



CYTAL-ALACCTA 2019  
Buenos Aires, 20 – 22 noviembre 2019

## CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS Y MICROESTRUCTURALES DE MICROEMULSIONES ALIMENTARIAS GELIFICADAS A TEMPERATURA DE CONSUMO

N. Mori Cortés<sup>1</sup>, A.N. Califano<sup>1</sup>, G. Lorenzo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA, CONICET-CICPBA- Facultad de Ciencias Exactas, UNLP), 47 y 115, La Plata, Argentina.*

<sup>2</sup>*Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata (UNLP).*

*E-mail: [noe89lp@hotmail.com](mailto:noe89lp@hotmail.com)*

### RESUMEN

Las microemulsiones o/w son vehículos interesantes para encapsular compuestos bioactivos hidrofóbicos tales como aceites funcionales y vitaminas. Asimismo, resultan de gran importancia ya que debido al pequeño tamaño de sus gotas (menor a 100 nm) permiten incrementar la biodisponibilidad de los compuestos bioactivos y al ser sistemas transparentes pueden ser aplicados a matrices como postres o golosinas sin alterar sus características visuales. Comúnmente las microemulsiones son sistemas fluidos y para lograr su incorporación en matrices gelificadas se podría recurrir a dos alternativas: incrementar el contenido de fase dispersa o adicionar un espesante a la fase continua. Estos sistemas pueden conferir distintas características reológicas y estructurales que pueden afectar su funcionalidad durante su ingesta. En base a esto, el objetivo fue estudiar las características reológicas y microestructurales de microemulsiones alimentarias gelificadas. Se elaboraron microemulsiones o/w (líquidas) y tipo gel conteniendo aceite de girasol, kolliphor RH40 (surfactante), etanol (cosurfactante) y agua. Con el fin de formular una microemulsión o/w con espesante (carboximetilcelulosa, CMC) con una viscosidad comparable a la microemulsión tipo gel, se estudiaron fases continuas con distintas concentraciones de CMC, seleccionándose una concentración de 3.5% p/v CMC para la formulación de dicha microemulsión. Se realizaron ensayos reológicos dinámicos (barridos de esfuerzo y de frecuencias dentro del rango viscoelástico lineal) y ensayos rotacionales a la temperatura de ingesta (37°C). Además, se realizaron ensayos termo-reológicos y observaciones microscópicas de transmisión electrónica (TEM). El aumento en la concentración de CMC generó fases continuas con mayor viscosidad a cero esfuerzo de corte ( $\eta_0$ ) y altamente pseudoplásticas. El comportamiento de flujo se ajustó mediante el modelo de Cross para obtener los valores de  $\eta_0$  (entre  $4.4 \times 10^2$  y  $7.8 \times 10^3$  Pa.s). La microemulsión gel presentó un comportamiento cualitativamente diferente a la que tenía espesante, con un mayor rango de esfuerzos donde la viscosidad no se modificó ( $\eta_0 = 9.8 \times 10^2$  Pa.s). Al comparar el comportamiento viscoelástico entre la microemulsión gel y aquella con espesante se observó que la primera presentó características de una solución concentrada de macromoléculas con valores del módulo de pérdida ( $G''$ ) por encima del módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y un cruce de ambos a frecuencias

intermedias. Por el contrario, la CMC generó sistemas tipo sólidos viscoelásticos con  $G' > G''$  en todo el rango de frecuencias, pero con un espectro mecánico por debajo del de la microemulsión gel. También mostraron diferentes comportamientos con la temperatura; mientras que la microemulsión que contenía CMC mostró una leve variación de los módulos con la temperatura y un cruce de ambos a  $60^{\circ}\text{C}$ , la microemulsión gel presentó un cambio más abrupto con una temperatura de cruce a  $36.5^{\circ}\text{C}$  y una disminución marcada de ambos módulos. Para las observaciones por TEM fue necesario eliminar el espesante de la fase continua ya que impidió la observación de las gotas. La microemulsión líquida presentó pequeñas gotas esféricas homogéneamente dispersas sin presencia de agregados. Mientras que en la microemulsión gel se observaron agregados filamentosos que se interconectan y en consecuencia producen un incremento en la viscosidad. La adición de carboximetilcelulosa a una microemulsión líquida permitió elaborar microemulsiones gelificadas transparentes con un menor contenido de aceite y emulsificante pero con características reológicas diferentes a la microemulsión gel.

Palabras clave: microemulsión, reología, microscopía de transmisión electrónica

## 1. Introducción

Actualmente, el enriquecimiento y la fortificación de los alimentos son las estrategias más efectivas para aumentar la ingesta de bioactivos y así mejorar la salud de la población. Las microemulsiones resultan particularmente útiles como sistemas de vehiculización de bioactivos ya que contienen pequeñas gotas que facilitan su rápida absorción en el tracto gastrointestinal. Además, poseen la ventaja de ser transparentes por lo cual pueden ser adicionadas a diversas matrices alimentarias sin alterar sus características visuales. Las microemulsiones a diferencia de las emulsiones convencionales son altamente estables y mantienen su aspecto transparente frente a cambios de acidez, temperatura y elevada concentración de sales (Mori Cortés, Califano y Lorenzo, 2019). Generalmente, las microemulsiones son sistemas fluidos con viscosidades comparables a la del agua, por lo cual, se debe generar un incremento en la viscosidad de la microemulsión para que pueda ser incorporada en matrices gelificadas. Para lograr dicho aumento en la viscosidad se puede adicionar un espesante a la fase continua o incrementar el contenido de fase dispersa. De este modo, se pueden generar cambios estructurales y reológicos en el alimento que pueden afectar la aceptación general por parte del consumidor. Es decir, es importante que el producto alimenticio posea las propiedades reológicas adecuadas a la temperatura de consumo ya que existe una estrecha relación con las sensaciones que el consumidor percibe al ingerir un alimento (Sala y col., 2007). Es por esto que el presente trabajo tiene como objetivo

estudiar las características reológicas y microestructurales de microemulsiones alimentarias gelificadas a temperatura de consumo.

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1 Elaboración de las fases continuas**

Se elaboraron dispersiones acuosas con concentraciones de 3%, 3.5%, 4% y 5% p/v de carboximetilcelulosa (CMC, Saporiti SACIFIA, Argentina). Las dispersiones se prepararon adicionando la CMC lentamente en un recipiente con agua destilada a 80°C y con agitación constante. Las mismas se dejaron reposar durante 24 horas antes de su utilización.

### **2.2 Elaboración de las microemulsiones**

Inicialmente, se elaboró la fase dispersa constituida por emulsificante (kolliphor RH40, BASF Argentina S.A.), aceite de girasol (Molinos Cañuelas SACIFIA, Argentina) y cosurfactante (etanol absoluto, > 99.5%, SORIA, Argentina) mediante agitación magnética (350 rpm) y utilizando un baño de temperatura controlada a 40°C para garantizar la correcta homogeneización de los componentes. Se utilizó una proporción de emulsificante: (aceite + etanol) igual a 9:1, manteniendo una relación constante de aceite de girasol: etanol (2:1). Se obtuvieron dos formulaciones: (1) una microemulsión tipo gel constituida por 60% p/p de fase dispersa y 40% p/p de agua y (2) una microemulsión o/w constituida por 20% p/p de fase dispersa y 80% p/p de agua. A una parte de la microemulsión o/w se le adicionó carboximetilcelulosa (CMC) como espesante a una concentración de 3.5% p/v. Así se obtuvo una tercera formulación con una viscosidad similar a la microemulsión tipo gel. Finalmente, cada formulación se colocó en un baño sonicador durante 1 hora a 40°C para eliminar las burbujas ocluidas.

### **2.3 Caracterización reológica**

Se realizaron ensayos reológicos para las distintas formulaciones en un reómetro de esfuerzo controlado Haake RS600 (Haake, Alemania). Se utilizó una geometría de platos paralelos de 60 mm para las muestras más viscosas y cilindros concéntricos “doble gap” para las más fluidas. En todos los ensayos la temperatura se mantuvo a 37°C durante todo el experimento. Todas las mediciones se realizaron al menos por duplicado.

2.3.1 Ensayos oscilatorios: se realizaron barridos de esfuerzos a una frecuencia de oscilación fija de 1 Hz (6.28 rad/s) para determinar el rango viscoelástico lineal (RVL). Posteriormente, dentro del RVL, se realizaron barridos de frecuencias a un esfuerzo fijo

para determinar la variación de los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) dentro del rango 0.01 - 100 rad/s.

2.3.2 Medición de flujo en estado estacionario: las mediciones de flujo se obtuvieron imponiendo una rampa de velocidades de deformación y esperando a que el esfuerzo de corte llegue al estado estacionario en cada punto antes de obtener el valor de viscosidad (Lorenzo, Zaritzky y Califano, 2008).

2.3.3 Barridos de temperatura: se monitorearon los cambios en el comportamiento reológico en función del tiempo y durante un barrido de temperatura utilizando un esfuerzo fijo dentro del RVL y una frecuencia de 1 Hz. El programa térmico adoptado fue: 1°) equilibrar la muestra a  $8 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , 2°) calentamiento hasta  $80^\circ\text{C}$  a  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ , 3°) la temperatura se mantuvo a  $80^\circ\text{C}$  durante 3 min, 4°) enfriamiento hasta  $8^\circ\text{C}$  a  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ , y 5°) la temperatura se equilibró a  $8^\circ\text{C}$  durante 5 min.

## 2.4 Microscopía de transmisión electrónica (TEM)

Las microemulsiones fueron observadas mediante un microscopio electrónico de transmisión (JEM 1200EX II, Jeol, USA) utilizando un método de tinción negativa. Una pequeña alícuota de microemulsión se depositó en una grilla recubierta de colodión. Luego, se adicionó una gota de solución acuosa de ácido fosfotúngstico y el exceso se removió antes de la observación.

## 3. Resultados y discusión

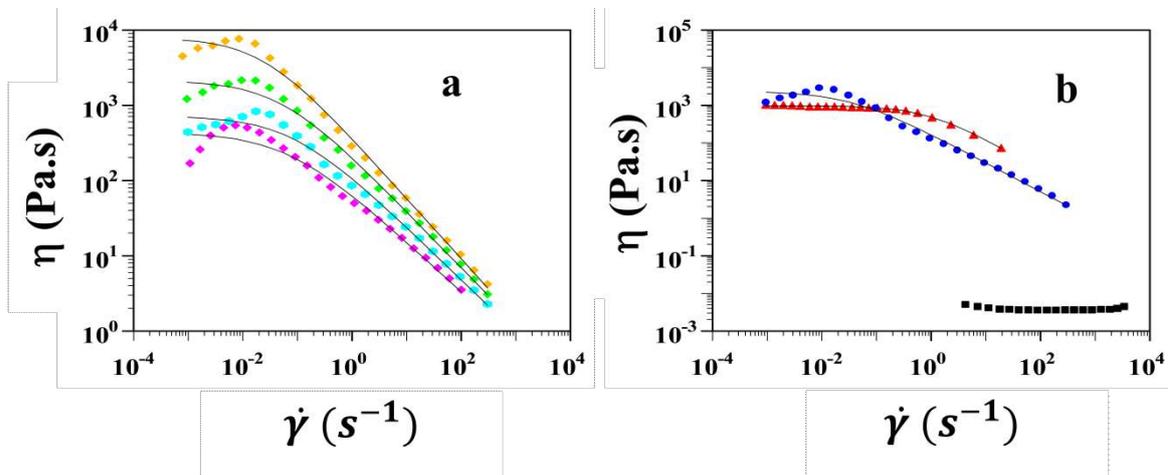
### 3.1 Comportamiento de flujo de las microemulsiones

En la Figura 1a se muestra la dependencia de la viscosidad con la velocidad de deformación para las fases continuas con distintas concentraciones de CMC (3%, 3.5%, 4% y 5% p/v) a una temperatura de consumo de  $37^\circ\text{C}$ . Todas las curvas de flujo presentaron un comportamiento característico de fluidos pseudoplásticos. Se utilizó el modelo de Cross para ajustar la variación de la viscosidad y obtener el valor de  $\eta_0$ :

$$\eta = \frac{\eta_0}{(1+(\tau\dot{\gamma})^n)} \quad (1)$$

$\eta$  es la viscosidad correspondiente a una velocidad de deformación  $\dot{\gamma}$ ;  $\eta_0$  es la viscosidad a  $\dot{\gamma} = 0$ ;  $\tau$  el tiempo de relajación y  $n$  una medida de las características pseudoplásticas.

Se observó que al incrementar la concentración de espesante de 3% a 5% p/v, aumentó el valor de  $\eta_0$  de  $4.4 \times 10^2$  a  $7.8 \times 10^3$  Pa.s. Esto se debe a que la CMC genera una estructura formada por una red tridimensional de cadenas de carboximetilcelulosa entrelazadas. Entonces, al aumentar su concentración aumentan las interacciones entre las cadenas provocando un aumento de la fuerza de la red. La microemulsión o/w elaborada con 3.5% p/v de CMC también presentó un comportamiento cualitativamente similar a la fase continua correspondiente pero con un marcado incremento en los valores de viscosidad (Figura 1b). Esto sugiere que las gotas de aceite quedan atrapadas en la red formada por las cadenas poliméricas de carboximetilcelulosa reforzando así la estructura.



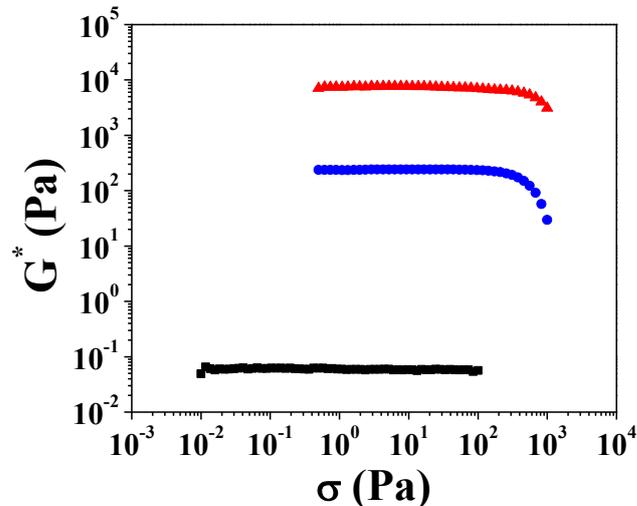
**Figura 1 (a)** Curvas de flujo para las fases continuas con distintas concentraciones de CMC: (◆) 3%, (◆) 3.5%, (◆) 4% y (◆) 5% p/v. **(b)** Curvas de flujo para las microemulsiones: (■) microemulsión o/w, (●) microemulsión o/w con espesante y (▲) microemulsión tipo gel. Línea continua: modelo de Cross.

Por otro lado, la microemulsión tipo gel con 60% p/p de fase dispersa también exhibió un marcado comportamiento pseudoplástico. Sin embargo, su comportamiento fue cualitativamente diferente a la que tenía espesante. Si bien los valores de  $\eta_0$  obtenidos pudieron considerarse dentro del mismo rango ( $2.3 \times 10^3$  Pa.s y  $9.8 \times 10^2$  Pa.s para la microemulsión con espesante y la gel, respectivamente), se observaron cambios significativos en los valores de  $\tau$  obtenidos. La microemulsión con CMC presentó un tiempo de relajación característico de 30.2 s mientras que para las microemulsión gel este fue tan sólo de 1.02 s. Este valor se corresponde con la inversa de la velocidad de deformación que es necesaria para que la estructura del material comience a fluir. En el

caso de la microemulsión gel se observó que tuvo una estructura más estable y un mayor rango de velocidades de deformación sin modificar su viscosidad. Por otro lado, la disminución en el contenido de fase dispersa a un 20% p/p generó cambios en las características de flujo de la microemulsión. La microemulsión o/w con 20% p/p de fase dispersa exhibió comportamiento Newtoniano. Este comportamiento es característico de las microemulsiones o/w donde las gotas de aceite se encuentran dispersas libremente en un gran volumen de fase continua.

### 3.2 Comportamiento viscoelástico de las microemulsiones

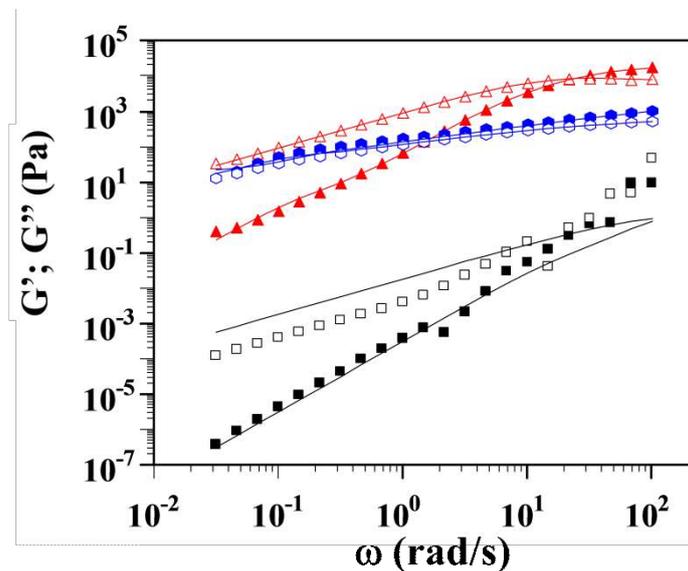
Se obtuvieron los barridos de esfuerzos de las distintas microemulsiones para determinar su rango viscoelástico lineal. En la Figura 2 se visualiza el módulo complejo ( $G^* = ((G')^2 + (G'')^2)^{1/2}$ ) en función de la amplitud del esfuerzo. La microemulsión fluida o/w se mostró invariante en todo el rango de esfuerzos medidos. Mientras que las microemulsiones gelificadas ya sea por el agregado de espesante (CMC) o por el aumento de fase dispersa (microemulsión con estructura bicontinua) presentaron una disminución de  $G^*$  a aproximadamente 300 Pa.



**Figura 2** Barridos de esfuerzos para las distintas microemulsiones: (■) microemulsión o/w, (●) microemulsión o/w con espesante y (▲) microemulsión tipo gel.

Se realizaron los barridos de frecuencia para las microemulsiones. La Figura 3 muestra el módulo elástico ( $G'$ ) y el módulo viscoso ( $G''$ ) en función de la frecuencia ( $\omega$ ). Se puede observar que a pesar de que la microemulsión con espesante y tipo gel tenían viscosidades comparables a cero esfuerzo de corte, presentaron un comportamiento viscoelástico marcadamente diferente. La microemulsión gel presentó

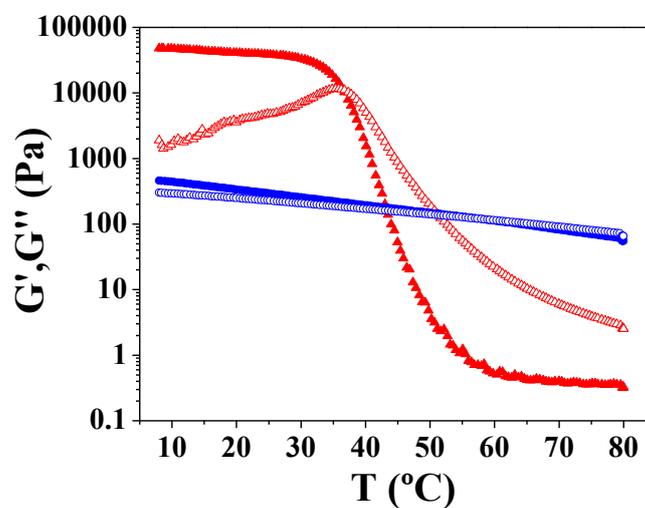
características de una solución concentrada de macromoléculas con valores del módulo de pérdida ( $G''$ ) por encima del módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y un cruce de ambos a aproximadamente 25 rad/s. Por el contrario, la microemulsión o/w con espesante exhibió un comportamiento del tipo sólido viscoelástico con  $G' > G''$  en todo el rango de frecuencias estudiado y con una baja dependencia de ambos módulos con la frecuencia. Pese a que la microemulsión o/w con espesante presentó un comportamiento del tipo gel débil, su espectro mecánico quedó por debajo del espectro de la microemulsión gel. Por otro lado, la microemulsión o/w exhibió un comportamiento marcadamente viscoso, típico de un fluido newtoniano. Se observaron valores muy bajos de  $G'$  y  $G''$  y una marcada dependencia lineal de dichos parámetros con la frecuencia en todo el rango estudiado ( $G' \propto \omega^2$  y  $G'' \propto \omega$ ). A frecuencias bajas  $G''$  fue superior a  $G'$  y presentó una frecuencia crítica ( $\omega_c$ ) a 12.35 rad/s donde las curvas de ambos módulos se cruzan ( $G'(\omega_c) = G''(\omega_c)$ ). Los resultados obtenidos se ajustaron satisfactoriamente mediante el modelo de Maxwell generalizado, donde los valores de  $G'$  y  $G''$  en cada frecuencia están dados por la suma de  $N$  contribuciones de  $N$  elementos de Maxwell en paralelo, definidos por la respuesta elástica de un resorte ( $G_i$ ) y el tiempo de relajación  $\lambda_i$  (Lorenzo, Zaritzky, & Califano, 2015).



**Figura 3** Barridos de frecuencias para las microemulsiones: (■, □) microemulsión o/w, (●, ○) microemulsión o/w con espesante y (▲, △) microemulsión tipo gel. Símbolos llenos:  $G'$ ; símbolos vacíos:  $G''$ . Línea continua: modelo de Maxwell.

### 3.3 Barridos de temperatura

La Figura 4 muestra el módulo elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) en función de la temperatura para la microemulsión o/w con espesante y la microemulsión tipo gel. Las microemulsiones mostraron comportamientos marcadamente diferentes con la temperatura. A bajas temperaturas, la microemulsión tipo gel constituyó un gel más fuerte que la microemulsión que contenía 3.5% p/v de espesante. Sin embargo, al incrementar la temperatura se observó una caída abrupta de ambos módulos y un cruce a 36.5°C. Este comportamiento está asociado a las propiedades térmicas del emulsificante que fueron reportadas anteriormente en otros trabajos, donde se observó una caída abrupta de la  $\eta^*$  del emulsificante a 38°C, relacionado con la fusión completa del mismo (Mori Cortés, Califano y Lorenzo, 2019). Por el contrario, la microemulsión o/w con espesante mostró una leve variación de los módulos con la temperatura y un cruce de ambos a 60°C. Este comportamiento es similar al reportado previamente en suspensiones de CMC, lo cual pone en evidencia que la reología del hidrocoloide es la que controla las propiedades mecánicas de la microemulsión (Feddersen y Thorp, 1993). Tanto la microemulsión o/w con espesante como la gelificada recobraron completamente su estructura luego del proceso de enfriamiento.

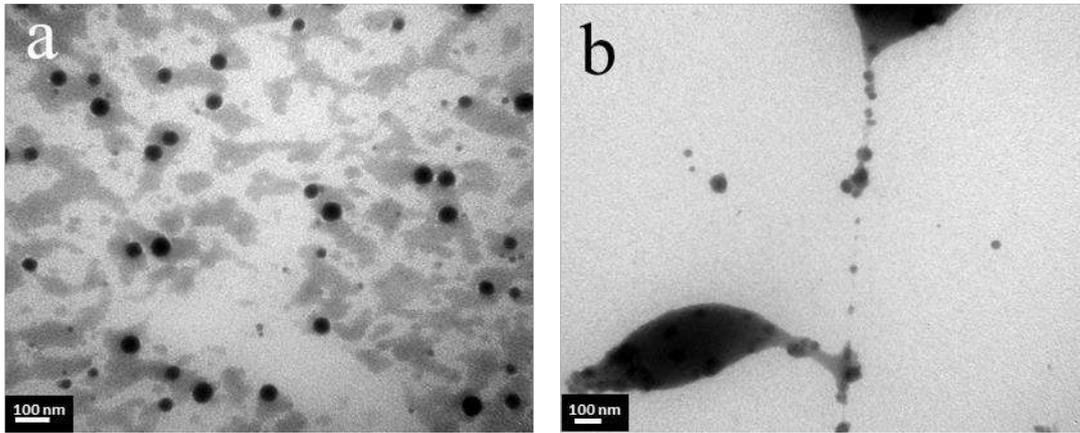


**Figura 4** Barrido de temperatura: (▲,△) microemulsión tipo gel y (●,○) microemulsión con 3.5% p/v de carboximetilcelulosa. Símbolos llenos:  $G'$ ; símbolos vacíos:  $G''$ .

### 3.4 Microscopía de transmisión electrónica

Las imágenes obtenidas por TEM se muestran en la Figura 5. La microemulsión líquida presentó pequeñas gotas esféricas homogéneamente dispersas sin presencia de

agregados. Para las observaciones por TEM fue necesario eliminar el espesante de la fase continua ya que impedía la observación de las gotas. En la microemulsión gel se observaron agregados filamentosos que se interconectan y en consecuencia producen un incremento en la viscosidad.



**Figura 5.** Imágenes obtenidas por TEM para (a) microemulsión o/w (b) microemulsión gel.

#### 4. Conclusiones

En el presente trabajo se realizó un estudio sobre distintas alternativas para la obtención de microemulsiones gelificadas, tanto mediante la adición de CMC en la fase continua como el incremento de fase dispersa, generando una estructura gel bicontinua. Si bien ambos sistemas presentaron viscosidades ( $\eta_0$ ) comparables a 37°C, su caracterización viscoelástica mostró que la microemulsión gel presentaba una marcada componente viscosa a la temperatura de consumo que no se detectó en las que tenían espesante. Estas características les permiten a ambos sistemas tener aplicaciones diversas dependiendo de las características deseadas en el producto final.

#### 5. Agradecimientos

Los autores agradecen a la empresa BASF S.A. por proveer el emulsificante utilizado y la financiación de UNLP, CONICET y ANPCYT. En memoria de la Dra Alicia N. Califano (1951-2019), investigadora (CIDCA-CONICET, Argentina) altamente respetada y compañera a quien extrañamos profundamente.

#### 6. Referencias

- Feddersen, R. L., Thorp, S. N. (1993). Sodium carboxymethylcellulose. In *Industrial gums 3<sup>o</sup> Edition* (pp. 537-578). Academic Press, Massachusetts, Estados Unidos.
- Lorenzo, G., Zaritzky, N., Califano, A. (2008). Modeling rheological properties of low-in-fat o/w emulsions stabilized with xanthan/guar mixtures. *Food Research International*, 41(5), 487-494.
- Lorenzo, G., Zaritzky, N., Califano, A. (2015). Mechanical and optical characterization of gelled matrices during storage. *Carbohydrate polymers*, 117, 825-835.
- Mori Cortés, N., Califano, A. N., Lorenzo, G. (2019). Physical and chemical stability under environmental stress of microemulsions formulated with fish oil. *Food research international*, 119, 283-290.
- Sala, G., van de Velde, F., Stuart, M. A. C., van Aken, G. A. (2007). Oil droplet release from emulsion-filled gels in relation to sensory perception. *Food hydrocolloids*, 21(5-6), 977-985.