

**Desarrollo de bebidas funcionales adicionadas con  $\alpha$ -tocoferol y aceites esenciales de limón y toronja por medio de una nanoemulsión múltiple ( $w_1/o/w_2$ )**

M.M. Gallegos-Garza\*<sup>1</sup>, D.A. Guzmán-Díaz <sup>1</sup>, J.G. Báez-González<sup>1</sup>, C.T. Gallardo-Rivera<sup>1</sup>, Ma. A. Núñez González<sup>1</sup>, E. García-Marquez<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Alimentos, Av. Universidad s/n, Col. Cd. Universitaria, C.P. 66451, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

<sup>2</sup> Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Ciatej, Unidad Noreste.

\*[melissagallegosgarza@hotmail.com](mailto:melissagallegosgarza@hotmail.com)

**RESUMEN:**

La industria de bebidas en México, experimenta una creciente demanda de nuevos productos con propiedades funcionales. El objetivo de este trabajo fue desarrollar una nanoemulsión múltiple  $w_1/o/w_2$  con propiedades antioxidantes otorgadas por el  $\alpha$ -Tocoferol y los aceites esenciales de toronja y limón e incorporarla a una bebida natural a base de frutas e incorporación de una fibra soluble. En este caso inulina destaca por sus propiedades prebióticas. Se lograron obtener nanoemulsiones estables debido a la adición de una proteína en la fase acuosa externa, ya que se disminuye el tamaño de partícula que contribuyó a mejorar la estabilidad de la nanoemulsión doble esto concuerda con los valores obtenidos de tasa de coalescencia, mayores a  $1 \times 10^{-6}$ , así mismo las nanoemulsión presentó alta actividad antioxidante. La densidad y el pH no variaron respecto al tiempo. Se logró la estabilidad de la nanoemulsión en la bebida, gracias a que la densidad fue muy cercana a la del agua. Los resultados obtenidos sugieren que es factible la adición de nanoemulsiones para incorporarse en bebidas con antioxidantes encapsulados, contribuyendo en el sabor y aroma en bebidas, usando aceites esenciales.

**Palabras Clave:** Bebidas, Nanoemulsión múltiple, Aceites esenciales, Antioxidantes, Estabilidad.

**ABSTRACT:**

The beverage industry in the country is experiencing an increasing demand for new products with functional properties. The objective of this work was to develop a multiple  $w_1 / o / w_2$  nanoemulsion with antioxidant properties conferred by  $\alpha$ -Tocopherol and essential oils of grapefruit and lemon and incorporate it into a natural fruit-based beverage in addition to the incorporation of a soluble fiber, in this case inulin, which stands out for its prebiotic properties. It was possible to obtain stable nanoemulsions due to the addition of a protein in the external aqueous phase, as the particle size is decreased, which contributed to improve the stability of the double nanoemulsion, this agrees with the obtained values of coalescence rate, greater than  $1 \times 10^{-6}$ , also the nanoemulsions showed a high antioxidant activity. The density and pH did not change with respect to time. The stability of the nanoemulsion in the beverage was obtained, since the obtained density and the water are similar. Due to the results obtained it could be said that it is feasible to make nanoemulsions and incorporate them into beverages with encapsulated antioxidants, which could also provide flavour and aroma to the drinks, using essential oils.

**Keywords:** Beverages, Multiple nanoemulsions, Essential Oils, Antioxidants, Stability

## INTRODUCCIÓN

Hoy en día la industria de bebidas en México, experimentan una creciente demanda de nuevos productos conforme la tendencia del consumidor hacia estilos de vida más saludables y orientados al bienestar de la salud. Las bebidas funcionales, son productos que contienen en su formulación uno o más ingredientes con la propiedad de mejorar el estado de salud y reducir el riesgo de enfermedades (Arai, 2000).

Las macroemulsiones (o simplemente emulsiones) son dispersiones líquido-líquido, con tamaños de gota típico entre 1-100 $\mu$ m (que puede extenderse en casos especiales por debajo de 0.5 $\mu$ m o por encima de 500 $\mu$ m). En este intervalo, las gotas son por lo general suficientemente grandes como para asentarse por efecto de la gravedad, siempre que la densidad sea similar a la fase acuosa. Las nanoemulsiones (Nakajima, 1993) son sistemas de dos fases en los cuales el tamaño de gota es extremadamente pequeño, entre 50-500 nm.

La estabilidad de una emulsión en una bebida se mide por la velocidad en la que se presenta el cremado, generalmente es dependiente de la viscosidad y densidad de la fase acuosa (Taherian, Fustier & Ramaswamy, 2007). De acuerdo con la ley de Stokes un método para incrementar la estabilidad de una emulsión en una bebida es disminuyendo el tamaño de las gotas de la emulsión, ya que, cuanto más grande sean los glóbulos, mayor será el cremado, de acuerdo a esto se preparó una nanoemulsión, la cual fue incorporarla en la bebida. La encapsulación de  $\alpha$ -tocoferol en nanopartículas y su posterior incorporación en una bebida podría aumentar su bioaccesibilidad y biodisponibilidad; pues se ha descrito que las nanoemulsiones favorecen la absorción e incorporación de compuestos liposolubles en nuestro organismo. El objetivo de este trabajo fue desarrollar una nanoemulsión múltiple  $w_1/o/w_2$  con propiedades antioxidantes otorgadas por el  $\alpha$ -Tocoferol y los aceites esenciales de toronja y limón e incorporarla a una bebida natural a base de frutas además de la incorporación de una fibra soluble, en este caso inulina la cual destaca por sus propiedades prebióticas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Desarrollo de la nanoemulsión

Se formuló una nanoemulsión O/W de 60% fase oleosa utilizando Span 80 como emulsificante, aceite de canola, aceite esencial de limón y toronja en concentraciones de 0.5, 1 y 1.5% y 2% de  $\alpha$ -tocoferol. Claves: C= Nanoemulsión sin aceites esencial, T-0.5= Nanoemulsión con 0.5 % de aceite esencial de toronja, T-1= Nanoemulsión con 1 % de aceite esencial de toronja, T-1.5= Nanoemulsión con 1.5 % de aceite esencial de toronja, L-0.5= Nanoemulsión con 0.5 % de aceite esencial de limón, L-1= Nanoemulsión con 1 % de aceite esencial de limón, L-1.5= Nanoemulsión con 1.5 % de aceite esencial de limón.

La fase acuosa constituyó el 40% de la emulsión. Se agregó la fase acuosa a la fase oleosa previamente mezclada en un Homogeneizador (OMNI GLH850) a 5000 rpm por 5 minutos. Se colocó la emulsión obtenida en el paso anterior en el ultrasonido (OMNI-INC Sonic ruptor 250) a una potencia de 70 W por 3 minutos sobre un baño de hielo. Para obtener la nanoemulsión múltiple  $w_1/o/w_2$  se elaboró la fase acuosa externa utilizando Tween 80 como emulsificante con 0.5, 0.8 y 1%) de WPC (La proteína se mezcló en agitación magnética hasta dispersar completamente en el agua, posteriormente se ajustó su pH a 7. En agitación magnética se incorporó el Tween 80. Se agregó esta fase acuosa (W2) 25% de la nanoemulsión primaria y se homogeneizó a 3000 rpm por 5 minutos. La emulsión obtenida en el paso anterior fue sonicada en el ultrasonido a una potencia de 70 W por 3 minutos, sobre un baño de hielo.

### Tamaño de partícula

La estabilidad de la nanoemulsión, se determinó por distribución de tamaño de partícula de las nanoemulsiones. El valor calculado directamente en el equipo, fue el diámetro promedio superficial [D 3,2] con el equipo Malvern Mastersizer 3000 y se calculó la tasa de coalescencia.

### Micrografía

Se realizó fotografía en un microscopio Leica ICC50 utilizando el objetivo de 100x, de las nanoemulsiones, en una dilución 1:100 (emulsión: agua).

### Extracción de la fase oleosa de las nanoemulsiones

En tubos de centrifuga Falcon, se pesaron 2 g de nanoemulsión y se agregaron 3 mL de una solución de NaCl-Metanol. Las diluciones contenidas en los tubos se colocaron en un vortex (Labnet) por 10 minutos, y después en un ultrasonido por 10 minutos a una potencia de 70 Hz. Seguido, se agregaron 16 mL de Hexano: Acetona (1:1) y se centrifugaron (Spectrafuge 6C) a 10,000 rpm por 30 minutos. Se recuperó la fase de hexano en la cual se encontraban los antioxidantes liposolubles. El extracto orgánico fue usado para cuantificar la actividad antioxidante.

### Actividad antioxidante

Se preparó la solución estándar del radical ABTS<sup>•+</sup> (Sigma-Aldrich). Se pesó 0.034 g del radical y fue diluido con 10 mL de agua. Se pesó 0.0066 g de Persulfato de Potasio (Sigma-Aldrich) con 10 mL de agua destilada, se mezclaron las dos soluciones y se dejaron reposar a temperatura ambiente 16 horas, después de ese tiempo, la solución estándar fue diluida 3:100 (ABTS: etanol absoluto), hasta obtener una absorbancia ajustada de  $0.700 \pm 0.05$  a una  $\lambda = 730$  nm (Genesys 5, Spectronic, Rochester, N.Y., EUA). La cuantificación colorimétrica fue determinada usando 200  $\mu$ l de muestra, etanol absoluto y radical ABTS<sup>•+</sup>. La mezcla reactiva se mantuvo durante 7 minutos y se midió el cambio de color en las muestras (absorbancia).

### Estabilidad Física

Se evaluó el pH durante 4 semanas de las nanoemulsiones múltiples con distintas concentraciones de aceite, con un potenciómetro (Hanna Instruments<sup>®</sup> modelo pH211). También se determinó la densidad con un picnómetro.

### Elaboración de la bebida

Por último se elaboraron las bebidas de frutas adicionadas con inulina, una de las bebidas contenía pepino (*Cucumis sativus*), limón (*Citrus × limón*) y Jengibre (*Zingiber officinale*) a la cual se le añadió aceite esencial de limón destilado mexicano por medio de la nanoemulsión múltiple, la otra bebida contenía toronja (*Citrus × paradisi*) y frambuesa (*Rubus idaeus*) y se le añadió aceite esencial de toronja rosa. Dicha nanoemulsión múltiple con aceites esenciales se incorporó a las bebidas en un 1.5% en por medio de un Homogenizador a 3000 rpm por 3 minutos. Se monitoreó durante un mes. Verificando separación de la emulsión en la bebida.

### Análisis estadístico

Los datos se sometieron a un análisis de varianza utilizando el paquete estadístico SPSS Statistics 22, con un nivel de confianza del 95%, para identificar las diferencias significativas entre las medias individuales.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

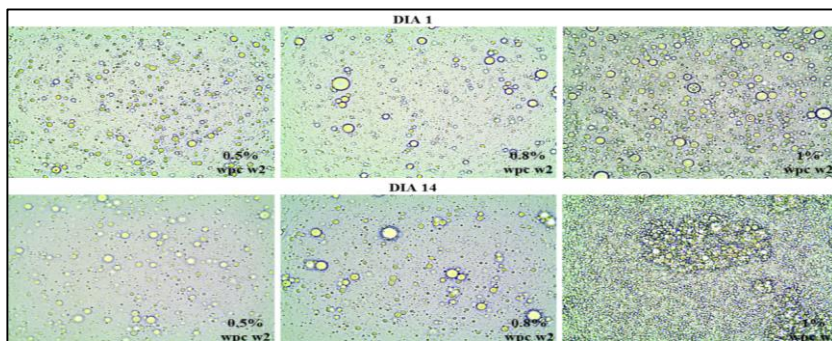
### Tamaño de partícula $w_1/o/w_2$

Se lograron obtener nanoemulsiones estables debido a la adición de una proteína en la fase acuosa externa, ya que se disminuye el tamaño de gota, lo cual contribuyó a mejorar la estabilidad de la nanoemulsión doble (Garti y Lutz, 2004). El método de homogenización por ultrasonido redujo el tamaño de gota característico de una nanoemulsión. Se evaluaron distintas concentraciones de WPC en la fase acuosa externa, donde el tamaño de partícula  $D_{[3,2]}$  no varió significativamente (Tabla I), sin embargo, en las fotografías tomadas al microscopio de estas nanoemulsiones, a las dos semanas se observó mayor floculación en la nanoemulsiones con mayor contenido de proteína (Figura 1), esto debido a que al añadir mayor cantidad de biopolímeros a la fase acuosa externa, la floculación suele ser mayor (McClements, 2005).

**Tabla I.** Tamaño de partícula (nm)  $D_{[3,2]}$  de las nanoemulsiones con distintas concentraciones de WPC en la fase acuosa externa (WPC=Whey Protein Concentrate (Proteína de suero de leche)).

% WPC	D (3,2) nm
0.5	94.7±0.002 <sup>a</sup>
0.8	90.9±0.003 <sup>a</sup>
1	93.0±0.002 <sup>a</sup>

Los valores obtenidos son promedios de tres repeticiones con sus respectivas desviaciones estándar. Valores con diferente letra de superíndice difieren estadísticamente ( $p<0.05$ ).



**Figura 1.** Micrografía de las nanoemulsiones ( $w_1/o/w_2$ ) con distintas concentraciones de WPC en la fase acuosa externa ( $w_2$ ).

### Coalescencia

De acuerdo con los resultados obtenidos, respecto a la tasa de coalescencia de las formulaciones con distintas concentraciones de aceite esencial, puede decirse que son estables, debido a que como menciona (Sherman, 1968); una tasa de coalescencia menor a  $1 \times 10^{-6}$  se considera inestable. Pero, se obtuvieron valores más altos, es decir, mayores a  $1 \times 10^{-6}$ . Aunque, podría decirse que la concentración de aceite esencial tanto de toronja rosa y limón destilado mexicano al 1.5% dan lugar a una nanoemulsión más estable respecto a las demás (Tabla II).

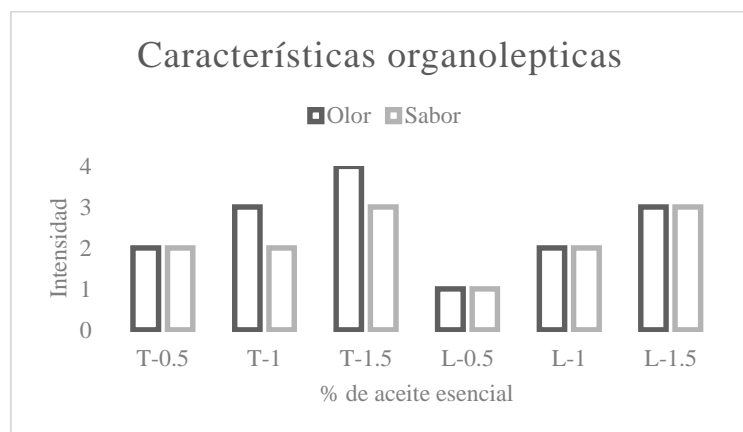
**Tabla II.** Tasa de coalescencia (D 3,2) de las formulaciones de nanoemulsiones con distintas concentraciones de aceites esenciales.

Nanoemulsion	Tasa de Coalescencia
C	$8.00 \times 10^{-08} \text{a}$
T-0.5	$1.00 \times 10^{-06} \text{b}$
T-1	$2.00 \times 10^{-06} \text{c}$
T-1.5	$8.00 \times 10^{-07} \text{d}$
L-0.5	$1.00 \times 10^{-06} \text{e}$
L-1	$2.00 \times 10^{-06} \text{f}$
L-1.5	$3.00 \times 10^{-06} \text{g}$

Valores con diferente letra de superíndice difieren estadísticamente ( $p < 0.05$ ).

### Características organolépticas

Como era de esperarse, al añadir mayor porcentaje de aceite esencial a las fases oleosas de las nanoemulsiones, mejoró las características organolépticas, es decir, incrementó el sabor y el aroma de toronja rosa y limón destilado mexicano, respectivamente (Figura 2). La nanoemulsión que presentó las características organolépticas más aceptables fue la de 1.5% de los respectivos aceites esenciales.



**Figura 2.** Características organolépticas de las emulsiones con distintas concentraciones de aceite esencial (L=Limón destilado mexicano, T=Toronja rosa).

### Actividad antioxidante

Las nanoemulsiones múltiples elaboradas sin aceites esenciales, es decir, solamente con  $\alpha$ -tocoferol presentaron buena actividad antioxidante (Tabla III), pero, el uso de aceites esenciales dicha actividad aumento, destacando la nanoemulsión con aceite esencial de toronja.

**Tabla III.** Resultados de la actividad antioxidante ( $\mu\text{mol eq. Trolox/g}$  de muestra).

Nanoemulsión (Aceite esencial)	$\mu\text{mol eq. Trolox/g}$ de muestra
w <sub>1</sub> /o/w <sub>2</sub> (0%)	21,126±0.003
w <sub>1</sub> /o/w <sub>2</sub> (1.5% toronja rosa)	41,689±0.004
w <sub>1</sub> /o/w <sub>2</sub> (1.5% limón destilado Mexicano)	32,870±0.004

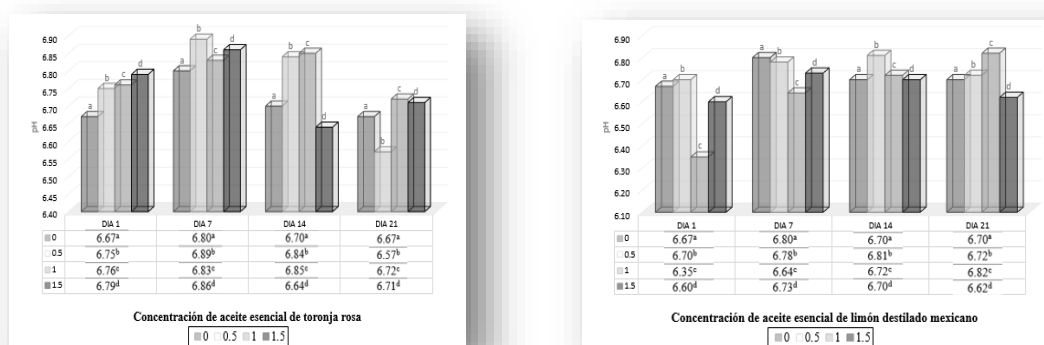
Los valores dados son promedios de tres repeticiones con sus desviaciones estándar.

Como se sabe, la capacidad antioxidante de un alimento proviene de la acción sinérgica combinada de una mezcla de compuestos, incluyendo compuestos fenólicos, carotenoides, vitaminas C y E, entre otros. Se sabe que los aceites esenciales obtenidos a partir de cítricos poseen propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Misharina & Samusenko, 2008), Pero, el aceite esencial de toronja suele presentar mayor capacidad antioxidante (Del Vitto *et al.*, 1998), debido a esto se obtuvo mayor contenido de  $\mu\text{moles eq. de trolox}$ , en la nanoemulsión con aceite esencial de toronja.

### Estabilidad física

#### 1. Efecto de pH

El pH es un factor importante en sistemas que contengan proteína debido a que cuando se alcanza el punto isoeléctrico las proteínas precipitan. En este caso el pH isoeléctrico de las proteínas del suero (wpc) es de aproximadamente 5,3, las proteínas del suero se cargan negativamente a pH 7,0, debido a esto se modificó el pH de la fase acuosa externa a 7, en la Figura 3 se puede observar que el pH se mantuvo muy cercano a 7 durante 21 días de almacenamiento de la nanoemulsiones múltiples, esto podría ser una justificación a que se mantuvieran estables (Hwang *et al.*, 2017). A si mismo cabe mencionar que no se presentaron diferencias significativas respecto durante el almacenamiento de muestras, sin embargo si existió diferencia significativa entre el pH de cada nanoemulsión, debido a que las formulaciones tenían distinta concentración de aceite esencial.

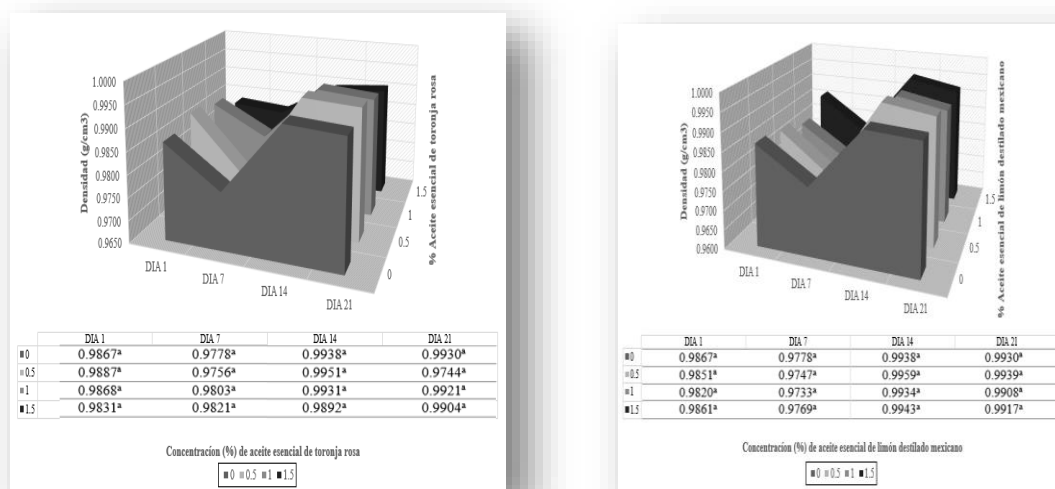


**Figura 3.** Gráficos del pH de nanoemulsiones (w<sub>1</sub>/o/w<sub>2</sub>) con aceite esencial de toronja rosa y limón destilado mexicano durante cuatro semanas. Valores con diferente letra de superíndice difieren estadísticamente ( $p < 0.05$ ).

#### 2. Densidad

De acuerdo a los valores de densidad obtenidos (Figura 4), no se presentaron diferencias significativas en las nanoemulsiones realizadas con distintas concentraciones de aceite esencial, ni

respecto al tiempo de almacenamiento, la densidad se mantuvo muy cercana a 1, por lo tanto es muy similar a todo el sistema. Esto ayudó a que la nanoemulsión no se separara de las bebidas realizadas (Figura 5).



**Figura 4.** Gráficos de la densidad ( $\rho$ ) ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) de nanoemulsiones ( $w_1/o/w_2$ ) con aceite esencial de toronja rosa y limón destilado mexicano durante cuatro semanas. Valores con diferente letra de superíndice difieren estadísticamente ( $p < 0.05$ ).

### Estabilidad de la nanoemulsión en las bebidas

La estabilidad de una emulsión que es incorporada en una bebida está en función de la ley de Stokes. Explica la fuerza de fricción experimentada por objetos esféricos moviéndose en el seno de un fluido viscoso en un régimen laminar de bajos números de Reynolds, es decir, representa la velocidad con la cual una emulsión va presentar sedimentación o cremado en un fluido, en este caso una bebida (McClements, 2015). Como los aceites son normalmente más ligeros que el agua, la naturaleza de estas gotitas debe ser tal que no flotan en la parte superior de la bebida. Si a las formulaciones para adicionarse en bebidas, se añaden aceites esenciales puros, estos tenderán a separarse del cuerpo de la bebida en forma de gotitas de aceite, lo cual se conoce como “anillo” en el cuello de la botella, es decir, se producirá el fenómeno de cremado por parte del aceite esencial. No sólo se consideraría un defecto visual, sino también, y más importante aún, muy probablemente no se disperse homogéneamente en la bebida y esto afecte el sabor y aroma. El uso de aceites esenciales incorporados en una emulsión resuelve este problema, ya que una emulsión de sabor mantiene los aceites esenciales en suspensión en la bebida. La diferencia es que dicha emulsión contribuye ahora al sabor del producto. Sin embargo el problema básico de una emulsión es que debe ser estable en la bebida final y no romper las fases de ninguna manera. Efecto que fue obtenido debido al tamaño de partícula de la nanoemulsión (McClements, 2015).



**Figura 5.** Bebidas de pepino-jengibre-limón con nanoemulsión de aceite esencial de limón y toronja-frambuesa con aceite esencial de toronja.

## CONCLUSIONES

Las nanoemulsiones formuladas fueron estables durante el almacenamiento. La incorporación de aceites esenciales e incorporación de diversos antioxidantes propios del aceite esencial se mantuvo estable. Las nanoemulsiones son un vehículo para desarrollar alimentos funcionales, manteniendo las propiedades de sabor, y aroma. Las formulaciones desarrolladas pueden ser una fuente de antioxidantes naturales para niños y personas de cualquier edad.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arai S. (2000). Functional food science in Japan. *BiofactorS*; 12: 13-6
- Del Vitto, L. A., Petenatti, E. M., & Petenatti, M. E. (1998). *www.redalyc.org*. *Multequina*, 7(7), 29-48.
- Garti, N. y Lutz, R. (2004). Recent progress in double emulsions. *Emulsions: Structure Stability and Interactions*. 4: 587-605.
- Hwang, J., Ha, H., Lee, M., Kim, J. W., Kim, H., & Lee, W. (2017). Physicochemical property and oxidative stability of whey protein concentrate multiple nanoemulsion containing fish oil: Fish oil-loaded multiple nanoemulsion. *Journal of Food Science*, doi:10.1111/1750-3841.13591
- McClements, D. J. (2005). *Food emulsions, principles, practices, and techniques* (2a ed.). Florida, E.U.A.: CRC Press.
- McClements, D. J. (2015). *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. CRC press. pág. 535-545
- Misharina, T. A., & Samusenko, A. L. (2008). Antioxidant properties of essential oils from lemon, grapefruit, coriander, clove, and their mixtures. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44(4), 438-442.
- Nakajima, H.; Tomomasa, S.; Okabe, M. (1993). *Proceedings First World Congress on Emulsion*. Paris. Octubre 19-22. Paper 1-11-162



Sherman, P. (1968). *Emulsion science* (Vol. 6). New York: Academic Press.

Taherian Ali R., Fustier Patrick & Ramaswamy, Hosahalli S. (2007). Effects of added weighting agent and xanthan gum on stability and rheological properties of beverage cloud emulsions formulated using modified starch. *Journal of Food Process Engineering*, 30, 204-22.