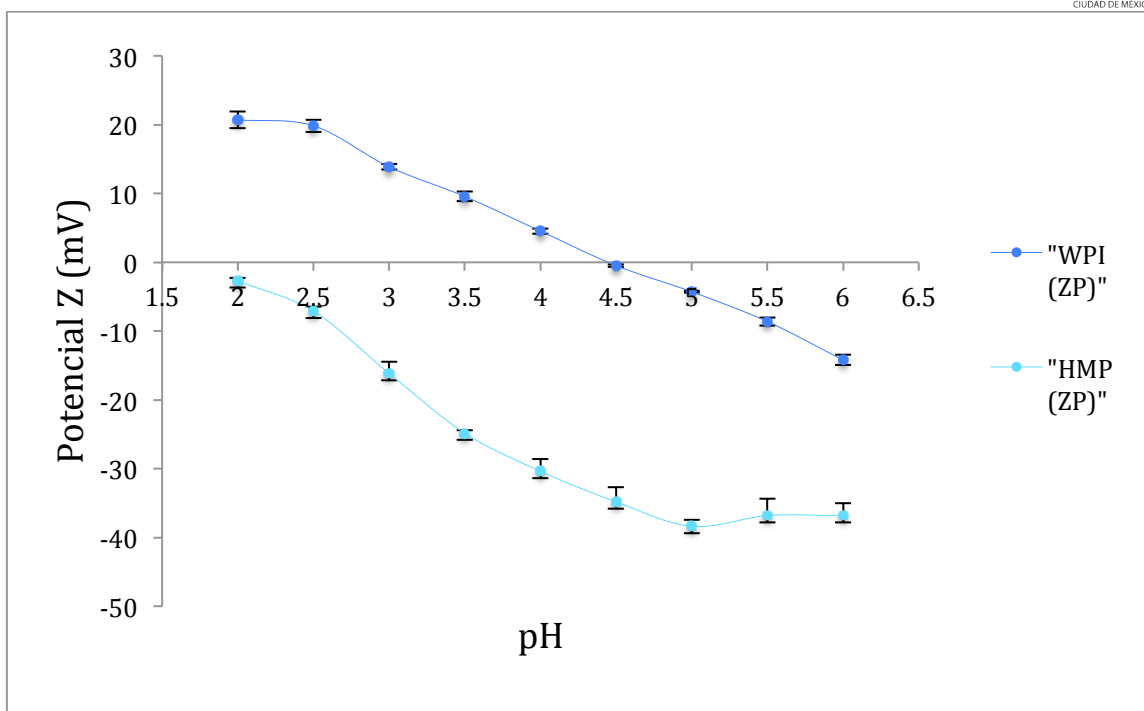


Figura 9 Potencial Z respecto al pH para WPI y HMP. Las barras de error representan la desviación estándar.

4.4 Efecto de la concentración de complejo soluble y emulsionante en la estabilidad de la emulsión múltiple.

En el experimento se midió como variable de respuesta el porcentaje de volumen de separación después de 21 días y se consideró que la emulsión fue más estable cuando el volumen de separación fue menor. Los datos se procesaron en un programa estadístico (Minitab17). En la figura 10 puede observarse un plano de superficie de respuesta del porcentaje de volumen de separación en función del (% p/p) de complejo y el (% p/p) de emulsionante; la superficie donde se tiene el menor volumen de precipitado es cuando la concentración de complejo soluble es mayor de 8% p/p de complejo y la de emulsionante, menor a 1% p/p. Adicional al plano de superficie de respuesta se puede observar en la figura 11 un plano de contorno, en la zona en la que el color azul es más intenso, que corresponde al menor porcentaje de volumen de separación, mientras que en la zona donde el verde es más intenso, implica que el volumen de separación fue mayor. Los niveles de 7.82 % p/p de complejo y

0.79 % p/p emulsionante fueron seleccionados para obtener el mínimo de volumen de separación, después de realizar una optimización con ayuda de Minitab.

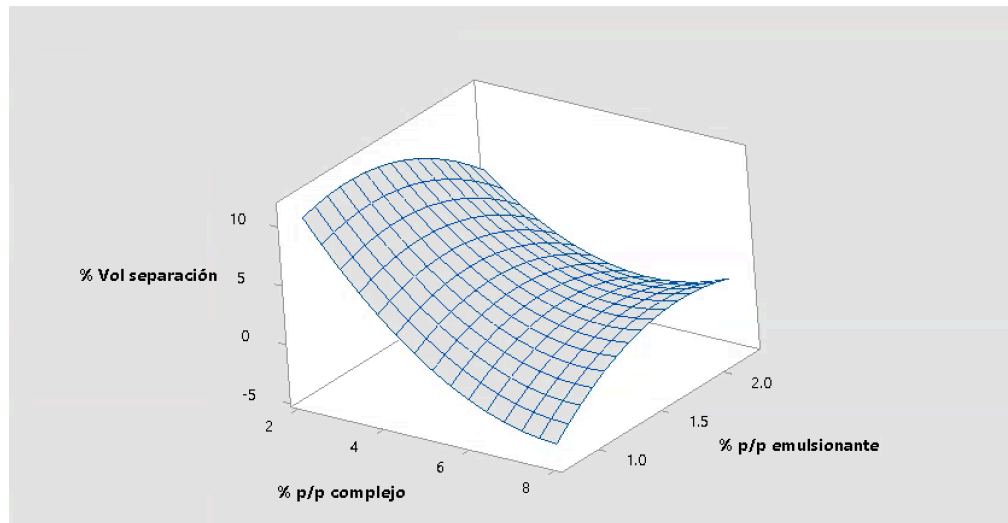


Figura 10 Superficie de respuesta de % Volumen de separación contra (% p/p) de complejo y (% p/p) de emulsionante

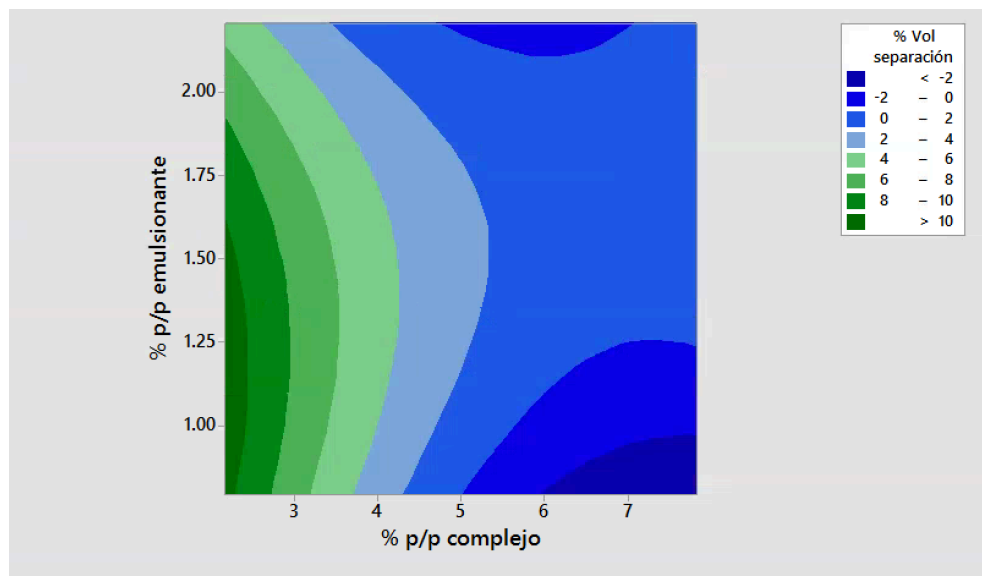


Figura 11 Superficie de contorno de % Volumen de separación contra (% p/p) de complejo y (% p/p) de emulsionante

4.5 Curvas de crecimiento de probióticos.

Para identificar el tiempo en donde se alcanza la fase logarítmica de crecimiento, se obtuvieron las curvas para *Bifidobacterium longum* y *Lactobacillus helveticus*, (figuras 12 y 13 respectivamente). Se puede observar que la fase exponencial de *B. longum* comienza a las 2 h y termina a las 8 h y para *L. helveticus* comienza a las 3 horas y termina a las 12 horas.

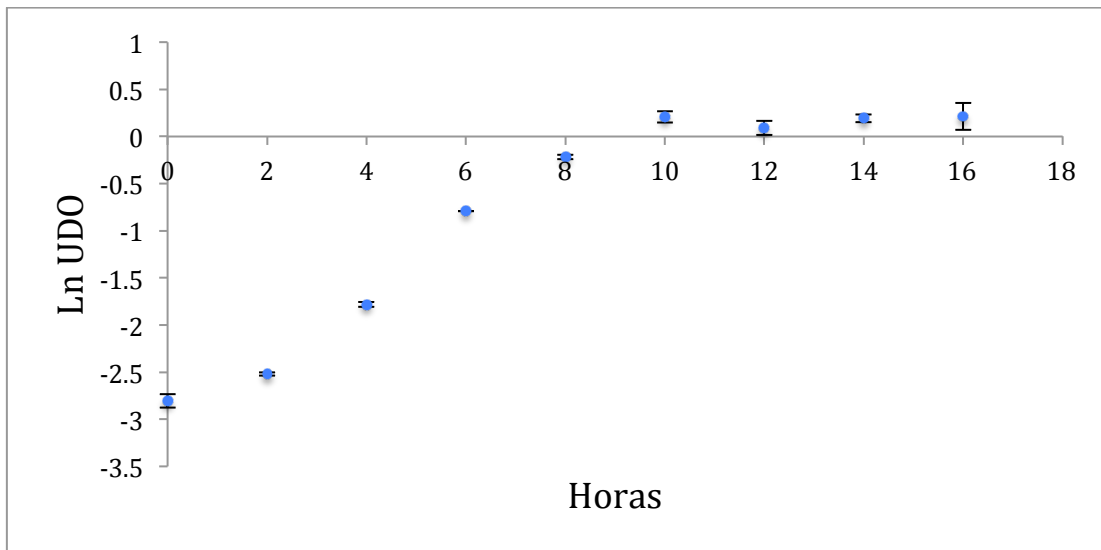


Figura 12 Curva crecimiento *Bifidobacterium longum* con desviación estándar

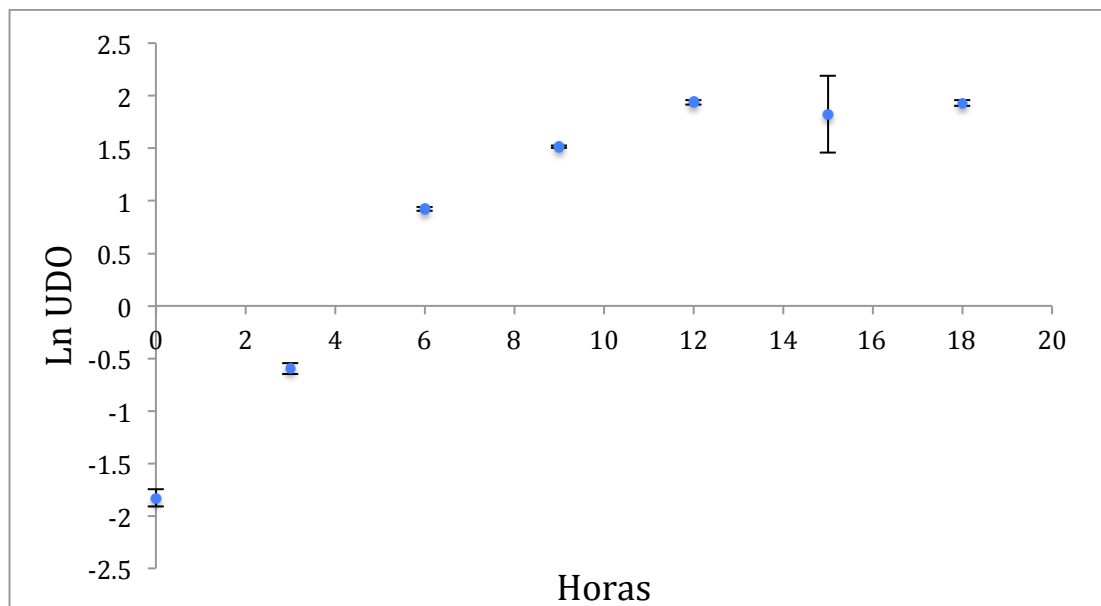


Figura 13 Curva crecimiento *Lactobacillus helveticus* con desviación estándar

4.6 Medición de la viscosidad aparente de varios tipos de yogur y de emulsión múltiple

Se determinó la viscosidad aparente de varios tipos de yogur y de la emulsión múltiple. En la figura 14 se muestran los valores para el yogur griego, los batidos (natural y natural light) y la emulsión; el yogur griego presenta el valor más alto de viscosidad, seguido de los yogures batidos, mientras que la emulsión tiene la menor viscosidad. Por otro lado, en la figura 15 se muestra la viscosidad de los yogures bebibles (natural y natural light) y la emulsión, nótese que se presentan dos gráficas distintas porque los parámetros de medición difieren en el tipo de aguja empleada en el viscosímetro, en esta figura se puede observar que el valor para la emulsión se encuentra entre los de viscosidad de ambos yogures, por debajo del light y mayor al valor de viscosidad del bebible natural. De los tipos de yogur caracterizados se seleccionó el yogur batido natural para usarse en el sistema yogur-emulsión múltiple, aunque el yogur batido presentó un valor de viscosidad alto en comparación a la viscosidad de la emulsión; por otro lado, no cuenta con la adición de estabilizantes y edulcorantes, de los cuales quería descartarse el efecto sobre la estabilidad del sistema.

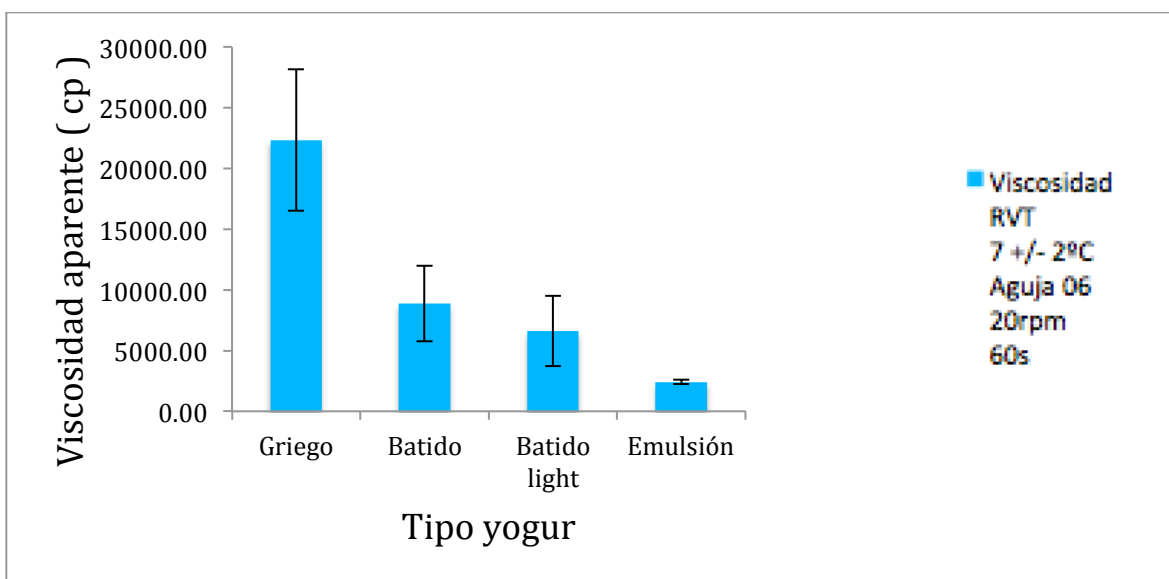


Figura 14 Viscosidad aparente de varios tipos de yogur y emulsión múltiple.

Las barras de error representan la desviación estándar.

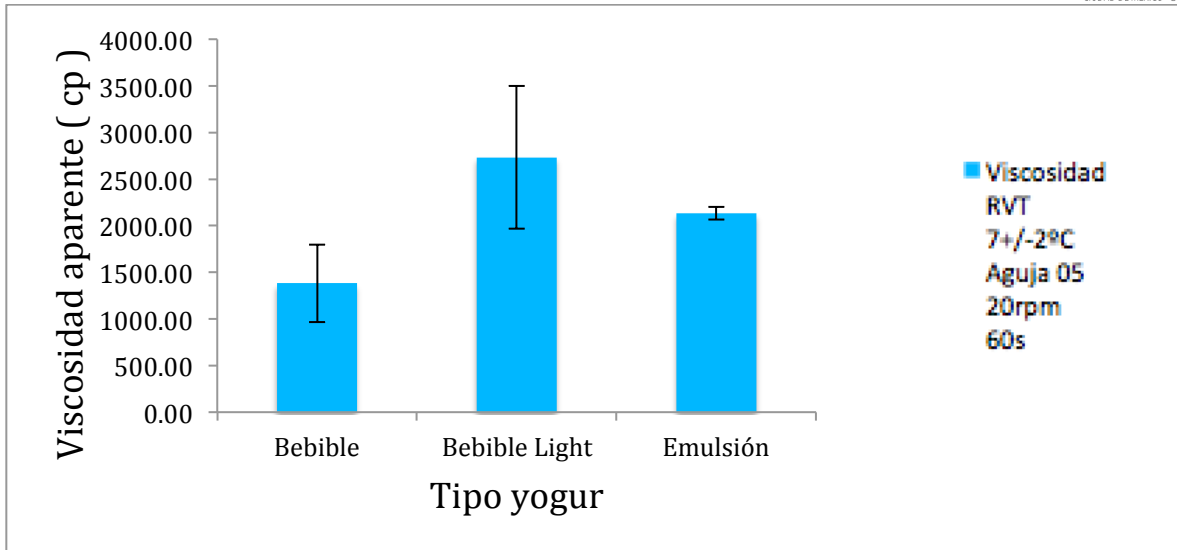


Figura 15 Viscosidad aparente de varios tipos de yogur y emulsión múltiple. Las barras de error representan la desviación estándar.

4.7 Caracterización reológica de sistemas: emulsión múltiple, yogur y emulsión múltiple con yogur

Se obtuvieron curvas de flujo para los sistemas yogur, emulsión múltiple, emulsión múltiple + probióticos, emulsión múltiple + yogur y emulsión múltiple + probióticos + yogur. En la figura 16 se puede apreciar la curva de flujo del yogur con sus 4 segmentos respectivos, en el último segmento se puede corroborar que el sistema alcanzó el equilibrio. Se determinó el comportamiento reológico en el equilibrio y se utilizó el modelo de Oswald de Waele o ley de la potencia: $\tau = ky^n$, donde τ es el esfuerzo de cizalla, y la velocidad de cizalla, k el índice de consistencia y n el índice de comportamiento. En el cuadro 8 se pueden apreciar los valores promedio de los parámetros reológicos (k y n) para todos los sistemas en cada día de medición.

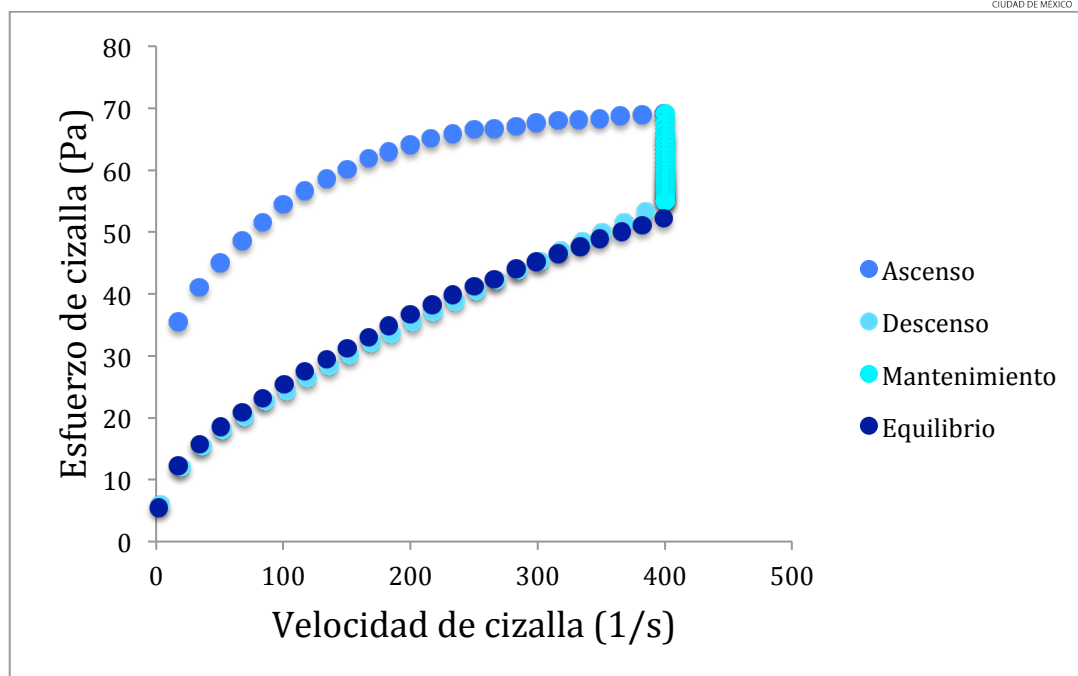


Figura 16 Curva de flujo del sistema yogur Y

Cuadro 8 Índice de consistencia (k) e índice de comportamiento (n)

Sistema	Día 1		Día 7		Día 14		Día 21	
	k	n	k	n	k	n	k	n
Y*	2.7130	0.4843	3.1896	0.46445	3.3657	0.4614	3.1309	0.4597
EM	1.2728	0.6816	1.0630	0.6887	1.0759	0.6889	0.5126	0.7335
EM+P	1.7515	0.6523	1.3561	0.6259	0.4360	0.7979	0.0210	0.7356
EM+Y	1.8435	0.5496	1.9731	0.5363	1.8445	0.5471	1.7643	0.5494
EM+P+Y	1.9448	0.5470	1.9754	0.5435	2.0547	0.5389	1.8753	0.5466

- yogur (Y), emulsión múltiple (EM), probióticos (P).

Se realizó un análisis de varianza unidireccional para cada sistema del efecto de los días de almacenamiento sobre el índice de consistencia (k) y se compararon las medias por método de Tukey con una confianza de 95%. Lo anterior se procesó en un programa estadístico (minitab17). Los resultados se muestran en los cuadros 9, 10, 11, 12 y 13.

Cuadro 9 Efecto de los días de almacenamiento en índice de consistencia (k)
para el sistema yogur

Día	N	Media
14	2	3.37 _a
7	2	3.19 _a
21	2	3.13 _a
1	2	2.71 _a

Comparación de medias $\alpha=0.05\%$

Cuadro 10 Efecto de los días de almacenamiento en índice de consistencia (k)
para el sistema emulsión múltiple

Día	N	Media
1	2	1.27 _a
14	2	1.08 _{a b}
7	2	1.06 _{a b}
21	2	0.51 _b

Comparación de medias $\alpha=0.05\%$

Cuadro 11 Efecto de los días de almacenamiento en índice de consistencia (k)
para el sistema emulsión múltiple + probióticos

Día	N	Media
1	2	1.75 _a
7	2	1.36 _a
14	2	0.44 _b
21	2	0.21 _b

Comparación de medias $\alpha=0.05\%$

Cuadro 12 Efecto de los días de almacenamiento en índice de consistencia (k) para el sistema emulsión múltiple + yogur

Día	N	Media
7	2	1.97 _a
14	2	1.84 _a
1	2	1.84 _a
21	2	1.76 _a

Comparación de medias $\alpha=0.05\%$

Cuadro 13 Efecto de los días de almacenamiento en índice de consistencia (k) para el sistema emulsión múltiple + probióticos + yogur

Día	N	Media
14	2	2.06 _a
7	2	1.98 _a
1	2	1.95 _a
21	2	1.88 _a

Comparación de medias $\alpha=0.05\%$

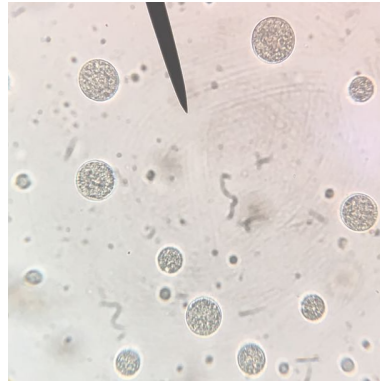
De las comparaciones de medias se puede observar que existió un cambio significativo en el índice de consistencia (k) tanto para la emulsión múltiple como para la emulsión múltiple + probióticos, cuadro 10 y 11; en el caso de la emulsión, ésta presentó una disminución significativa en el índice de consistencia a partir del día 14 de almacenamiento mientras que para la emulsión + probióticos, la disminución se presentó a partir del día 7. Podría decirse que la emulsión múltiple y la emulsión múltiple + probióticos según el cambio en el índice de consistencia (k), presentaron inestabilidad aproximadamente a partir del día 14 y día 7, respectivamente. Sin embargo, los sistemas que tienen yogur, en este caso el yogur solo, la emulsión + yogur y la emulsión + probióticos + yogur, no presentaron cambios significativos en el índice de consistencia; los sistemas se mantuvieron estables a los 21 días de almacenamiento. Lo anterior, podría atribuirse a la estructura de gel débil del

yogur, la cuál podría brindarle estabilidad a la emulsión múltiple con y sin probióticos. Con estos resultados podría afirmarse que el sistema yogur-emulsión múltiple fue compatible y no existieron cambios significativos en los parámetros reológicos durante los 21 días de almacenamiento y por lo tanto, no hubo cambios en la textura del sistema, lo cual permite suponer que sería imperceptible un cambio en la textura del producto para los consumidores.

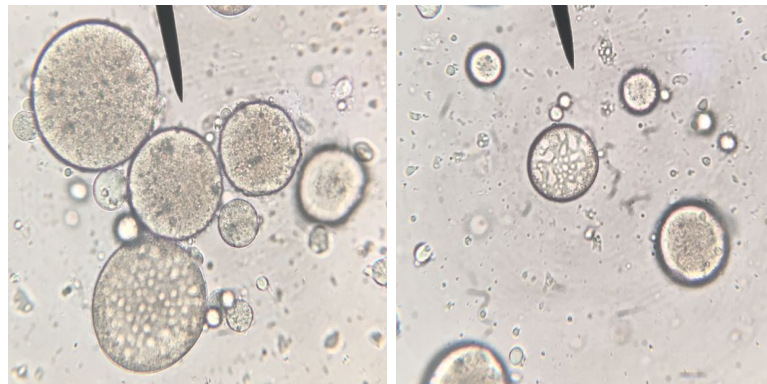
4.8 Simulación gastrointestinal *in vitro*

En la figura 17 se observan micrografías de la emulsión múltiple después de la simulación gastrointestinal. Se puede observar la coalescencia y el aumento de tamaño de las gotas de la emulsión para fluidos con sales y fluidos con sales más enzimas y bilis, lo cual podría atribuirse a los cambios de pH y la fuerza iónica de los fluidos. Además, se observa rotura de las gotas y componentes libres en mayor medida para la emulsión que fue sometida a fluidos con sales y otros componentes, el rompimiento de las gotas supone un efecto importante de la actividad enzimática y las sales biliares sobre la estabilidad de las mismas. En la figura 18 se muestran imágenes de la simulación gastrointestinal de la emulsión después de cada sitio del TGI, para fluidos que contenían enzimas y sales biliares.

I



II



III

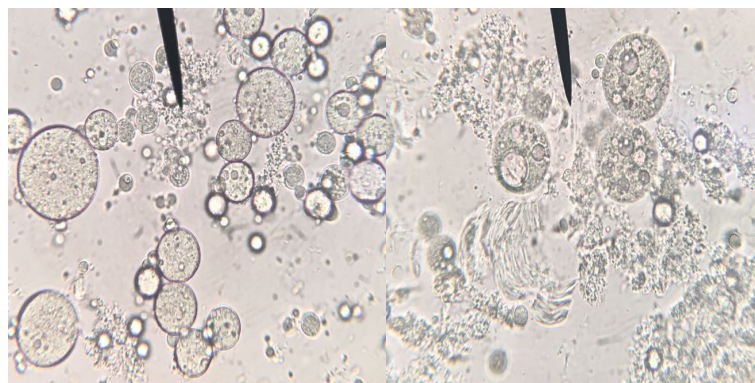


Figura 17 Micrografías de emulsión múltiple (resolución 100x). I) Antes de simulación gastrointestinal . II) Final simulación gastrointestinal para fluidos con sales. III) Final simulación gastrointestinal para fluidos con sales y enzimas.

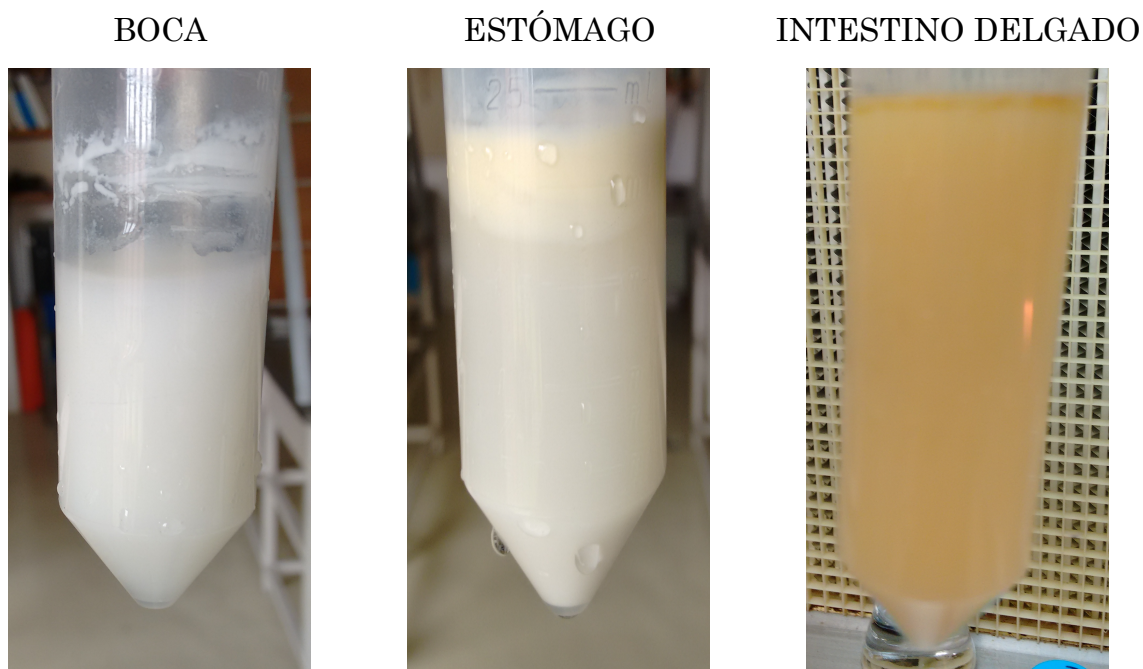


Figura 18 Imágenes de simulación gastrointestinal de emulsión múltiple al término de cada sitio del TGI con adición de enzimas y sales biliares.

Al final de la fase gástrica simulada se observa separación de fases, presentado cremado de los glóbulos de la emulsión; debido tal vez al pH bajo y las interacciones moleculares que se presentan en esta fase. Al final de la fase simulada del intestino delgado se observa una capa de sobrenadante de aceite, lo cual corrobora las micrografías del final de la simulación donde se presentó rompimiento de algunos glóbulos de la emulsión y material liberado.

Al inicio y final de la simulación *in vitro* se realizó conteo de unidades formadoras de colonia UFC para el yogur, la emulsión y el yogur + emulsión. En la figura 19 se presentan las UFC/ mL al inicio de cada sistema y después de la digestión. Se puede observar que en el yogur no hubo supervivencia de los microorganismos, mientras que en la emulsión y el yogur + emulsión si la hay; la presencia de UFC en el yogur + emulsión después de la digestión simulada puede atribuirse a los probióticos que estaban encapsulados en la emulsión; por lo que podría decirse que la mezcla probiótica sobrevivió a las condiciones

simuladas del TGI debido a la protección de la emulsión múltiple. La cantidad de microorganismos supervivientes fue de 5.6×10^6 para la emulsión y de 3.0×10^6 para el yogur + emulsión, cantidades recomendadas para que los probióticos pudieran tener efectos benéficos en el huésped.

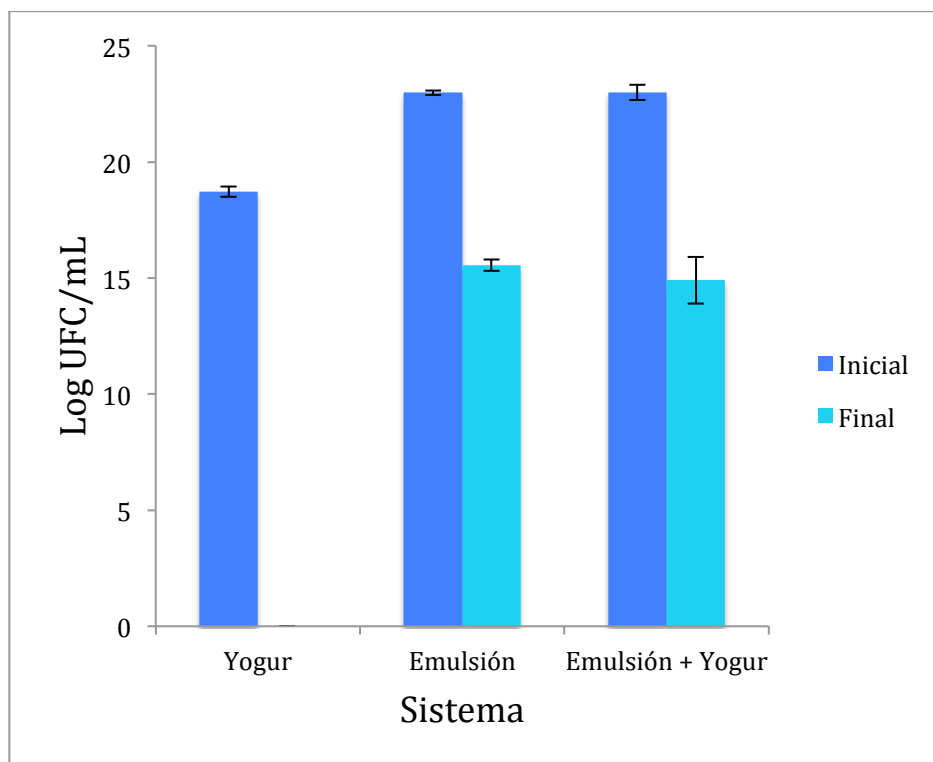


Figura 19 Gráfica del logaritmo de unidades formadoras de colonia UFC/mL para el yogur, emulsión y emulsión con yogur antes y después de simulación del TGI.

Capítulo 5. Conclusiones

A partir de los resultados de esta experimentación se determinó que:

Un gel con una concentración de 1% p/p de pectina de bajo metoxilo y una concentración de cloruro de calcio de 3.5 mM es el adecuado para formar la fase acuosa W_1 de la emulsión simple.

Se estimó que con un porcentaje de 12% p/p de emulsionantes PGPR y Panodan, en una proporción de 4:1, con una velocidad de homogenización de 9000 rpm, por un tiempo de 12 minutos y con una fracción másica de 0.3 de gel, se produce la emulsión simple W_1/O más estable.

Se determinó que a valores de pH entre 4 y 4.6 se tenía la máxima formación de complejos solubles para una proporción 4:1 de WPI:HMP.

La emulsión múltiple con mayor estabilidad se estimó con un porcentaje de 7.82 % p/p de complejo WPI/HMP y 0.79 % p/p de Panodan, preparada a una velocidad de homogenización de 8000 rpm por un tiempo de 10 minutos y con una fracción másica de 0.2 de emulsión simple.

Se identificó que la fase de crecimiento exponencial de *Lactobacillus helveticus* comenzó a las 3 horas y terminó a las 12 horas. Mientras que para *Bifidobacterium longum* comenzó a las 2 horas y terminó a las 8 horas.

Se diseñó una emulsión múltiple agua-en-aceite-en-agua compatible con un yogur. Donde el yogur le proporcionó estabilidad a la emulsión al no mostrar cambios significativos en su índice de consistencia durante 21 días.

Los probióticos encapsulados en la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$ sobrevivieron a las condiciones gastrointestinales *in vitro* y en cantidades adecuadas para proporcionar efectos benéficos en el huésped. Comprobando que la emulsión múltiple brindó la protección adecuada a los probióticos contra las condiciones simuladas del TGI.

Glosario

Ansiolítico: que actúa sobre el sistema nervioso y reduce los síntomas de ansiedad.

Barrera epitelial: Una función central de los epitelios es formar barreras que separen los compartimentos tisulares dentro de organismos complejos. Estas barreras también separan el medio interno del ambiente externo y son, por lo tanto, un componente esencial de la defensa del huésped.

Bioaccesibilidad: fracción del componente ingerido liberado de la matriz alimenticia y disponible para absorción intestinal (normalmente basado en procedimientos in vitro).

Biodisponibilidad: fracción del componente ingerido disponible para su utilización en funciones fisiológicas normales (determinado mediante ensayos in vivo).

Capacidad de carga: es la medida de la masa del componente encapsulado por unidad de masa de material de soporte.

Compuesto biactivo: son compuestos esenciales y no esenciales (por ejemplo, vitaminas o polifenoles) que se producen en la naturaleza, son parte de la cadena alimentaria y pueden tener un efecto sobre la salud humana.

Eficiencia de carga: es una medida de la capacidad del sistema para retener el componente encapsulado en el tiempo.

Eficiencia de entrega: es la cantidad de componente encapsulado que se libera del sistema en el sitio de acción.

Eje intestino-cerebro: sistema de comunicación bidireccional entre el sistema gastrointestinal y el sistema nervioso central.

Emulsión múltiple $W_1/O/W_2$: consisten en pequeñas gotas de agua contenidas dentro de gotas de aceite más grandes, las cuales se encuentran dispersas en una fase acuosa continua.

Emulsionante: molécula anfifílicas que se localiza en la línea de contacto entre las fases reduciendo la tensión interfacial.

Fracción de fase dispersa: La fracción de la fase dispersa se conoce con la letra griega ϕ y puede expresarse como fracción volumétrica o fracción másica. Es la relación entre el volumen o masa de la fase dispersa que se añade al volumen o masa total de la emulsión.

Grado alimenticio (GRAS): "GRAS" es un acrónimo de la frase Generally Recognized As Safe. En virtud de las secciones 201 y 409 de la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos, cualquier sustancia que se agregue intencionalmente a los alimentos es un aditivo alimentario sujeto a revisión y aprobación previa a la FDA.

Homeostasis: Mantenimiento de condiciones casi constantes en el entorno interno del cuerpo humano.

Inmunoglobulina A secretora: La inmunoglobulina A (IgA), constituye aproximadamente 15% de las inmunoglobulinas séricas y predomina en su forma secretora (IgAs) en la saliva, lagrimas, sudor, secreciones bronquiales e intestinales, leche humana y calostro. El principal papel de la inmunoglobulina A secretora es contribuir a la inmunidad de las mucosas y se postula que inhibe la adherencia de microorganismos a las células de éstas, participan en la neutralización de virus y son capaces de combinarse con antígenos de los alimentos evitando su absorción hacia el torrente sanguíneo, reduciendo la incidencia de reacciones alérgicas.

Mecanismo de entrega: Proceso mediante el cual el sistema de entrega liberará el componente encapsulado en determinado sitio del tracto gastrointestinal.

Metagenoma: se define como la colección de genomas y genes de los miembros de la microbiota.

Microbioma: se refiere a la totalidad del hábitat del cuerpo humano, incluyendo los microorganismos, sus genomas y las condiciones ambientales que los rodean, es decir, los factores bióticos y abióticos de los ambientes del cuerpo humano.

Microbiota: se refiere a la totalidad de microorganismos presentes en un ambiente o hábitat particular. De manera específica en el ser humano se define como la cantidad de microorganismos que residen en las superficies de su cuerpo, tanto internas como las expuestas.

Modelos dinámicos: generalmente son controlados por computadora y reproducen la temperatura, los cambios de pH en los compartimentos, la adición de enzimas y sales biliares. Los modelos dinámicos incluyen parámetros específicos, como la velocidad de vaciado del estómago o el tiempo de tránsito gastrointestinal.

Modelos estáticos: se caracterizan porque no reproducen los procesos dinámicos que ocurren durante la digestión humana, tales como el vaciado gástrico o cambios continuos en el pH y las tasas de flujo de secreción. Estos modelos estáticos son los sistemas digestivos más utilizados.

Modelo de caja de huevo: La pectina forma geles cuando las estructuras de homogalacturanos se entrecruzan mediante enlaces para formar una red continua tridimensional en la que el agua y diversos solutos quedan atrapados. Específicamente, la pectina de bajo metoxilo puede formar geles en presencia de cationes divalentes, induciendo la asociación de cadena-cadena mediante enlaces iónicos entre los iones calcio y los grupos hidroxilo libres. La formación de estas zonas de unión puede ser explicado por el modelo de “caja de huevo”, en el cual se da una doble conformación helicoidal entre dos cadenas de ácido poligalacturónico, dándose primeramente la formación de dímeros con el catión en el centro y posteriormente la agregación de estos dímeros. Aun así se ha sugerido la existencia de una conformación helicoidal triple, que en el caso de la pectina, la asociación más favorable para la formación de geles se describe mejor por una “caja de huevo desplazada” ya que una cadena se encuentra ligeramente desplazada con respecto a la otra, y las cajas se estabilizan por fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas. Aun así, el modelo de “caja de huevo” propuesto originalmente por Grant y colaboradores en 1973 es ampliamente aceptado para los geles de pectina.

Pectina: La pectina es un polisacárido rico en ácido galacturónico, el principal uso se basa en su capacidad como agente estabilizante, espesante y gelificante. En la actualidad se reconocen tres estructuras pécticas básicas en la pectina: el homogalacturano que es un polímero de cadena lineal que consiste en residuos de ácido D-galacturónico unidos por enlaces α -(1,4); el ramnogalacturonano I que consiste en la repetición del disacárido formado por una unidad de ácido D-galacturónico y otra de ramnosa, a la cual se encuentran unidos principalmente arabinano y galactano y, el ramnogalacturano II que consiste en una cadena principal de aproximadamente nueve homogalacturanos, con complejas cadenas laterales, que contienen hasta once diferentes monosacáricos, que están unidos a los residuos de ácido galacturónico.

Prebiótico: Los prebióticos se han caracterizado como un grupo de carbohidratos que resiste la digestión y la absorción en el intestino delgado. Afectan de manera beneficiosa al huésped ya que son fermentados por la microbiota intestinal en el intestino grueso; estimulando el crecimiento y la actividad de la misma.

Probiótico: Se definen como microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del huésped.

Protección contra la degradación química: el sistema de entrega deberá brindar la protección necesaria al componente encapsulado contra los mecanismos de degradación química que se producen durante el almacenamiento.

Proteína de aislado de suero de leche: el suero de leche se obtiene de la industria de quesos. El aislado de proteína de suero de leche WPI (por sus siglas en inglés) consiste en una mezcla de proteínas globulares que incluye principalmente: β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, albúmina sérica bovina e inmunoglobulina.

Sales biliares: son detergentes esteroidales biosintetizados a partir del colesterol en el hígado y almacenados en la vesícula biliar. Las sales biliares no tienen grupos bien definidos de cola y cabeza, pero presentan una polaridad

planar. Los ácidos biliares comprenden dos unidades de unión, un esqueleto de esteroide rígido con una cara hidrófoba y una cara hidrófila a la que está unida una cola alifática flexible. La bilis se secreta a través del conducto biliar en el intestino bajo la influencia de una serie de mecanismos de control relacionados con las hormonas gastrointestinales. Juegan un papel crucial en la digestión y absorción de nutrientes y también sirven como un medio para la excreción de varios productos de desecho de la sangre.

Repulsión estérica: se debe a las cadenas flexibles que contienen ciertas moléculas, ya que dichas cadenas sobresalen en la fase continua. Dos mecanismos pueden distinguirse. Primero, si la superficie de otra partícula se acerca, las cadenas quedan restringidas en las conformaciones que pueden asumir, lo que implica pérdida de entropía, por lo tanto se da el aumento de la energía libre, y se produce repulsión. Este efecto de restricción de volumen puede ser muy grande, pero sólo puede tener importancia si las superficies tienen una densidad de cadenas muy baja. Esto es porque las capas peludas comienzan a solaparse conforme las partículas se acercan y entonces un segundo mecanismo actuará antes de que el primero entre en juego. La superposición provoca un aumento en la concentración de cadenas sobresalientes y con ello se incrementa la presión osmótica; esto provoca entonces que el agua se mueva a la región de superposición, lo que da lugar a la repulsión. Sin embargo, esto sólo se cumple si la fase continua es un buen solvente para las cadenas.

Síndrome metabólico: El síndrome metabólico se define como la concurrencia de factores de riesgo cardiovascular asociados a la obesidad, incluyendo obesidad abdominal, tolerancia a la glucosa alterada, hipertrigliceridemia, disminución del colesterol HDL e hipertensión.

Sistema nervioso autónomo (sistema nervioso involuntario): la parte del sistema nervioso que controla los músculos de los órganos internos (como el corazón) y las glándulas. Una parte del sistema nervioso autónomo ayuda al cuerpo a descansar, relajarse y digerir los alimentos y otra parte ayuda a una persona a luchar o tomar acciones en una emergencia.

Sistema nervioso central: el sistema nervioso tiene dos partes, llamadas el sistema nervioso central y el sistema nervioso periférico debido a su ubicación en el cuerpo. el sistema nervioso central (SNC) incluye los nervios del cerebro y la médula espinal. Se encuentra dentro del cráneo y canal vertebral de la columna vertebral, los cuales lo protegen.

Sistema nervioso entérico: un sistema de malla de neuronas que gobierna la función del sistema gastrointestinal.

Vago: un nervio que suministra fibras nerviosas a la faringe (garganta), laringe (caja vocal), tráquea, pulmones, corazón, esófago y tracto intestinal, hasta la porción transversal del colon. El nervio vago también trae información sensorial al cerebro desde el oído, la lengua, la faringe y la laringe. El nervio vago es el décimo nervio craneal. Se origina en el bulbo raquídeo, una parte del tronco encefálico, y se extiende camino desde el tronco encefálico hasta el colon.

Bibliografía

Arseneault-Bréard, J., Rondeau, I., Gilbert, K., Girard, S., Tompkins, T., Godbout, R. y Rousseau, G. (2012). Combination of *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175 reduces post-myocardial infarction depression symptoms and restores intestinal permeability in a rat model. *British Journal of Nutrition*, 107, 1793–1799. doi:10.1017/S0007114511005137.

Basak, R. y Bandyopadhyay, R. (2014). Formation and Rupture of Ca²⁺ Induced Pectin Biopolymer Gels.

Bercik, P., Collins, S. y Verdu, E. Microbes and the gut-brain axis. (2012). *Neurogastroenterology & Motility*, 24, 405–413. doi:10.1111/j.1365-2982.2012.01906.x.

Bonnet, M., Cansell, M., Berkaoui, A., Ropers, M., Anton, M. y Leal, F. (2009). Release rate profiles of magnesium from multiple W/O/W emulsions. *Food Hydrocolloids*, 23, 92–101. doi:10.1016/j.foodhyd.2007.11.016.

Braccini, I. y Pérez, S. (2001). Molecular basis of Ca²⁺ -Induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited. *Biomacromolecules*, 2, 1089-1096.

Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M. y Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104, 467–483. doi:10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031.

Chávarri, M., Marañón, I., y Villarán, M. (2012). Encapsulation technology to protect probiotic bacteria. Intech, Chapter 23. Immunology and Microbiology. "Probiotics", book edited by Everlon Cid. Rigobelo, ISBN 978-953-51-0776-7, Published: October 3, 2012 under CC BY. doi:10.5772/50046.

de Vos, P., Faas, M., Spasojevic, M. y Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20, 292–302. doi:10.1016/j.idairyj.2009.11.008.

Dobies, M., Kusmia, S. y Jurga, S. (2005). H NMR and rheological studies of the calcium induced gelation process in aqueous low methoxyl pectin solutions. *Acta Physica Polonica A*, Vol. 108, No. 1, 33-46.

Egger, L., Ménard, O., Delgado, C., Alvito, P., Assunção, R., Balance, S., Barberá, R., Brodkorb, A., Cattenoz, T., Clemente, A., Comi, I., Dupont, D., Garcia, G., Lagarda, M., Le Feunteun, S., JanssenDuijghuijsen, L., Karakaya, S., Lesmes, U., Mackie, A., Martins, C., Meynier, A., Miralles, B., Murray, B., Pihlanto, A., Picariello, G., Santos, C., Simsek, S., Recio, I., Rigby, N., Rioux, L., Stoffers, H., Tavares, A., Tavares, L., Turgeon, S., Ulleberg, E., Vegarud, G., Vergères, G., y Portmann, R. (2016). The harmonized INFOGEST in vitro digestion method: From knowledge to action. *Food Research International* 88, 217–225. doi:10.1016/j.foodres.2015.12.006.

Eslami, P., Davarpanah, L. y Vahabzadeh, F. (2016). Encapsulating role of β -cyclodextrin in formation of Pickering water-in-oil-in-water (W1/O/W2) double emulsions containing *Lactobacillus dellbrueckii*. *Food Hydrocolloids*. doi: 0.1016/j.foodhyd.2016.10.035.

Fechner, A., Knoth, A., Scherze, I. y Muschiolik, G. (2007). Stability and release properties of double-emulsions stabilised by caseinate–dextran conjugates. *Food Hydrocolloids*, 21, 943–952. doi:10.1016/j.foodhyd.2006.10.021.

Flynn, G. (2011). Digestive system with liver, EUA. Recuperado de: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Digestive_system_with_liver.png.

Foster, J. y McVey, K. (2013). Gut–brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends in Neurosciences*, 969, 1-8. doi:10.1016/j.tins.2013.01.005.

Foxman, B., Goldberg, D., Murdock, C., Xi, C. y Gilsdorf, J. (2008). Conceptualizing human microbiota: from multicelled organ to ecological community. *Hindawi Publishing Corporation Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, Volume 2008, Article ID 613979, 5 pages. doi:10.1155/2008/613979.

Fraeye, I., Colle, I., Vandevenne, E., Duvetter, T., Van Buggenhout, S., Moldenaers, P., Van Loey, A. y Hendrickx, M. (2010). Influence of pectin structure on texture of pectin–calcium gels. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11, 401–409. doi:10.1016/j.ifset.2009.08.015.

Fraeye, I., Duvetter, T., Dounsla, E., Van Loey, A. y Hendrickx, M. (2010-A). Fine-tuning the properties of pectin - calcium gels by control of pectin fine structure, gel composition and environmental conditions. *Trends in Food Science & Technology* 21, 219-228. doi:10.1016/j.tifs.2010.02.001.

Grant, G., Morris, E., Rees, D., Smith, P. y Thom, D. (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *Febs letters*, Vol. 32, number 1, 195-198.

Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S. y Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology*. November, Vol. 30, No. 11, 591-600. doi:10.1016/j.tibtech.2012.08.001.

Hattrem, M., Dille, M., Seternes, T. y Draget, K. (2014). Macro- vs. micromolecular stabilisation of W/O/W-emulsions. *Food Hydrocolloids*, 37, 77-85. doi:10.1016/j.foodhyd.2013.10.024.

Hernández, N., Lobato, C. y Vernon, E. (2013). Stability and rheology of water-in-oil-in-water multiple emulsions made with protein-polysaccharide soluble complexes. *Journal of Food Engineering*, 119, 181–187. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.05.039.

Hur, S. y McClements, J. (2009). Influence of initial emulsifier type on microstructural changes occurring in emulsified lipids during in vitro digestion. *Food Chemistry*, 114, 253–262. doi:10.1016/j.foodchem.2008.09.069.

Hur, S., Lim, B., Decker, E. y McClements, J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125, 1–12. doi:10.1016/j.foodchem.2010.08.036.

Icaza, M. (2012). Microbiota intestinal en salud y enfermedad (2012). *Revista de Gastroenterología de México*, 77 (Suplemento 1), 23-25. doi:10.1016/j.rgmx.2012.07.010.

Iqbal, S., Baloch, M., Hameed, G. y McClements, J. (2013). Controlling W/O/W multiple emulsion microstructure by osmotic swelling and internal protein gelation. *Food Research International* 54, 1613–1620. doi:10.1016/j.foodres.2013.09.035.

Jiménez, F. (2013). Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. *Food Research International*, 52, 64–74. doi:10.1016/j.foodres.2013.02.040

Jiménez, F. (2013-A). Emulsiones múltiples; compuestos bioactivos y alimentos funcionales. *Nutrición Hospitalaria*, 28 (5), 1413-1421. doi: 10.3305/nh.2013.28.5.6673.

Juárez, A. y Jiménez, M. (2013). Condiciones gastrointestinales modelo utilizadas para evaluar probióticos encapsulados. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 7 – 2, 15-24.

Kong, F. y Singh, R. (2008). Disintegration of Solid Foods in Human Stomach. *Journal of Food Science*. Vol. 73, Nr. 5, 67-80. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00766.x.

Kosegarten, C. y Jiménez, M. (2012). Factores principales que intervienen en la estabilidad de una emulsión doble. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6 – 2, 1 – 18.

Leal, F., F. Thivilliers, F. y Schmitt, V. (2007). Structured emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 12, 206–212. doi:10.1016/j.cocis.2007.07.003.

Leal, F., Homer, S., Goh, A. y Lundin, L. (2012). W/O/W emulsions with high internal droplet volume fraction. *Food Hydrocolloids*, 27, 30-41. doi:10.1016/j.foodhyd.2011.09.004.

Lee, J-S., Lee J-Y., Chung M., y Hur S. (2016). Development of novel in vitro human digestion systems for screening the bioavailability and digestibility of foods. *Journal of Functional Foods*, 22, 113–121. doi: 10.1016/j.jff.2016.01.005.

Lobato, C., Sosa, A., Rodríguez, J., Sandoval, O., Pérez, C. y Vernon, E. (2008) Structural and textural characteristics of reduced-fat cheese-like products made from W1/O/W2 emulsions and skim milk. *LWT - Food Science and Technology* 41 (2008) 1847e1856. doi:10.1016/j.lwt.2008.01.006.

Lootens, D., Capel, F., Durand, D., Nicolai, T., Boulenger, P. y Langendorff, V. (2003). Influence of pH, Ca concentration, temperature and amidation on the gelation of low methoxyl pectin. *Food Hydrocolloids* 17, 237–244.

Marchesi, J. y Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, 3:31. doi:10.1186/s40168-015-0094-5.

McClements J., Decker, E. y Weiss, J. (2007). Emulsion-Based Delivery Systems for Lipophilic Bioactive Components. *Journal of Food Science*, Vol. 72, Nr. 8, 109-124. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00507.x.

McClements, J., y Li, Y. (2010). Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Advances in Colloid and Interface Science*, 159, 213–228. doi:10.1016/j.cis.2010.06.010.

McClements, J. y Li, Y. (2010-A). Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food & Function*, 2010, 1, 32–59. DOI: 10.1039/c0fo00111b.

McClements, J. (2012). Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17, 235–245. doi:10.1016/j.cocis.2012.06.002.

McClements, J. (2015). Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 219, 27-53, doi:10.1016/j.cis.2015.02.002.

McConnell, E., Fadda, H. y Basit, A. (2008). Gut instincts: Explorations in intestinal physiology and drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 364, 213–226. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.05.012.

Messaoudi, M., Lalonde, R., Violle, N., Javelot, H., Desor, D., Nejd, A., Bisson, J., Rougeot, C., Pichelin, M., Cazaubiel, M. y Cazaubiel, J. (2011). Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *British Journal of Nutrition*, 105, 755–764. doi:10.1017/S0007114510004319.

Messaoudi, M., Violle, N., Bisson, J., Desor, D., Javelot, H. y Rougeot, C. (2011). Beneficial psychological effects of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in healthy human volunteers. *Gut Microbes*, 2:4, 256-261. doi: 10.4161/gmic.2.4.16108.

Million, M., Maraninchi, M., Henry, M., Armougom, F., Richet, H., Carrieri, P., Valero, R., Raccach, D., Vialettes, B. y Raoult, D. (2012). Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *International Journal of Obesity*, 36, 817–825. doi:10.1038/ijo.2011.153.

Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Balance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D., Ménard, O., Recio, I.,

Santos, N., Singh, R., Vegarud, G., Wickham, M., Weitschies, W. y Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food and Function*, 5, 1113–1124. doi:10.1039/c3fo60702j.

Murillo, M., Pedroza, R., Lobato, C., Martínez, A. y Vernon, E. (2011). Designing W1/O/W2 double emulsions stabilized by proteinopolysaccharide complexes for producing edible films: Rheological, mechanical and water vapour properties. *Food Hydrocolloids*, 25, 577–585. doi:10.1016/j.foodhyd.2010.06.015.

Muschiolik, G. (2007). Multiple emulsions for food use. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 12, 213–220. doi:10.1016/j.cocis.2007.07.006.

Narayanan, J., Deotare, V., Bandyopadhyay, R. y Sood, A. (2001). Gelation of aqueous pectin solutions: a dynamic light scattering study. *Journal of Colloid and Interface Science* 245, 267–273. doi:10.1006/jcis.2001.8055.

Oomen, A., Rompelberg, C., Bruil, M., Dobbe, C., Pereboom, D., y Sips, A. (2003). Development of an In Vitro Digestion Model for Estimating the Bioaccessibility of Soil Contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44, 281–287. doi:10.1007/s00244-002-1278-0.

Oppermann, A., Renssen, M., Schuch, A., Stieger, M. y Scholten, E. (2015). Effect of gelation of inner dispersed phase on stability of (w1/o/w2) multiple emulsions. *Food Hydrocolloids* 48, 17-26. doi: 10.1016/j.foodhyd.2015.01.027.

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

Ozyurt, V. y Ötles, S. (2014). Properties of probiotics and encapsulated probiotics in food. *Acta Scientiarum Polonorum*, 13(4), 413-424.

Pérez, J., Barrios, E., Román, A. y Pedroza, R. (2011). Interacción goma de mezquite-quitosano en la interfase y su influencia en la estabilidad de emulsiones múltiples W1/O/W2. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, Vol. 10, No. 3, 487-499.

Pérez, N., Watt, S. y Wilde, P. (2014). Comparative study of the stability of multiple emulsions containing a gelled or aqueous internal phase. *Food Hydrocolloids*, 42, 215-222. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.05.023.

Pimentel, D., Campos, R., Lobato, C., Pedroza, R., y Vernon, E. (2009). Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 42, 292–297. doi:10.1016/j.foodres.2008.12.002.

Rodríguez, M., Pedroza, R., Prado, L., Beristain, C. y Vernon, E. (2004). Microencapsulation by Spray Drying of Multiple Emulsions Containing Carotenoids. *Journal of Food Science*. Vol. 69, Nr. 7, 351-359. doi:10.1111/j.1365-2621.2004.tb13641.x.

Rodríguez, M., Estrada, A., García, Ludeña, F., Campos, R., Pimentel, D. (2014). Viability of *Lactobacillus plantarum* entrapped in double emulsion during Oaxaca cheese manufacture, melting and simulated intestinal conditions. *LWT - Food Science and Technology* 59, 768-773. doi:10.1016/j.lwt.2014.07.004.

Rotard, W., Christmann, W., Knoth, W. y Mailahn, W. (1995). Bestimmung der resorptionsverffigbaren PCDD/PCDF aus Kieselrot. Simulation der Digestion mit Böden. Z.Umweltchem. Okotox, 7 (1), 3 – 9.

Sahu, D., Kushwaha, S. y Agarwal, P. (2013). Recent advancement, technology & applications of multiple emulsions. Innovare Journal of Health Sciences, Vol 1, Issue. 19-23.

Sandoval, O., Lobato, C., García, H., Álvarez, J. y Vernon, E. (2010). Textural properties of alginate–pectin beads and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. Food Research International, 43, 111–117. doi:10.1016/j.foodres.2009.09.010.

San Roman, A. y Shivdasani, R. (2011). Boundaries, junctions and transitions in the gastrointestinal tract. Experimental cell research, 317, 2711–2718. doi: 10.1016/j.yexcr.2011.07.011.

Schuch, A., Helfenritter, C., Funck, M. y Schuchmann, H. (2014). Observations on the influence of different biopolymers on coalescence of inner water droplets in W/O/W (water-in-oil-in-water) double emulsions. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 475, 2-8. doi:10.1016/j.colsurfa.2014.06.012.

Shima, M., Morita, Y., Yamashita, M. y Adachi, S. (2006). Protection of *Lactobacillus acidophilus* from the low pH of a model gastric juice by incorporation in a W/O/W emulsion. Food Hydrocolloids 20, 1164–1169. doi:10.1016/j.foodhyd.2006.01.001.

Shima, M., Morita, Y., Yamashita, M. y Adachi, S. (2009). Protection of *Lactobacillus acidophilus* from bile salts in a model intestinal juice by incorporation into the inner-water phase of a W/O/W emulsion. *Food Hydrocolloids* 23, 281– 285. doi:10.1016/j.foodhyd.2008.01.008.

Song, D., Ibrahim, S. y Hayek, S. (2012). Recent Application of Probiotics in Food and Agricultural Science. Intech, Chapter 1. Immunology and Microbiology, “Probiotics”, book edited by Everlon Cid Rigobelo, ISBN 978-953-51-0776-7, Published: October 3, 2012 under CC BY. doi:10.5772/50121.

Sundar, A., Rubila, S., Jayabalan, R., Ranganathan, T. (2012). A review on pectin: chemistry due to general properties of pectin and its pharmaceutical uses. *Open Access Scientific Reports*, volume 1, issue 12. doi:10.4172/scientificreports.550.

Tapan, K., Chhatrapal, C., Ajazuddin, Amit, A., Hemant, B. y Dulal, K. (2012). Prospects of pharmaceuticals and biopharmaceuticals loaded microparticles prepared by double emulsion technique for controlled delivery. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21, 125-141. doi: 10.1016/j.jsps.2012.05.009.

Thakur, B., Singh, R., y Handa, A. (1997). Chemistry and uses of pectin — A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37:1, 47-73. doi:10.1080/10408399709527767.

Wagoner, T., Vardhanabhuti, B. y Foegeding, E. (2016). Designing whey protein–polysaccharide particles for colloidal stability. *Annual Review of Food Science and Technology*, 7, 93–116. doi: 10.1146/annurev-food-041715-033315.

Wang, Y. y Hasper, L. (2014). The role of microbiome in central nervous system disorders. *Brain, Behavior, and Immunity* 38, 1-12. doi:10.1016/j.bbi.2013.12.015.

Versantvoort, C., Oomen, A., Van de Kamp, E., Rompelberg, C. y Sips, A. (2005). Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 31–40. doi:10.1016/j.fct.2004.08.007.

Willats, W., Knox, J. y Mikkelsen, J. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology* 17, 97–104. doi:10.1016/j.tifs.2005.10.008.