



# ***UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA***

***FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS***

***DEPARTAMENTO DE QUÍMICA***

---

***Trabajo de Tesis Doctoral:***

***Desarrollo de sistemas de vehiculización mediante la encapsulación de componentes funcionales y bioactivos de chía (Salvia hispanica L.) para su aplicación en matrices alimentarias***

---

***Tesista: Lic. Andrea Esther Di Marco***

***Directora: Dra. Mabel Cristina Tomás***

***Codirectora: Dra. Vanesa Yanet Ixtaina***

***Año: 2024***

El presente trabajo de Tesis para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CIDCA, UNLP-CIC-CONICET) bajo la dirección de la Dra. Mabel Tomás y la codirección de la Dra. Vanesa Ixtaina. El mismo se desarrolló con fondos otorgados por la UNLP, la ANPCyT y el CONICET.

*A Guille y Cata*

*“Mereces lo que sueñas”*

**Gustavo Cerati**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a todas aquellas personas e instituciones que me acompañaron a lo largo de este camino:

A mis directoras, las Dras. Mabel C. Tomás y Vanesa Y. Ixtaina, por haberme dado la posibilidad de realizar este trabajo de Tesis, de volver al CIDCA y de formar parte de su grupo de investigación. A mi directora, Mabel, por su incansable trabajo, por su apoyo para superar cada obstáculo que se presentó y por contribuir con su conocimiento y dedicación al laboratorio de aceites. A mi codirectora, Vanesa, por su ayuda, especialmente en la última etapa. Por ser una gran guía y consejera, no sólo en lo laboral, sino también en lo personal.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, mi querido CIDCA, donde pude realizar tanto mi Tesina de grado como mi Tesis Doctoral. A todos los investigadores, becarios y personal de apoyo que me recibieron con mucho cariño y respeto.

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (FCE-UNLP), por todo el conocimiento que adquirí en ella y por brindarme la posibilidad de realizar mi Tesis de Doctorado. A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (ANPCyT), al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Universidad Nacional de La Plata (UNLP), por posibilitar la realización de este trabajo a través del otorgamiento de diversos tipos de financiamiento.

A Ingredion Inc., por la donación del almidón de maíz de alta amilosa que utilicé en los ensayos.

A mis compañeras de laboratorio, Estefanía, Claudia, Luciana, Emilia y Greilis, por su compañerismo y por los buenos momentos compartidos a lo largo de todos estos años.

A mis compañeros de oficina, Juli O., Gabi, Karen, Lucho, Bel, Nati A., Clau, Estefa, Vicky, Nati R., Juli R., Jessica, Gildardo y Amalia, por su compañía, consejos, charlas y buenos momentos compartidos.

A todo el personal del CIDCA que, de distintas maneras, hizo posible la realización de mi trabajo.

A todas aquellas personas que colaboraron a través de la realización de mediciones o del préstamo de equipos: al Dr. Martín Torrez (CIDCA), a los Dres. Alejandro Gómez Dacal, Daniel Poiré, Germán Kürten y Luis Vigiani (CIG), a la Dra. Mariela Fernández (CETMIC), a los Dres. Andrés Márquez, Darío Cabezas y a la Dra. Daniela Igartúa (UNQ) y al Dr. Sebastián Cavalitto (CINDEFI). A Mariana Pennisi (CIDCA), por su buena predisposición y ayuda para realizar las determinaciones cromatográficas.

A todos mis amigos, tanto los que están cerca como a miles de kilómetros, por su amor y por ser mis compañeros de buenos momentos.

A mis padres y mis hermanos, por su contención y por haberme acompañado siempre.

A Guillermo, por su amor inmenso, por alentarme a seguir siempre adelante y ser mi compañero de proyectos. A Catalina, por la felicidad infinita que nos trajo su llegada.

---

## RESUMEN

El consumo de aceites ricos en ácidos grasos  $\omega$ -3 se ha asociado a numerosos beneficios para la salud. El aceite de chía (*Salvia hispanica* L.) es una de las fuentes vegetales con mayor porcentaje de ácidos grasos esenciales  $\alpha$ -linolénico ( $\omega$ -3) y linoleico ( $\omega$ -6). Sin embargo, su alto grado de insaturación lo hace altamente susceptible a la degradación oxidativa, restringiendo su incorporación en alimentos. Los complejos de inclusión con amilosa han surgido como una posible estrategia de vehiculización de compuestos bioactivos sensibles.

El presente trabajo de Tesis Doctoral se desarrolla en cuatro capítulos, los cuales abarcan distintos aspectos relevantes para el desarrollo de sistemas de vehiculización de compuestos funcionales y bioactivos de chía (ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6) a través de complejos de inclusión con amilosa, para su aplicación en una matriz alimentaria.

En el **Capítulo 1**, se presenta una introducción sobre el cultivo de *Salvia hispanica* L. y las propiedades del aceite obtenido a partir de sus semillas. A su vez, se describen los sistemas de vehiculización de compuestos bioactivos, se aborda el concepto de complejos de inclusión con amilosa, sus propiedades estructurales, térmicas, los métodos de obtención, de caracterización y los aspectos relacionados con su aplicación en matrices alimentarias.

En el **Capítulo 2**, se estudia la formación de los complejos de inclusión amilosa-ácidos grasos de aceite de chía mediante el método alcalino con la aplicación de una etapa de templado (tratamiento térmico) y la caracterización fisicoquímica de los mismos. Dicho Capítulo abarca, en primer lugar, el estudio de la hidrólisis enzimática del aceite de chía utilizando dos lipasas (pancreática porcina y de *Candida rugosa*), para así obtener una fracción lipídica formada por ácidos grasos libres de aceite de chía, que luego se utilizará como ligando durante la complejación. Posteriormente, este Capítulo se subdivide en dos partes: la Parte I abarca el estudio del efecto del tiempo y la temperatura de templado, mientras que en la Parte II se analiza el efecto de la relación másica ligando/almidón y de la incorporación de una etapa de tratamiento con ultrasonido sobre las propiedades fisicoquímicas y la estabilidad de los complejos.

En el **Capítulo 3**, se investiga el efecto de la omisión de la etapa de templado en el proceso de complejación sobre las propiedades fisicoquímicas y la estabilidad oxidativa acelerada de los complejos de inclusión amilosa-ácidos grasos de chía.

En el **Capítulo 4**, se aborda la fortificación de una sopa instantánea deshidratada con ácidos grasos de chía mediante la incorporación de los complejos de inclusión. Para ello, se seleccionan aquellos complejos que presentaron las propiedades más adecuadas como sistemas de vehiculización, en función de los resultados obtenidos en los Capítulos 2 y 3. En este Capítulo, se analizan tanto las propiedades fisicoquímicas de las premezclas de sopa en polvo, como las propiedades instantáneas, reológicas, sensoriales y la digestibilidad *in vitro*.

## INDICE

<b>Capítulo 1. Introducción .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1. La chía.....</b>	<b>2</b>
1.1.1. Historia.....	2
1.1.2. Descripción del cultivo y mercado.....	3
1.1.3. Semilla de chía .....	4
1.1.3.1. Composición y aspectos nutricionales.....	4
1.1.3.2. Usos actuales de la semilla de chía.....	8
1.1.4. Aceite de chía .....	9
1.1.4.1. Composición y propiedades fisicoquímicas .....	9
1.1.4.2. Beneficios del aceite de chía en la salud .....	12
1.1.4.3. Marco regulatorio y usos actuales del aceite de chía.....	14
<b>1.2. Sistemas de vehiculización de compuestos bioactivos en alimentos .....</b>	<b>15</b>
1.2.1. Definición y propiedades .....	15
1.2.2. Clasificación.....	17
1.2.3. Sistemas de vehiculización a base de almidón.....	19
<b>1.3. Complejos de inclusión con amilosa.....</b>	<b>21</b>
1.3.1. Definición.....	21
1.3.2. Propiedades estructurales .....	22
1.3.3. Propiedades térmicas.....	24
1.3.4. Métodos de obtención de los complejos de inclusión .....	26
1.3.5. Métodos de caracterización de complejos de inclusión .....	30
1.3.5.1. Difracción de rayos X (DRX).....	30
1.3.5.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) .....	32
1.3.5.3. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	32
1.3.5.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	34
1.3.5.5. Eficiencia de complejación.....	36
1.3.5.6. Análisis termogravimétrico (TGA) .....	37
1.3.5.7. Digestibilidad <i>in vitro</i> .....	39

---

1.3.6. Aplicación de complejos de inclusión para el desarrollo de alimentos funcionales .....	40
<b>1.4. Hipótesis.....</b>	<b>43</b>
<b>1.5. Objetivos .....</b>	<b>44</b>
<b>Capítulo 2. Complejos de inclusión amilosa-ácidos grasos de aceite de chía formados con templado .....</b>	<b>46</b>
<b>2.1. Introducción .....</b>	<b>46</b>
2.1.1. Efecto del tipo de molécula lipídica.....	47
2.1.2. Efecto del tiempo y de la temperatura de templado .....	47
2.1.3. Efecto de la concentración de ligando.....	49
2.1.4. Efecto de la aplicación de tratamientos físicos: ultrasonido .....	50
<b>2.2. Materiales y métodos .....</b>	<b>51</b>
2.2.1. Materiales.....	51
2.2.2. Caracterización inicial del almidón de maíz de alta amilosa (HYLON VII): medición del contenido de amilosa .....	52
2.2.3. Caracterización inicial del aceite de chía .....	53
2.2.3.1. Ácidos grasos libres (FFA).....	53
2.2.3.2. Índice de peróxidos.....	53
2.2.3.3. Composición de ácidos grasos por cromatografía gaseosa (CG) .....	54
2.2.4. Hidrólisis enzimática del aceite de chía con lipasa pancreática porcina y de <i>Candida rugosa</i> .....	54
2.2.5. Extracción de la fracción lipídica (aceite de chía hidrolizado) .....	55
2.2.5.1. Extracción con solvente.....	55
2.2.5.2. Extracción ácida .....	56
2.2.6. Formación de complejos amilosa-ácidos grasos de aceite de chía con templado .....	56
2.2.6.1. Efecto del tiempo y de la temperatura de templado .....	56
2.2.6.2. Efecto de la relación hidrolizado de aceite de chía/almidón y del tratamiento con ultrasonido .....	57

---

2.2.7. Caracterización de los complejos de inclusión amilosa-ácidos grasos de chía .....	58
2.2.7.1. Rendimiento másico .....	58
2.2.7.2. Contenido de ácidos $\alpha$ -linolénico (C <sub>18:3</sub> ) y linoleico (C <sub>18:2</sub> ) por cromatografía gaseosa (CG) .....	58
2.2.7.3. Difracción de rayos X (DRX).....	59
2.2.7.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) .....	60
2.2.7.5. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) .....	60
2.2.7.6. Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	60
2.2.7.7. Análisis termogravimétrico (TGA) .....	60
2.2.8. Análisis estadístico .....	61
<b>2.3. Resultados y discusión .....</b>	<b>62</b>
2.3.1. Caracterización inicial del almidón de maíz de alta amilosa (HYLON VII) .....	62
2.3.2. Caracterización inicial del aceite de chía .....	62
2.3.3. Hidrólisis enzimática del aceite de chía y caracterización del hidrolizado extraído con solvente y por acidificación.....	64
<b>Parte I. Caracterización de los complejos de inclusión templados: efecto del tiempo y de la temperatura de templado .....</b>	<b>67</b>
2.3.4. Rendimiento másico y contenido de ácidos grasos.....	67
2.3.5. Difracción de rayos X (DRX) .....	70
2.3.6. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	73
2.3.7. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR).....	76
2.3.8. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	78
2.3.9. Análisis termogravimétrico (TGA) .....	80
<b>Parte II. Caracterización de complejos de inclusión templados: efecto de la relación aceite hidrolizado de chía/almidón y del tratamiento con ultrasonido .</b>	<b>83</b>
2.3.10. Rendimiento másico y contenido de ácidos grasos.....	83
2.3.11. Difracción de rayos X (DRX) .....	88

2.3.12. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	90
2.3.13. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR).....	92
2.3.14. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	94
2.3.15. Análisis termogravimétrico (TGA).....	96
<b>2.4. Conclusiones parciales.....</b>	<b>99</b>
<b>2.5. Difusión de resultados .....</b>	<b>100</b>
Publicaciones en Revistas Científicas.....	100
Presentaciones en Congresos y reuniones científicas .....	101
<b>Capítulo 3. Complejos de inclusión amilosa-ácidos grasos de aceite de chía formados sin templado .....</b>	<b>103</b>
<b>3.1. Introducción .....</b>	<b>103</b>
<b>3.2. Materiales y métodos .....</b>	<b>106</b>
3.2.1. Materiales.....	106
3.2.2. Caracterización inicial del aceite de chía.....	106
3.2.2.1. Ácidos grasos libres (FFA).....	106
3.2.2.2. Índice de peróxidos (PV).....	107
3.2.2.3. Composición de ácidos grasos por cromatografía gaseosa (CG) .....	107
3.2.3. Hidrólisis enzimática del aceite de chía.....	107
3.2.4. Formación de complejos de inclusión sin templado .....	107
3.2.5. Caracterización fisicoquímica de los complejos de inclusión amilosa-ácidos grasos de chía .....	108
3.2.5.1. Contenido de C <sub>18:3</sub> y C <sub>18:2</sub> por cromatografía gaseosa (CG) .....	108
3.2.5.2. Difracción de rayos X (DRX).....	108
3.2.5.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	108
3.2.5.4. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR).....	109
3.2.5.5. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	109
3.2.6. Estabilidad oxidativa de los complejos de inclusión bajo condiciones aceleradas de reacción.....	109

3.2.6.1. Análisis termogravimétrico (TGA) .....	110
3.2.6.2. Estabilidad oxidativa acelerada por Rancimat.....	110
3.2.6.3. Estabilidad de C <sub>18:3</sub> y C <sub>18:2</sub> a 90 °C.....	113
3.2.7. Análisis estadístico.....	113
<b>3.3. Resultados y discusión .....</b>	<b>113</b>
3.3.1. Caracterización inicial del aceite de chía y del hidrolizado.....	113
3.3.2. Rendimiento másico y contenido de C <sub>18:3</sub> y C <sub>18:2</sub> .....	115
3.3.3. Difracción de rayos X (DRX) .....	116
3.3.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	118
3.3.5. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR).....	121
3.3.6. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	122
3.3.7. Estabilidad oxidativa de los complejos de inclusión bajo condiciones aceleradas de reacción.....	124
3.3.7.1. Análisis termogravimétrico (TGA) .....	124
3.3.7.2. Estabilidad oxidativa por Rancimat.....	126
3.3.7.2.1. Estabilidad oxidativa acelerada determinada mediante Rancimat	126
3.3.7.2.2. Extrapolación del tiempo de inducción a 25 °C .....	130
3.3.7.3. Estabilidad de C <sub>18:3</sub> y C <sub>18:2</sub> a 90 °C.....	132
<b>3.4. Conclusiones parciales.....</b>	<b>135</b>
<b>3.5. Difusión de resultados .....</b>	<b>136</b>
Publicaciones en Revistas Científicas .....	136
Presentaciones en Congresos y reuniones científicas .....	136
<b>Capítulo 4. Aplicación de complejos de inclusión amilosa-ácidos grasos de aceite de chía en sopas instantáneas deshidratadas .....</b>	<b>138</b>
<b>4.1. Introducción .....</b>	<b>138</b>
4.1.1. Propiedades de los alimentos en polvo .....	139
4.1.2. Propiedades instantáneas de los alimentos en polvo.....	141
4.1.3. Propiedades reológicas.....	143

---

4.1.4. Incorporación de complejos de inclusión en sopas instantáneas.....	143
<b>4.2. Materiales y métodos .....</b>	<b>144</b>
4.2.1. Materiales.....	144
4.2.2. Preparación de las premezclas en polvo.....	145
4.2.3. Medición de la actividad acuosa ( $a_w$ ).....	146
4.2.4. Contenido de humedad.....	146
4.2.5. Contenido de C <sub>18:3</sub> y C <sub>18:2</sub> de las premezclas de sopa .....	147
4.2.6. Color.....	147
4.2.7. Densidad aireada y densidad compactada.....	148
4.2.8. Ángulo de reposo .....	148
4.2.9. Dispersabilidad.....	149
4.2.10. Distribución de tamaño de partículas y diámetros medios de las premezclas reconstituidas.....	150
4.2.11. Solubilidad .....	150
4.2.12. Propiedades reológicas.....	150
4.2.13. Evaluación sensorial.....	151
4.2.14. Ensayo de digestibilidad <i>in vitro</i> .....	153
4.2.14.1. Estudio de la liberación de ácido $\alpha$ -linolénico durante la digestión <i>in vitro</i> .....	154
4.2.14.2. Degradación del almidón durante la digestión <i>in vitro</i> .....	156
4.2.15. Análisis estadístico.....	157
<b>4.3. Resultados y discusión .....</b>	<b>157</b>
4.3.1. Actividad acuosa ( $a_w$ ) y contenido de humedad.....	157
4.3.2. Contenido de C <sub>18:3</sub> y C <sub>18:2</sub> de las premezclas de sopa .....	158
4.3.3. Color.....	159
4.3.4. Ángulo de reposo, índices de Carr y de Hausner .....	162
4.3.5. Solubilidad .....	164
4.3.6. Dispersabilidad, distribución de tamaño de partículas y diámetros medios	164

---

4.3.7. Propiedades reológicas.....	167
4.3.8. Evaluación sensorial.....	170
4.3.9. Ensayo de digestibilidad <i>in vitro</i> .....	171
<b>4.4. Conclusiones parciales.....</b>	<b>174</b>
<b>4.5. Difusión de resultados .....</b>	<b>175</b>
Presentaciones en Congresos y reuniones científicas .....	175
<b>CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>176</b>
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>179</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>180</b>

## **LISTADO DE ABREVIATURAS**

a*	Parámetro a* del sistema de determinación de color CIELab
AA	Ácido araquidónico (C <sub>20:4</sub> )
ADA	American Dietetic Association
ANMAT	Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
ANOVA	Análisis de varianza
AOCS	American Oil Chemists' Society
ATR- FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada
b*	Parámetro b del sistema de determinación de color CIELab
b. h.	Base húmeda
b. s.	Base seca
CAA	Código Alimentario Argentino
CI	Complejo de inclusión
CI10	Complejo de inclusión formado sin la aplicación de templado, con una relación inicial hidrolizado/almidón de 10% p/p
CI20	Complejo de inclusión formado sin la aplicación de templado, con una relación hidrolizado/almidón inicial de 20% p/p
CG	Cromatografía gaseosa
CLA	Ácido linoleico conjugado
DHA	Ácido docosahexaenoico (C <sub>22:6</sub> )
DNS	Ácido dinitrosalicílico
DRIFTS	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia difusa

DRX	Difracción de rayos X
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DTG	Termogravimetría diferencial
$\delta_a$	Densidad aireada
$\delta_c$	Densidad compactada
EA	Ácido elaídico
EPA	Ácido eicosapentaenoico (C <sub>20:5</sub> )
FAME	Ésteres metílicos de ácidos grasos
FDA	Food and Drug Administration
FFA	Ácidos grasos libres
GRAS	Generalmente reconocido como seguro
H	Hidrolizado de aceite de chía
HAMS	Almidón de maíz de alta amilosa
HHP	Altas presiones hidrostáticas
HPH	Homogeneización con alta presión
IC	Índice de Carr
IH	Índice de Hausner
L*	Parámetro L del sistema de determinación de color CIELab
L	Ácido linoleico (C <sub>18:2</sub> )
LCR	Lipasa de <i>Candida rugosa</i>
Ln	Ácido $\alpha$ -linolénico (C <sub>18:3</sub> )
LPP	Lipasa pancreática porcina

MUFA	Ácido graso monoinsaturado
n	Índice de comportamiento de flujo
O	Ácido oleico (C <sub>18:1</sub> )
O/W	Emulsión aceite en agua
O/W/O	Emulsión aceite en agua en aceite
P	Ácido palmítico (C <sub>16:0</sub> )
PUFA	Ácido graso poliinsaturado
PV	Índice de peróxidos
RS	Almidón resistente
S	Almidón
St	Ácido esteárico (C <sub>18:0</sub> )
S0	Premezcla de sopa instantánea comercial
S15	Premezcla de sopa instantánea comercial con 15% p/p de complejos de inclusión
S30	Premezcla de sopa instantánea comercial con 30% p/p de complejos de inclusión
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SFA	Ácido graso saturado
SGF	Fluido gástrico simulado
SIF	Fluido intestinal simulado
SSF	Fluido salival simulado
t	Tiempo
T	Temperatura
TAG	Triacilglicerol

T <sub>c</sub>	Temperatura de cristalización
T-CI	Complejo de inclusión templado durante 2 h a 90 °C
T-CI10	Complejo de inclusión templado durante 2 h a 90 °C, formado con una relación hidrolizado/almidón inicial de 10% p/p
T-CI20	Complejo de inclusión templado durante 2 h a 90 °C, formado con una relación hidrolizado/almidón inicial de 20% p/p
T-CI30	Complejo de inclusión templado durante 2 h a 90 °C, formado con una relación hidrolizado/almidón inicial de 30% p/p
TGA	Análisis termogravimétrico
t <sub>ind</sub>	Tiempo de inducción
Tn	Tonelada
T <sub>o</sub>	Temperatura de inicio de fusión ( <i>onset</i> )
T <sub>p</sub>	Temperatura de pico (°C)
U	Ultrasonido
UT-CI10	Complejo de inclusión templado durante 2 h a 90 °C (T) formado con la aplicación de tratamiento de ultrasonido (U) y con una relación hidrolizado/almidón inicial de 10% p/p
UT-CI20	Complejo de inclusión templado durante 2 h a 90 °C (T) formado con la aplicación de tratamiento de ultrasonido (U) y con una relación hidrolizado/almidón inicial de 20% p/p
UT-CI30	Complejo de inclusión templado durante 2 h a 90 °C (T) formado con la aplicación de tratamiento de ultrasonido (U) y con una relación hidrolizado/almidón inicial de 30% p/p
W/O	Emulsión agua en aceite
W/O/W	Emulsión agua en aceite en agua

# CAPITULO 1

## **Introducción**

---

## Capítulo 1. Introducción

### 1.1. La chía

#### 1.1.1. Historia

La chía (*Salvia hispanica* L.) es una planta anual herbácea, originaria del norte de Guatemala y sur de México (Grancieri et al., 2019). La palabra *chía* es una adaptación española de *chian*, originaria del náhuatl que significa aceitoso, y los Aztecas emplearon este término para referirse a todas las especies del género *Salvia* comestibles cuya característica principal es su alto contenido de aceite (Kulczyński et al., 2019; Sosa et al., 2017). En el período precolombino, la chía fue uno de los alimentos básicos de varias civilizaciones en Centroamérica, junto con el maíz y el frijol (Ayerza y Coates, 2009; Sosa et al., 2017). Sin embargo, luego de la conquista española, el cultivo y consumo de la chía prácticamente se extinguió por 500 años. Este hecho se atribuye a diferentes causas, incluyendo la disminución de la población mexicana, la sustitución de su área cultivada por especies vegetales y animales introducidas por los europeos y la modificación de la dieta como resultado de la disponibilidad de nuevos alimentos (Sosa-Baldivia et al., 2018). El cultivo de chía fue rescatado gracias a un pequeño grupo de agricultores situados en los estados mexicanos de Jalisco, Guerrero y Puebla, quienes conservaron la tradición de su uso (Sosa-Baldivia et al., 2018). La integración de la chía a la era moderna se inició en 1991 mediante el proyecto de investigación conocido como Proyecto Regional Noroeste Argentino (Ayerza y Coates, 1996). Dicho proyecto, se realizó en Argentina con el apoyo del gobierno de Estados Unidos, cuyo objetivo principal fue identificar e introducir en la producción comercial nuevos cultivos industriales que puedan ayudar a diversificar la producción en el noroeste argentino (Ayerza y Coates, 1996). El proyecto amplió el área cultivada de 500 ha establecidas en México en 1994 a 370.000 ha en 13 países en 2014 (Sosa-Baldivia et al., 2018). Hoy en día, la chía ha recuperado su alto valor como cultivo y alimento, consumiéndose en más de 30 países. Su producción se realiza en Australia, Bolivia, Colombia, Guatemala, Perú, Argentina, México, Paraguay, Ecuador, Nicaragua y Sudeste Asiático (Grancieri et al., 2019; Rodríguez et al., 2022; Sosa-Baldivia et al., 2018).

### 1.1.2. Descripción del cultivo y mercado

La planta de chía pertenece al orden *Lamiales*, familia *Lamiaceae*, subfamilia *Nepetoideae* y género *Salvia* (Hrnčič et al., 2020). Puede alcanzar aproximadamente 1 m de altura y posee hojas de 4-8 cm de largo y flores de color blanco o violeta (Grancieri et al., 2019) (**Figura 1.1**). La chía presenta un alto potencial productivo, estimado en 3140 kg/ha, si bien los rendimientos comerciales actuales (300-500 kg/ha) están muy por debajo de este valor. Esta brecha se relaciona con el escaso desarrollo de tecnologías agrícolas adaptadas a su cultivo. La obtención y adopción de variedades mejoradas, la fertilización adecuada, el manejo del suelo e integrado de plagas, aún en una fase incipiente de desarrollo, podrían elevar significativamente su productividad (Sosa-Baldivia et al., 2017).



**Figura 1.1.** Planta y flor violeta de chía (*Salvia hispanica* L.) cultivada durante un ensayo realizado en La Plata, Argentina. Fotos tomadas por Rodríguez, M. E.

La chía es sensible a las heladas y se desarrolla de manera óptima en climas tropicales y subtropicales, creciendo apropiadamente en latitudes que van desde aproximadamente 20° N a 25° S (Rodríguez et al., 2022). Es una planta que responde al

fotoperiodo, iniciando su fase reproductiva cuando la duración del día se acorta a un umbral específico (10,5-12,0 h) (Rodríguez et al., 2022). El principal objetivo del cultivo de chía es la producción de sus semillas, que pueden consumirse directamente o procesarse para obtener principalmente aceite.

El mercado global de semillas de chía se estima en 1,51 mil millones de dólares en 2024, con proyecciones que indican que alcanzará 2,93 mil millones de dólares en 2029. Esto representa una tasa de crecimiento anual compuesta de 14,19% durante el período previsto (2024-2029) (MordorIntelligence, 2024). Debido al aumento del conocimiento sobre los beneficios de las semillas de chía, es probable que el mercado experimente un gran crecimiento en el futuro cercano a nivel mundial. Estados Unidos y Australia siguen siendo los países con mayor demanda de semillas y otros productos a base de chía, pero hay otros mercados, como Reino Unido, Brasil, Chile y España, que han mostrado un aumento sustancial en su demanda (MordorIntelligence, 2024).

La producción comercial de chía ha estado concentrada en regiones específicas como Paraguay y Bolivia con 20000 y 15000 Tn, respectivamente (Orona-Tamayo y Paredes-López, 2024). Sin embargo, en los últimos cinco años, otros países como China, Canadá, Países Bajos, Austria y Alemania han superado a los países latinoamericanos en la exportación de esta semilla. En 2020, China emergió como un nuevo productor mundial de este cultivo, con exportaciones valuadas en aproximadamente 113 mil millones de dólares, seguida por Canadá como segundo exportador de semillas de chía con un valor de 83,5 mil millones de dólares (Orona-Tamayo y Paredes-López, 2024). A pesar de estos cambios en el mercado global, Paraguay, Bolivia, México, Perú y Argentina mantienen su importancia en el mercado, con una mayor experiencia en el cultivo de chía (Orona-Tamayo y Paredes-López, 2024).

### 1.1.3. Semilla de chía

#### 1.1.3.1. Composición y aspectos nutricionales

El fruto de la chía es típicamente un esquizocarpo consistente en lóculos indehiscentes que se separan para formar 4 mericarpios parciales denominados núculas, comúnmente conocidos como “semillas” (Ayerza y Coates, 2005). La semilla de chía presenta una forma elíptica, con un largo de 1-2 mm y una superficie suave y brillante

que puede ser blanca, negra, marrón, gris o con manchas negras irregulares (Grancieri et al., 2019) (**Figura 1.2**).



**Figura 1.2.** Semillas de chía. Foto tomada por Rodríguez, M. E.

En la **Tabla 1.1** se muestra la composición centesimal de la semilla de chía en comparación con la de otros cultivos ancestrales, publicada por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA, 2019).

**Tabla 1.1.** Composición centesimal (g/100 g) de semillas de chía, amaranto y quínoa (USDA, 2019)

	Chía	Amaranto	Quínoa
<b>Energía (kcal)</b>	486	384	385
<b>Proteína (g)</b>	11,4 - 22,7	10,4 - 14,2	9,5 - 14,2
<b>Lípidos totales (g)</b>	25,8 - 33,2	3,2 - 7,3	6,2 - 7,7
<b>Carbohidratos (g)</b>	42,1	68,8	69,5
<b>Fibra total (g)</b>	34,4	7,2	6,3
<b>Cenizas (g)</b>	4,8	2,3	2,0

Como puede observarse, la semilla de chía se caracteriza por su alto contenido de proteína, el cual se encuentra comprendido entre 11 y 22% (**Tabla 1.1**). Entre los aminoácidos mayoritarios que componen dichas proteínas se incluyen tanto los esenciales, principalmente arginina (2,14 g/100g), leucina (1,37 g/100g), fenilalanina (1,02 g/100g), valina (0,95 g/100g) y lisina (0,97 g/100g), como los no esenciales, ácido glutámico (3,50 g/100g), serina (1,05 g/100g), alanina (1,04 g/100g) y glicina

(0,94 g/100g), entre otros (USDA, 2019). Otro aspecto importante a resaltar es que la semilla de chía no contiene gluten, por lo que se la considera apta para celíacos. En comparación con el amaranto y la quínoa, la semilla de chía presenta un mayor contenido de fibra total (34,4 g/100 g) (**Tabla 1.1**). La fracción insoluble representa 85-93% de la fibra total, mientras que la fracción soluble está comprendida entre 7 y 15% (Hrnčič et al., 2020). La semilla de chía también se caracteriza por presentar un alto contenido de aceite, el cual se encuentra en el rango de 25-34% (Ixtaina et al., 2011; USDA, 2019), motivo por el cual es considerado un cultivo oleaginoso. La característica principal de dicho aceite es su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, por sus siglas en inglés) (ácidos  $\alpha$ -linolénico y linoleico). Su composición y propiedades fisicoquímicas se describen en más detalle en la Sección 1.1.4.

Adicionalmente, las semillas de chía contienen minerales, tales como fósforo, calcio, potasio y magnesio, y vitaminas, principalmente A, C, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y B<sub>3</sub> (**Tabla 1.2**).

**Tabla 1.2** Contenido de vitaminas y minerales de la semilla de chía (USDA, 2019)

Nutriente	Contenido cada 100 g de semilla
<b>Vitaminas</b>	
Vitamina A (UI)	54
Ácido ascórbico (Vitamina C) (mg)	1,60
Tiamina (Vitamina B <sub>1</sub> ) (mg)	0,62
Riboflavina (Vitamina B <sub>2</sub> ) (mg)	0,17
Niacina (Vitamina B <sub>3</sub> ) (mg)	8,83
$\alpha$ -tocoferol (Vitamina E) (mg)	0,50
<b>Minerales</b>	
Fósforo (P) (mg)	860
Calcio (Ca) (mg)	631
Potasio (K) (mg)	407
Magnesio (Mg) (mg)	335
Sodio (Na) (mg)	16
Hierro (Fe)	7,72
Zinc (Zn)	4,58
Manganeso (Mn)	2,72
Cobre (Cu)	0,924

UI: unidades internacionales

Las semillas de chía poseen además altas concentraciones de antioxidantes naturales, tales como tocoferoles, fitoesteroles, carotenoides y compuestos fenólicos (Hrnčič et al., 2020). En la **Tabla 1.3** se muestra el contenido de distintos compuestos con propiedades antioxidantes presentes en la semilla de chía.

**Tabla 1.3.** Contenido de polifenoles e isoflavonas de la semilla de chía (Kulczyński et al., 2019)

Compuesto		Contenido (µg/g semilla)
Polifenoles	Ácido gálico	11
	Ácido cafeico	27
	Ácido clorogénico	4,68
	Éster etílico de ácido protocatechuico	0,74
	Ácido ferúlico	Trazas
	Quercetina	0,17
	Kaempferol	0,013
	Kaempferol 3-O-glucósido	0,029
	Epicatequina	0,029
	Rutina	0,22
	Ácido <i>p</i> -coumárico	0,24
	Apigenina	0,005
Isoflavonas	Daidzeína	6,6
	Genisteína	5,1
	Genistina	3,4
	Glicitina	1,4
	Gliciteína	0,5

Asimismo, se ha registrado también la presencia de tocoferoles (~95 mg/kg de semilla), principalmente  $\gamma$ -tocoferol (~80 mg/kg de semilla) y  $\delta$ -tocoferol (~10 mg/kg de semilla). No se ha detectado la presencia de  $\alpha$  y  $\beta$ -tocoferol en semillas comerciales de Argentina y Guatemala (Ixtaina, 2010).

Los distintos compuestos mencionados anteriormente le otorgan a la chía un gran valor nutricional. Esto ha aumentado el interés en esta especie vegetal como ingrediente

con propiedades beneficiosas para la salud, observándose en los últimos años una tendencia creciente en la cantidad y diversidad de productos elaborados con chía.

### 1.1.3.2. Usos actuales de la semilla de chía

A partir de la semilla de chía se pueden obtener distintos productos, los cuales son de gran interés por sus excelentes propiedades tanto desde el punto de vista nutricional como tecnológico. La semilla de chía se utiliza tanto como semilla entera o como harina. La *harina de chía*, es el producto proveniente de la molienda de la semilla debiendo presentar esta última características de semillas sanas, limpias y bien conservadas, que han sido sometidas a prensado para la remoción parcial o prácticamente total del aceite que contienen (Código Alimentario Argentino, 2023b). El Artículo 1407 bis del Capítulo XIX del Código Alimentario Argentino (CAA) la clasifica en harina parcialmente desgrasada y harina desgrasada. La primera, se caracteriza por presentar un contenido máximo de 18% de aceite y 35% de fibra total y un mínimo de 20% de proteína, mientras que la segunda contiene un máximo de 7% de aceite y 52% de fibra total y un contenido de proteína mínimo de 29% (Código Alimentario Argentino, 2023b). A partir de la semilla también se obtiene el *aceite de chía*, cuya composición y propiedades físicoquímicas se describen en mayor detalle en la Sección 1.1.4. Adicionalmente, esta semilla contiene aproximadamente un 6% de *mucilago* (Reyes-Caudillo et al., 2008). Se trata de un heteropolisacárido de alto peso molecular formado por residuos de D-xilosa, D-manosa, L-arabinosa, D-glucosa y ácidos galacturónico y glucurónico (da Silveira Ramos et al., 2021; Lin et al., 1994). El mucilago es una sustancia de aspecto gelatinoso que se libera cuando las semillas se sumergen en agua y que permanece unida a éstas formando una cápsula transparente (Lin et al., 1994; Muñoz et al., 2012) (**Figura 1.3**).



**Figura 1.3.** Mucilago liberado por semillas de chía en agua. Foto tomada por Rodríguez, M. E.

El mucílago representa la fracción de fibra soluble de la semilla de chía (Reyes-Caudillo et al., 2008). Es capaz de generar soluciones de alta viscosidad, incluso a bajas concentraciones (de Campo et al., 2017), lo que permite su uso como agente espesante, estabilizante y encapsulante (Copado et al., 2021; de Campo et al., 2017; Hrnčič et al., 2020). Además, se lo ha utilizado como sustituto del huevo o aceite en tortas, obteniéndose un producto con características sensoriales aceptables (Borneo et al., 2010; Gallo et al., 2020).

Tanto las semillas como la harina de chía se usan para la elaboración de diversos productos comerciales, incluyendo panes, galletitas, mermeladas, pastas secas. El alto contenido de ácidos grasos omega-3 ( $\omega$ -3), proteína y fibra le aportan un alto valor nutricional, convirtiéndolo en un alimento y cultivo importante en varias regiones del mundo (Sosa et al., 2017). Actualmente, su uso en la nutrición humana es tan amplio, que diversas universidades, centros de investigación y empresas privadas están desarrollando tecnologías para su aprovechamiento como fuente de ácidos grasos  $\omega$ -3, proteína y fibra en bebidas, complementos alimenticios, alimentos procesados y cosméticos (Sosa-Baldivia et al., 2018).

### 1.1.4. Aceite de chía

#### 1.1.4.1. Composición y propiedades fisicoquímicas

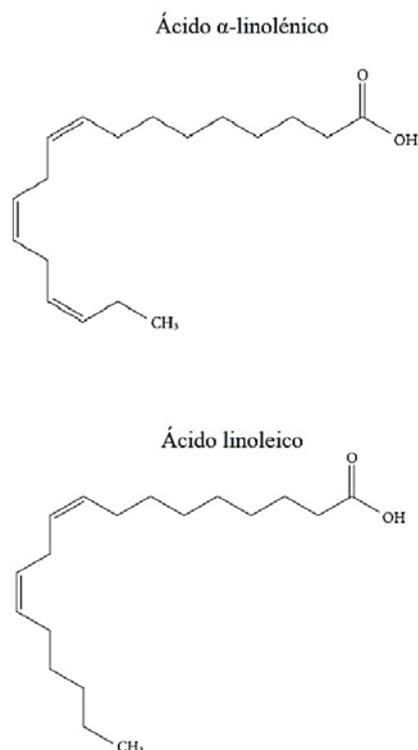
El Artículo 527 bis del Capítulo VII del Código Alimentario Argentino define al *aceite de chía de uso industrial* como “*aquel obtenido de semillas de *Salvia hispanica* L. por prensado en frío por procedimientos mecánicos únicamente, sin la aplicación de calor, que podrá haber sido purificado por sedimentación, filtración y/o centrifugación*”. A su vez, el aceite de chía deberá responder a las exigencias mostradas en la **Tabla 1.4**.

**Tabla 1.4.** Exigencias del Código Alimentario Argentino (Artículo 527 bis, Capítulo VII) para el aceite de chía de uso industrial

<b>Especificación</b>	
<b>Aspecto</b>	Color amarillo claro, brillante, libre de materiales extraños
<b>Sabor y aroma</b>	Característico del aceite, sabor y olor suave, sin indicios de rancidez u otra anomalía en los ensayos organolépticos
<b>Acidez libre</b>	Máx.: 1,0% como ácido oleico
<b>Índice de yodo</b>	205-215 (g I <sub>2</sub> /100 g aceite)
<b>Índice de refracción (20 °C)</b>	1,4813 - 1,4818
<b>Índice de peróxidos</b>	Máx.: 10,0 miliequivalentes de oxígeno/kg
<b>Impurezas insolubles</b>	Máx.: 0,05%
<b>Ácidos grasos (%)</b>	
Palmítico (C <sub>16:0</sub> )	5,5 - 9,2
Esteárico (C <sub>18:0</sub> )	2,5 - 4,1
Oleico (C <sub>18:1</sub> )	5,4 - 9,1
Linoleico (C <sub>18:2</sub> )	14,3 - 23,8
$\alpha$ -linolénico (C <sub>18:3</sub> )	44,7 - 74,6
<b>Relación <i>n-6/n-3</i></b>	0,35

*n-6/n-3*: ácido linoleico/ $\alpha$ -linolénico

Tal como se mencionó en la Sección 1.1.3.1, la semilla de chía se caracteriza por su alto contenido de aceite (~30% p/p). Tanto el contenido de aceite como su composición de ácidos grasos varían de acuerdo a la localización geográfica del cultivo (Ayerza, 1995). Como puede observarse, el aceite de chía está formado principalmente por PUFAs (~85%), entre los que se incluye el ácido  $\alpha$ -linolénico (ácido *cis,cis,cis*-9,12,15-octadecatrienoico, C<sub>18:3</sub>, ~65%) y el ácido linoleico (ácido *cis,cis*-9,12-octadecadienoico, C<sub>18:2</sub>, ~20%) (Ixtaina et al., 2011). El primero de ellos, contiene tres insaturaciones en su cadena hidrocarbonada y pertenece al grupo de los ácidos grasos  $\omega$ -3 mientras que, el segundo, posee dos insaturaciones, y se trata de un ácido graso omega-6 ( $\omega$ -6) (**Figura 1.4**).



**Figura 1.4.** Estructura de los ácidos grasos *cis,cis,cis*-9,12,15-octadecatrienoico ( $\alpha$ -linolénico, C<sub>18:3</sub>,  $\omega$ -3) y *cis,cis*-9,12-octadecadienoico (linoleico, C<sub>18:2</sub>,  $\omega$ -6)

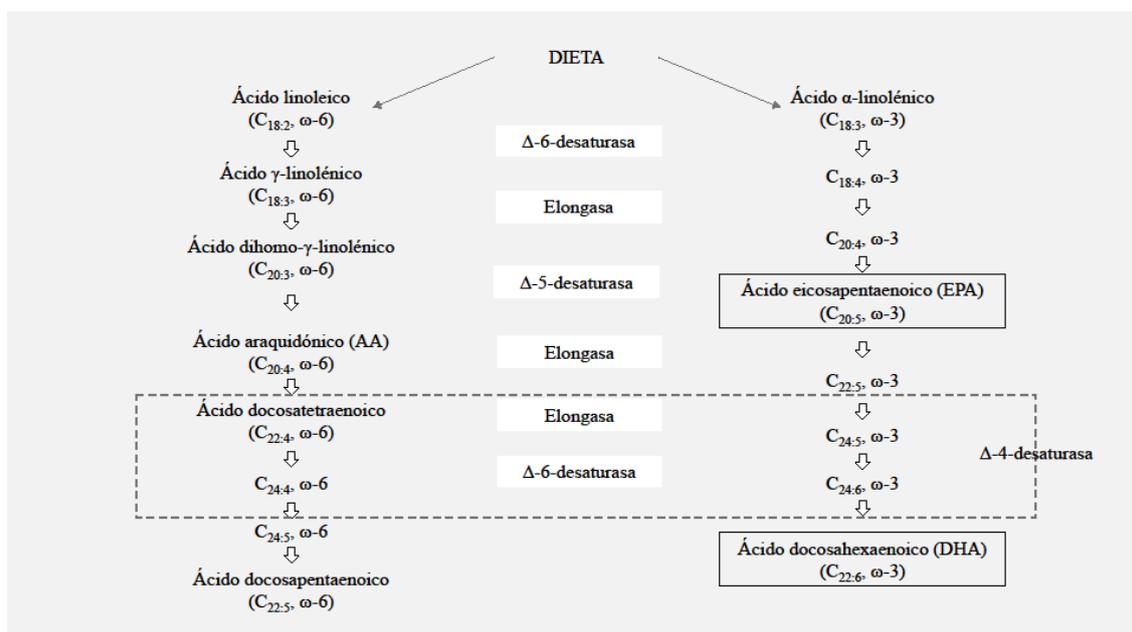
El C<sub>18:2</sub> abunda en la naturaleza y se encuentra en las semillas de la mayoría de las plantas, excepto el coco, el cacao y la palma. El C<sub>18:3</sub>, por otro lado, se encuentra en los cloroplastos de los vegetales de hojas verdes y en las semillas de lino, colza, chía, perilla y nueces (Simopoulos, 2009). Además de los ácidos mayoritarios mencionados anteriormente, el aceite de chía también posee en menor proporción los ácidos palmítico (ácido hexadecanoico, C<sub>16:0</sub>, 6%), esteárico (ácido octadecanoico, C<sub>18:0</sub>, 3%) y oleico (ácido *cis*-9-octadecenoico, C<sub>18:1</sub>, 5%) (Ixtaina et al., 2011). Asimismo, se han identificado doce triacilgliceroles diferentes, siendo el LnLnLn, LnLnL, LnLL, LnLnP, LnLO y LnLP los que representan alrededor del 87-95% del total (Ixtaina et al., 2011). A su vez, se ha cuantificado aproximadamente un 1% de material insaponificable (Ixtaina et al., 2011).

La composición de los aceites influye en sus propiedades fisicoquímicas y en su estabilidad. En el caso del aceite de chía, el alto grado de insaturación hace que éste presente un alto índice de iodo (205-215 g I<sub>2</sub>/100 g aceite) (**Tabla 1.4**). Adicionalmente, los dobles enlaces *cis* C=C presentes en las cadenas hidrocarbonadas reaccionan

fácilmente con el oxígeno, por lo que el alto porcentaje de PUFAs del aceite de chía lo hace altamente susceptible a la oxidación lipídica (Ixtaina et al., 2011). Esta reacción produce no sólo una disminución de la calidad nutricional del aceite, sino también un descenso de su calidad sensorial, ya que da origen a diversos productos (aldehídos, cetonas, alcoholes, polímeros, etc.) que generan sabores y aromas indeseables y le confieren al aceite el característico “olor a pescado”.

#### 1.1.4.2. Beneficios del aceite de chía en la salud

Los ácidos grasos mayoritarios del aceite de chía ( $\alpha$ -linolénico y linoleico) son considerados esenciales, es decir, que no pueden ser sintetizados por el cuerpo humano, por lo que deben ser suministrados a través de la dieta. Ambos PUFAs son metabolizados formando ácidos de cadena más larga, de 20 y 22 átomos de carbono. El ácido linoleico es metabolizado a ácido araquidónico (AA) ( $C_{20:4}$ ,  $\omega$ -6), mientras que, el ácido  $\alpha$ -linolénico, a ácido eicosapentaenoico (EPA,  $C_{20:5}$ ,  $\omega$ -3) y docosahexaenoico (DHA,  $C_{22:6}$ ,  $\omega$ -3) (Simopoulos, 2009) (**Figura 1.5**). Esto ocurre a través de una serie de reacciones en las que intervienen enzimas desaturasas y elongasas (**Figura 1.5**).



**Figura 1.5.** Formación de ácidos araquidónico, eicosapentaenoico y docosahexaenoico a partir de los ácidos linoleico y  $\alpha$ -linolénico (Simopoulos, 2009)

El EPA presenta un relevante rol cardioprotector, mientras que el DHA contribuye al desarrollo del sistema nervioso central y visual, especialmente durante la vida

intrauterina y los primeros años de vida y actúa como un potente agente neuroprotector frente al envejecimiento y el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Morales et al., 2012). Los ácidos grasos  $\omega$ -3 se destacan por sus beneficios en la salud cardiovascular, diabetes, artritis, cáncer, enfermedades psiquiátricas y neurodegenerativas, enfermedad inflamatoria intestinal, entre otras, siendo cada día más recomendado el consumo de EPA y DHA tanto para la prevención como el tratamiento de estas enfermedades (Morales et al., 2012). Estos dos ácidos grasos se encuentran en el aceite de pescados grasos, en mariscos y algas. A su vez, el cuerpo humano puede convertir ácido linoleico a ácido araquidónico y ácido  $\alpha$ -linolénico a EPA y DHA (**Figura 1.5**), pero las células de los mamíferos no pueden convertir los ácidos  $\omega$ -6 en  $\omega$ -3, dado que carecen de la enzima  $\Delta$ -3 desaturasa. Si bien las enzimas  $\Delta$ -4 y  $\Delta$ -6 desaturasas tienen mayor afinidad por los ácidos  $\omega$ -3 que por los  $\omega$ -6, la alta ingesta de ácido linoleico interfiere con la desaturación y elongación del  $\alpha$ -linolénico (Simopoulos, 2009). Esto trae como resultado una mayor formación de ácido araquidónico que EPA. Durante los últimos años, la dieta occidental se ha caracterizado por un aumento del consumo de ácidos grasos  $\omega$ -6 a expensas de los  $\omega$ -3, resultando en una alta relación  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 (10-20/1), lo que promueve el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, inflamatorias y autoinmunes e interfiere con el desarrollo cerebral normal (Simopoulos, 2011). El balance entre dichos ácidos grasos es importante para mantener la homeostasis, el desarrollo normal y la salud mental durante todo el ciclo de vida (Simopoulos, 2009). Se considera que la proporción  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 debería estar comprendida entre 1:1 y 2:1 (Simopoulos, 2011). En este sentido, para alcanzar dicho valor, se ha promovido la disminución de la ingesta de aceites ricos en ácidos grasos  $\omega$ -6 (girasol, maíz, soja, entre otros) y el aumento del consumo de aceites ricos en ácidos grasos  $\omega$ -3 (aceite de pescado, chía, lino, canola). Una alternativa nutricional para enfrentar este importante déficit de ácidos grasos  $\omega$ -3 son los suplementos dietarios a base de aceite de pescado, disponibles en formatos como cápsulas de gelatina, tabletas, polvos o líquidos (Garti y McClements, 2012). Sin embargo, el consumo de estos productos se ha asociado a trastornos gastrointestinales, lo que ha limitado así su consumo (Garti y McClements, 2012; Morales et al., 2012). En este contexto, ha surgido un gran interés por el suministro de ácidos grasos  $\omega$ -3 encapsulados a través de su incorporación en alimentos y bebidas y, especialmente, por el ácido  $\alpha$ -linolénico proveniente de fuentes de origen vegetal (**Tabla 1.5**).

**Tabla 1.5.** Principales fuentes vegetales de ácido  $\alpha$ -linolénico (Morales et al., 2012)

Fuente vegetal	Contenido de ácido $\alpha$ -linolénico (% ésteres metílicos)
Aceite de chía	65
Aceite de lino	54
Aceite de sachá inchi	46
Aceite de camelina	38
Aceite de rosa mosqueta	26 - 37
Aceite de canola	9 - 11
Aceite de soja	7

Como puede observarse en la **Tabla 1.5**, entre las distintas fuentes vegetales de ácido  $\alpha$ -linolénico, la chía se destaca por poseer el mayor tenor. Otro aspecto importante a resaltar, además del contenido porcentual de  $C_{18:3}$ , es que el aceite de chía presenta una proporción  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 de aproximadamente 0,3, valor que es menor en comparación con otros aceites vegetales comunes, como el aceite de soja (6,6), oliva (10,0), maíz (58,0) y canola (2,2) (Belitz et al., 2009; Hu y Jacobsen, 2016).

#### 1.1.4.3. Marco regulatorio y usos actuales del aceite de chía

El Artículo 527 bis del Capítulo VII del Código Alimentario Argentino permite el empleo del aceite de chía en no más del 10% en mezcla con otro aceite comestible, bajo la denominación de “*aceite de chía para uso industrial*”. El Artículo 1381 bis del Capítulo XVII autoriza su uso en suplementos dietarios, por lo que en la actualidad el aceite de chía se comercializa como tal.

Los productos alimenticios comercializados actualmente, están elaborados mayoritariamente con semilla entera o harina de chía. Sin embargo, la elaboración de alimentos que contengan aceite de chía en su formulación que presenten la estabilidad y calidad adecuadas, está restringida por la elevada susceptibilidad e inestabilidad de dicho aceite. Asimismo, el aceite de chía no se puede incorporar directamente en una matriz acuosa, dado que es inmiscible con el agua, por lo que tiende a separarse. En este contexto, la encapsulación ha surgido como una estrategia para permitir la incorporación de diversos ingredientes en distintas matrices, incluyendo alimentos, cosméticos o fármacos. En los últimos años, se han llevado a cabo diversas investigaciones tendientes a

desarrollar sistemas de encapsulación de aceite de chía, para poder ser incorporados en la formulación de alimentos sin afectar la calidad y que, a su vez, los protejan durante el procesamiento, almacenamiento y consumo (Bordón et al., 2021; Copado et al., 2017, 2021; Piloni et al., 2022).

## 1.2. Sistemas de vehiculización de compuestos bioactivos en alimentos

### 1.2.1. Definición y propiedades

Los *compuestos bioactivos* se definen como aquellos componentes tanto esenciales como no esenciales que se encuentran en la naturaleza, son parte de la cadena alimentaria y han demostrado tener un efecto en la salud humana (Biesalski et al., 2009). La Asociación Dietética Americana (ADA, por sus siglas en inglés) define a los compuestos bioactivos como constituyentes fisiológicamente activos de los alimentos o suplementos dietarios derivados tanto de fuentes animales como vegetales, incluidos aquellos necesarios para satisfacer las necesidades básicas de nutrición humana, que han demostrado que poseen un rol en la salud y que son seguros para el consumo humano, en usos como alimento y suplemento dietario (Saldanha, 2004). De acuerdo con estas definiciones, dentro de éstos se incluyen vitaminas, ácidos grasos, péptidos, polifenoles, fibra dietaria, carotenoides, esteroides, probióticos, entre otros. Un concepto más amplio es el de *compuesto activo*, que abarca tanto los compuestos con efectos beneficiosos para la salud mencionados anteriormente como aquellos que cumplen alguna función en el alimento, tales como ciertos aromas, antioxidantes y antimicrobianos.

Sin embargo, muchos de estos compuestos no pueden ser incorporados directamente en los alimentos, por lo que deben ser encapsulados en algún tipo de sistema de vehiculización antes de poder integrarlos exitosamente en una matriz alimentaria. El término *encapsulación* se refiere al proceso de atrapar un componente específico (compuesto activo) dentro de una matriz (encapsulante). Dicha matriz puede estar formada por uno o múltiples componentes (proteínas, surfactantes, carbohidratos, lípidos, minerales y/o agua) y puede tener una estructura simple (homogénea) o compleja (heterogénea), dependiendo de los materiales y procedimientos utilizados para su fabricación (Garti y McClements, 2012). Por otra parte, un *sistema de vehiculización (delivery system)* es un sistema diseñado para encapsular, vehiculizar y liberar uno o más compuestos activos (Garti y McClements, 2012). Los mismos, son desarrollados

principalmente para superar dificultades que limitan la incorporación de estos compuestos en productos comerciales (McClements, 2018). En este sentido, según Garti y McClements (2012), un sistema de vehiculización puede ser utilizado para:

- Proteger ingredientes sensibles (sabores, ácidos grasos poliinsaturados, enzimas, probióticos) frente a factores externos (por ejemplo, ácidos, oxígeno, humedad, luz, etc.).
- Convertir líquidos en polvos para facilitar su manipulación y mejorar su estabilidad durante el almacenamiento (usar polvos para la vehiculización de aceites).
- Aislar el ingrediente de interés de otros ingredientes para prevenir interacciones indeseables durante el procesamiento o almacenamiento del alimento.
- Mejorar el valor nutricional de un alimento sin afectar el sabor, aroma o textura (por ejemplo, encapsular aceite de pescado para suministrar ácidos grasos  $\omega$ -3).
- Controlar la liberación de aromas o sabores deseables y/o enmascarar aromas o sabores indeseables para mejorar la calidad sensorial del alimento. Por ejemplo, controlar la liberación del sabor a menta durante la masticación de un chicle.
- Liberar ingredientes en el momento apropiado durante el procesamiento o almacenamiento, o permitir su liberación controlada, sostenida o demorada. Por ejemplo, liberación de un agente antimicrobiano encapsulado o liberación de un compuesto bioactivo en un sitio específico *in vivo*.

El mayor desafío en la elaboración de un sistema de vehiculización es asegurar la protección del material encapsulado hasta el momento en que se desencadena su liberación por el efecto de un estímulo externo. Dicho estímulo puede ser humedad, pH, temperatura, agitación, acción enzimática, entre otros (Garti y McClements, 2012). A su vez, se debe considerar que tanto el material encapsulante como el proceso empleados sean compatibles con el producto final en el que el sistema se aplicará.

Para poder ser utilizado en alimentos, un sistema de vehiculización debe presentar ciertas características principales, entre las que se incluye (Garti y McClements, 2012):

- *Capacidad de carga y retención*: el sistema debería ser capaz de encapsular una elevada cantidad del compuesto activo por unidad de masa del material vehiculizante y debería retener eficientemente el compuesto encapsulado hasta el momento en que dicho compuesto necesita ser liberado.
- *Grado alimentario*: el sistema de vehiculización debe estar completamente fabricado utilizando ingredientes y condiciones de procesamiento que estén aprobados en el país

donde se comercializará el alimento. Los ingredientes de grado alimentario más comunes que pueden usarse para elaborar sistemas de vehiculización son los lípidos, surfactantes, proteínas y carbohidratos.

- *Producción económica*: el sistema debe ser elaborado a partir de ingredientes de bajo costo.
- *Compatibilidad con la matriz del alimento*: el sistema no debe afectar negativamente la apariencia, textura, sabor o vida útil del producto alimenticio.
- *Protección contra la degradación*: debe proteger al ingrediente encapsulado contra las posibles formas de degradación química o física.
- *Mecanismo de liberación*: se refiere a la liberación del compuesto bioactivo en un sitio de acción particular a una velocidad controlada o en respuesta a un estímulo ambiental específico (pH, fuerza iónica, actividad enzimática o temperatura). Este estímulo, puede ocurrir durante el almacenamiento del alimento (por ejemplo, liberación de un compuesto antimicrobiano o antioxidante) o podría ocurrir dentro del cuerpo humano (por ejemplo, liberación de un bioactivo en la boca, estómago, intestino delgado, intestino grueso o colon).
- *Biodisponibilidad y bioactividad*: el sistema de vehiculización debería mejorar o al menos no afectar la biodisponibilidad y la bioactividad del compuesto encapsulado.

### 1.2.2. Clasificación

Los sistemas de vehiculización pueden clasificarse según distintos criterios, tales como el tipo de material utilizado para su fabricación (proteínas, lípidos, polisacáridos, surfactantes) o el tipo de estructura. En el ámbito alimentario, estos sistemas se agrupan comúnmente en diversas categorías principales, basadas en su estructura (Garti y McClements, 2012):

- *Liposomas*: son vesículas esféricas con una bicapa lipídica, comúnmente formada por una dispersión de fosfolípidos en agua. Pueden encapsular compuestos tanto hidrofílicos como lipofílicos. Los primeros, pueden ser transportados en la fase acuosa interna, rodeados por la bicapa lipídica mientras que, los segundos, se ubican dentro de la bicapa lipídica.
- *Micelas*: están formadas por surfactantes, es decir, por moléculas que poseen una cabeza hidrofílica unida a una cola hidrofóbica, tales como monoacilgliceroles o lecitinas.

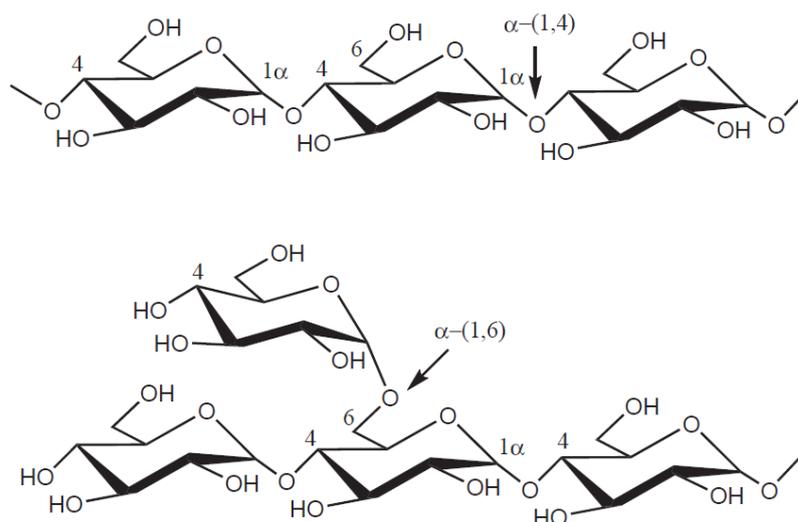
Estas estructuras se forman espontáneamente cuando la concentración de surfactante excede la concentración micelar crítica, lo que produce una agregación de las moléculas orientando las cabezas hacia el exterior y las colas hidrofóbicas hacia el interior. El material lipofílico encapsulado puede formar parte de la capa de surfactante o se puede ubicar en el interior de la micela.

- *Emulsiones*: consisten en al menos dos líquidos inmiscibles (comúnmente aceite y agua), estando uno de los líquidos dispersos como pequeñas gotas esféricas (fase dispersa) en el otro (fase continua) (McClements et al., 2009). Las mismas pueden estar estabilizadas por surfactantes de bajo peso molecular (por ejemplo, fosfolípidos) o por polímeros con propiedades emulsificantes (proteínas, almidones, etc.). Convencionalmente, las emulsiones se forman a través de la homogeneización de los dos líquidos inmiscibles junto con el agente emulsificante. Existen distintos tipos de emulsiones, tales como las emulsiones simples aceite en agua (O/W, por sus siglas en inglés) o agua en aceite (W/O) o las emulsiones múltiples, tales como las de aceite en agua en aceite (O/W/O) y las de agua en aceite en agua (W/O/W). Adicionalmente, existen las emulsiones multicapa, en las que las gotas dispersas están cubiertas por láminas interfaciales formadas utilizando el método de deposición electrostática, conocido como capa sobre capa “*layer-by-layer*”, lo cual mejora la estabilidad y funcionalidad de las emulsiones convencionales (McClements et al., 2009).
- *Partículas lipídicas sólidas*: consisten en partículas lipídicas cubiertas por un emulsificante dispersas en una fase acuosa continua (McClements et al., 2009). Los lípidos utilizados son los triacilgliceroles purificados, las mezclas de glicéridos o las ceras, debiendo ser al menos parcialmente sólidos a temperatura ambiente. Este tipo de sistema se forma a través de la homogeneización de una fase oleosa y una acuosa en presencia de un emulsificante, a una temperatura superior al punto de fusión de la fase lipídica. Luego, la emulsión se enfría de modo que algunos o todos los lípidos dentro de las gotas cristalizan.
- *Coacervados*: se forman a partir de la mezcla de dos tipos de polímeros con carga opuesta, los cuales se asocian a través de fuerzas de atracción electrostática. A diferencia de los precipitados, los coacervados se caracterizan por presentar estructuras abiertas, con un alto contenido de agua (>70%) (McClements et al., 2009). Entre los polímeros que se utilizan para formar coacervados se incluyen las pectinas, carboximetilcelulosa y alginato, los cuales pueden usarse como polímeros aniónicos, y el quitosano, que actúa como polímero catiónico (Bhandari et al., 2013; Fathi et al., 2014).

- *Geles*: se obtienen a partir de una solución de polímero (proteína o polisacárido) a la que se le modifican las condiciones (pH, fuerza iónica, temperatura) para promover la asociación de los polímeros entre sí. El material a ser encapsulado puede ser mezclado con la solución inicial, previo a la inducción de la asociación entre moléculas poliméricas. De este modo se forman estructuras, tales como partículas de hidrogel, que se utilizan como sistemas de provisión de distintos compuestos activos.
- *Complejos de inclusión molecular*: en este tipo de sistemas, el ingrediente a encapsular se atrapa dentro del centro hueco de una molécula, que puede ser una ciclodextrina o una hélice de amilosa. La parte externa del complejo formado es hidrofílica, mientras que la interna es hidrofóbica, lo que permite atrapar moléculas lipofílicas. Los complejos de inclusión con amilosa serán tratados con mayor detalle en la Sección 1.3, dado que es el sistema estudiado en el presente trabajo de Tesis.

### 1.2.3. Sistemas de vehiculización a base de almidón

El almidón es el carbohidrato de reserva más abundante en las plantas, presente en forma de gránulos en la mayoría de las semillas de cereales y raíces de tubérculos. El tamaño, forma y cristalinidad de dichos gránulos varía dependiendo del origen del cultivo (Eliasson, 2004). Los estudios microscópicos han revelado que los gránulos poseen una organización estructural interna en la que se presentan en forma intermitente regiones amorfas y regiones lamelares cristalinas (Gallant et al., 1997). El almidón está formado por amilopectina y amilosa (Alcázar-Alay y Meireles, 2015). La amilosa es la fracción lineal del almidón, la cual consiste en unidades de D-glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ -1,4 y representa aproximadamente el 20-30% de los almidones normales, mientras que la amilopectina es la fracción ramificada, formada por unidades de D-glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6, la cual representa alrededor del 70-80% del almidón (Rostamabadi et al., 2019b) (**Figura 1.6**).



**Figura 1.6.** Estructura molecular de la amilosa (con enlaces  $\alpha$ -1,4) y amilopectina (con enlaces  $\alpha$ -1,6) (Eliasson, 2004)

El almidón, ha despertado un gran interés como sistema de vehiculización de ingredientes en alimentos debido a sus atributos únicos, tales como biodegradabilidad, no toxicidad, gran disponibilidad, bajo costo y sabor neutro (Rostamabadi et al., 2019b). Además, los sistemas a base de almidón presentan una mayor estabilidad térmica en comparación con aquellos a base de proteínas o lípidos, los cuales pueden desnaturalizarse o fundirse cuando son expuestos a altas temperaturas (Fathi et al., 2014). Estos sistemas se han clasificado en varios grupos principales (Rostamabadi et al., 2019b):

- *Nanopartículas y nanocristales de almidón:* entre las nanopartículas se incluyen en general estructuras con formas circulares, tubulares y ovaladas, obtenidas a partir de los gránulos de almidón a través de la aplicación de distintos métodos de preparación por medio de dispositivos que permiten una degradación de los gránulos hasta sus unidades a nanoescala, obteniéndose partículas con diferentes características físicas y químicas (Campelo et al., 2020; Kim et al., 2015). Los nanocristales, en cambio, se obtienen luego de la exposición de los gránulos a distintos tratamientos de degradación física o química, eliminando las fracciones amorfas (Campelo et al., 2020; Kim et al., 2015). Ejemplos de estos sistemas son las nanopartículas formadas por hidrólisis ácida y ultrasonido, empleadas para la vehiculización de antioxidantes (Shabana et al., 2019) y las

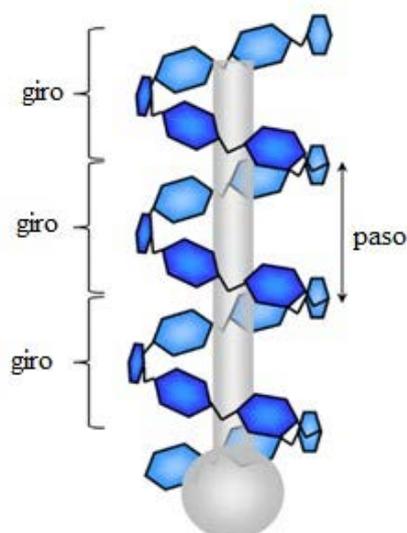
micropartículas porosas obtenidas por tratamiento enzimático de almidón, empleadas como vehículos de aceite de oliva (Lei et al., 2018) y de chía (Piloni et al., 2022).

- *Nanofibras de almidón*: se fabrican principalmente a través del método de *electrospinning* y han sido exitosamente empleadas para la vehiculización de sustancias bioactivas (Kong y Ziegler, 2014a). Sus propiedades de liberación pueden ajustarse a través del control de la configuración y morfología de las nanofibras.
- *Estructuras de amilosa nanohelicoidales*: en este grupo se incluyen los complejos de inclusión con amilosa, los cuales serán tratados con mayor profundidad en la Sección siguiente.

### 1.3. Complejos de inclusión con amilosa

#### 1.3.1. Definición

Las cadenas lineales de amilosa tienen la capacidad de interactuar con moléculas hidrofóbicas (ligando) formando una hélice simple con orientación hacia la izquierda, en la cual el ligando se localiza en el interior hidrofóbico de la hélice, lo que se conoce como *complejo de inclusión (CI)*. En la **Figura 1.7**, se representa un complejo de inclusión formado entre la amilosa con una molécula lipídica (ácido graso o monoacilglicerol), en el que la cabeza polar se ubica fuera de la hélice, mientras que la cadena alifática se sitúa en la cavidad helicoidal.



**Figura 1.7.** Representación de una hélice de amilosa formando un complejo de inclusión con un ligando (ácido graso o monoacilglicerol) (Putseys et al., 2010)

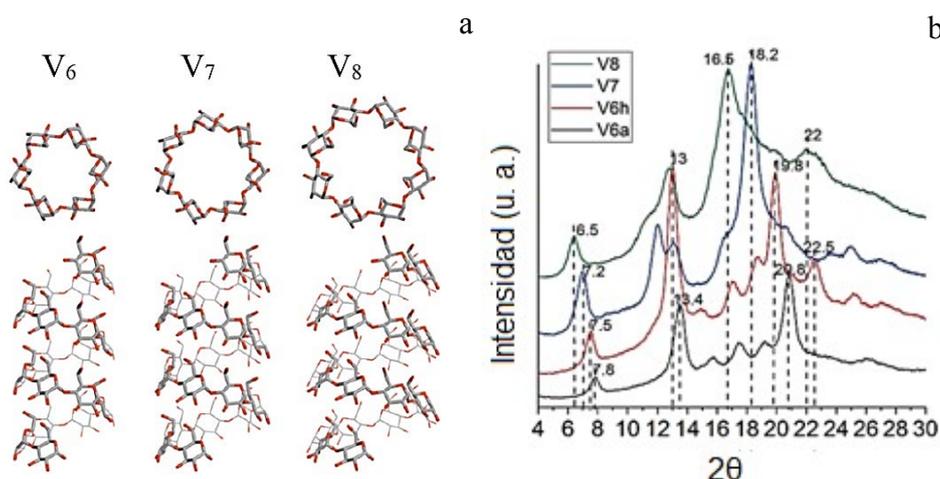
La estructura del CI se encuentra estabilizada por fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno, los cuales ocurren entre los giros a lo largo de la hélice (**Figura 1.7**), mientras que la unión amilosa-ligando ocurre principalmente a través de interacciones hidrofóbicas, pero también se han descrito fuerzas de Van der Waals (Putseys et al., 2010).

Uno de los ejemplos más comunes de complejo de inclusión es el complejo amilosa-I<sub>3</sub><sup>-</sup>, el cual produce una coloración azul característica que se utiliza para diversas aplicaciones, tales como la detección de la presencia de almidón, como indicador en titulaciones, entre otras. En el caso de los complejos amilosa-lípido, se sabe que los mismos están presentes naturalmente en el almidón, pero también se pueden formar durante la gelatinización del almidón en presencia de lípidos (Eliasson, 1994; Putseys et al., 2010). Por ejemplo, durante el tratamiento de almidones de maíz, trigo y arroz se ha confirmado la formación de CI con los ácidos grasos y fosfolípidos que se encuentran naturalmente presentes (Zobel, 1988b). A diferencia de la gelatinización del almidón, la formación de complejo de inclusión es un proceso reversible (Eliasson, 1994; Putseys et al., 2010).

### 1.3.2. Propiedades estructurales

Luego de la asociación inicial entre la amilosa y el ligando, dependiendo de las condiciones de reacción (t, T, método de obtención, entre otras), los complejos pueden adquirir un cierto grado de ordenamiento. Esto da origen a una estructura semicristalina, la cual se caracteriza por un patrón típico de difracción de rayos-X, conocido como patrón tipo V. El origen de la designación V se atribuye a que al principio se creía que el patrón representaba almidón gelatinizado (Verkleisterungsspektrum, en alemán) (Zobel, 1988b). Sin embargo, posteriormente se descubrió que dicho patrón se debía al complejo formado con el alcohol utilizado para deshidratar el almidón gelatinizado, pero la designación “V” aún se sigue utilizando (Zobel, 1988b).

El diámetro y dimensiones de la hélice de amilosa están determinados por el tipo de ligando (tamaño y forma) y por la cantidad de moléculas de agua unidas a las unidades de glucosa (Putseys et al., 2010). En general, la hélice consiste en tres vueltas o giros (**Figura 1.7**), cada una de las cuales puede adoptar diferentes dimensiones, conteniendo 6 (V<sub>6</sub>), 7 (V<sub>7</sub>) u 8 (V<sub>8</sub>) residuos de glucosa por giro (**Figura 1.8a**) (Gao et al., 2020).



**Figura 1.8.** (a) Representación de las vistas superior y lateral de las hélices V<sub>6</sub>, V<sub>7</sub> y V<sub>8</sub> de amilosa (Nishiyama et al., 2010) y (b) espectros de difracción de rayos-X de las formas V<sub>6a</sub>, V<sub>6h</sub>, V<sub>7</sub> y V<sub>8</sub> (Guo et al., 2022)

La estructura V-amilosa también puede clasificarse dependiendo de las dimensiones de la celda unidad y de la localización del ligando. En el caso de la forma hidratada (V<sub>h</sub> o V<sub>6I</sub>), la hélice contiene 6 unidades de glucosa, y el ligando reside sólo dentro de la hélice (Putseys et al., 2010). El patrón de difracción de rayos-X (DRX) de dicha estructura se caracteriza por dos reflexiones máximas a  $\sim 13$  y  $19,8^\circ$  ( $2\theta$ ) y una de menor intensidad a  $7,5^\circ$  (**Figura 1.8b**). Tras la deshidratación, la forma V<sub>h</sub> se convierte en V<sub>a</sub> (anhidra), caracterizada por una celda unidad de dimensiones menores debido a la ausencia de moléculas de agua. La estructura V<sub>6II</sub> se caracteriza por una celda unidad de dimensiones mayores, y el ligando se localiza tanto en la cavidad de amilosa como también en el espacio intersticial entre hélices, mientras que la estructura V<sub>6III</sub> posee aún más espacio intersticial que la forma V<sub>6II</sub>, y el ligando puede residir tanto dentro como entre las hélices (Putseys et al., 2010).

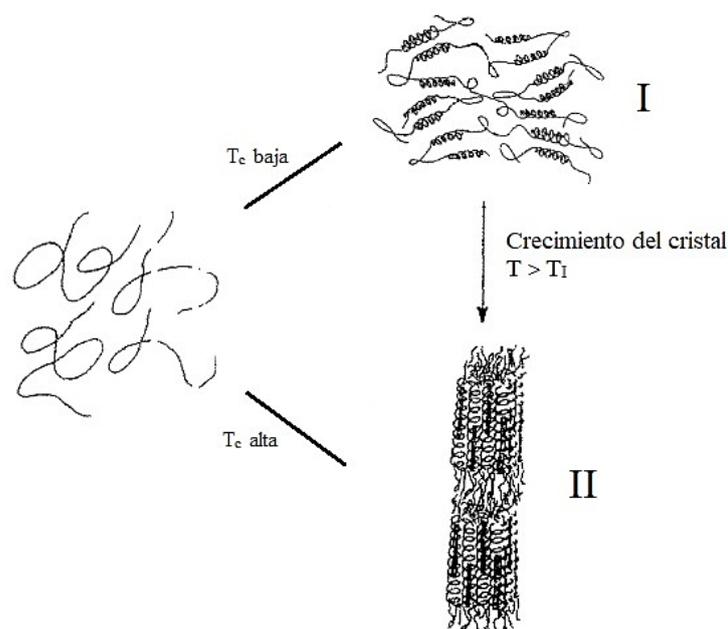
El *grado de cristalinidad*, definido como el porcentaje de regiones cristalinas en el material total, es un parámetro importante dado que el mismo determina las propiedades físicas, mecánicas y tecnológicas de los materiales (Lopez-Rubio, Flanagan, Gilbert, et al., 2008). En el caso de los complejos de inclusión, la cristalinidad se ha analizado cualitativamente por comparación visual de las intensidades de pico de los difractogramas de rayos-X (Li y Lim, 2016; Seo et al., 2015; Seok et al., 2019), o bien se

ha medido cuantitativamente por deconvolución de los difractogramas, ajuste e integración de los picos (Guo et al., 2018; Liu et al., 2018; Zhao et al., 2019). Este parámetro se ha relacionado positivamente con la habilidad de complejación (Kong & Ziegler, 2014; Li & Lim, 2016; Liu et al., 2018; Seok et al., 2019) y con la cantidad de ligando contenido en los CI (Seo et al., 2015). El mismo, depende de la capacidad de las hélices individuales de amilosa para empaquetarse adoptando una disposición ordenada que, a su vez, está determinada por la estructura del ligando, ya que aquellos ligandos más grandes tienen mayor capacidad de alterar el empaquetamiento de las hélices, resultando en una menor cristalinidad (Gao et al., 2020; Lay Ma et al., 2011).

### 1.3.3. Propiedades térmicas

Las propiedades térmicas de los complejos de inclusión pueden estudiarse por calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés). Cuando una dispersión acuosa de complejos de inclusión se somete a un programa de calentamiento, pueden registrarse una o más transiciones térmicas (endotermas), originadas por la desagregación/desorden de las hélices de amilosa y por la disociación de las interacciones amilosa-ligando (Karkalas et al., 1995). Los parámetros térmicos incluyen la *entalpía de fusión* ( $\Delta H$ ) y las *temperaturas de inicio (onset)* ( $T_o$ ) y *de pico* ( $T_p$ ). La temperatura de pico se encuentra generalmente comprendida en el rango de 80 a 120 °C, dependiendo principalmente de la estructura del complejo. Dicha estructura, a su vez, depende del tipo de ligando y de las condiciones de preparación (Kong et al., 2019). La entalpía de fusión se ha considerado una medida cuantitativa de la cantidad de complejo formado, es decir, un mayor  $\Delta H$  se ha asociado con una mayor formación de CI (Chao et al., 2018; Kang et al., 2020; Kong y Ziegler, 2014; Seo et al., 2015; Tufvesson et al., 2003b, 2003a; Zhang et al., 2020). Sin embargo, no puede considerarse una medida precisa, dado que algunas muestras pueden contener amilosa libre y/o diferentes estados polimórficos intermedios, originando variaciones en los valores de  $\Delta H$  (Karkalas et al., 1995). Adicionalmente, este parámetro se ha relacionado con la cantidad de ligando complejado (Gunenc et al., 2018; Park et al., 2018; Shi et al., 2019; Wang et al., 2019; Zhou et al., 2021) y al grado de cristalinidad (Kong et al., 2019; Kong & Ziegler, 2014; Liu et al., 2018; Marinopoulou et al., 2019; Xu et al., 2013).

En los CI se han identificado dos tipos de formas polimórficas (I y II), dependiendo de la temperatura de fusión. Los polimorfos tipo I poseen una menor temperatura de fusión, se obtienen bajo temperaturas de reacción  $\leq 60$  °C y presentan una orientación al azar de los segmentos helicoidales. Los polimorfos tipo II (con una mayor  $T_p$ ), se forman bajo temperaturas más altas de cristalización ( $\geq 90$  °C) y presentan una organización lamelar de segmentos helicoidales (**Figura 1.9**) (Biliaderis y Galloway, 1989).



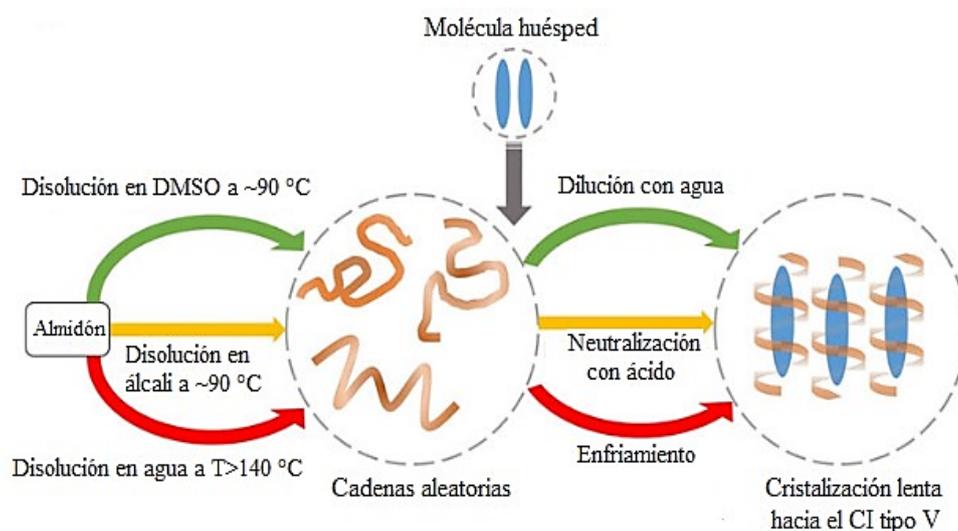
**Figura 1.9.** Mecanismo propuesto para la formación de los polimorfos I y II de complejos de inclusión (Biliaderis y Galloway, 1989). T<sub>c</sub>: temperatura de cristalización

Durante años, ha sido ampliamente aceptado que sólo los complejos tipo II dan evidencia de regiones cristalinas y muestran un típico patrón de difracción tipo V, mientras que los tipo I presentan un pequeño registro cristalográfico (Biliaderis y Galloway, 1989). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que complejos obtenidos a temperaturas menores a 60 °C también presentaron un patrón semicristalino tipo V (Marinopoulou, Papastergiadis, Raphaelides, et al., 2016b; Seo et al., 2015). Adicionalmente, en una investigación más reciente se ha propuesto la existencia de tres formas (I<sub>a</sub>, I<sub>b</sub> y II), las cuales difieren no sólo en la cristalinidad, sino también en el tamaño de cristal y en el arreglo del ligando dentro de la hélice (Kong et al., 2019). Las formas I<sub>a</sub> y I<sub>b</sub> se obtienen bajo  $T \leq 60$  °C y contienen una cadena alquílica residiendo en un segmento

helicoidal, el cual se acomoda formando complejos no cristalinos (I<sub>a</sub>) y cristalinos (I<sub>b</sub>) (Kong et al., 2019). La forma II, en cambio, se obtiene a  $T \geq 90$  °C y consiste en dos moléculas huésped residiendo dentro de la cavidad helicoidal y se caracteriza por una estructura cristalina ordenada con una temperatura de disociación mayor que la de la forma I (Kong et al., 2019). Además de las condiciones de reacción, la estructura de la molécula huésped complejada también determina las propiedades térmicas de los CI. La temperatura de pico de los CI se asocia con el espesor lamelar (Kong et al., 2019; Shi et al., 2019) el cual, a su vez, está mayormente influenciado por la estructura del ligando. Aquellos ligandos cuya estructura molecular favorece las interacciones hidrofóbicas con la amilosa (cadena alquílica larga, sección transversal pequeña), generalmente forman CI con una mayor estabilidad térmica (mayor  $T_p$ ) (Gao et al., 2020, 2021; Lay Ma et al., 2011; Zhang et al., 2020).

#### 1.3.4. Métodos de obtención de los complejos de inclusión

Los métodos de obtención de los CI pueden clasificarse en clásicos y alternativos. Los primeros, consisten principalmente en la disolución inicial del material complejante (almidón o amilosa), seguida de la adición del ligando. Posteriormente, los complejos se separan como precipitados utilizando diversas técnicas, las cuales varían según cada método. Los métodos más comúnmente utilizados a escala laboratorio para la formación de CI son el método del dimetilsulfóxido (DMSO), el alcalino y el de alta temperatura, como se muestran en la **Figura 1.10**.



**Figura 1.10.** Representación de los métodos clásicos de obtención de los complejos de inclusión (Tan y Kong, 2020). CI: complejo de inclusión

Así, el primer paso del proceso de formación de CI consiste en la disolución del almidón o amilosa. Las condiciones necesarias para la completa disolución del material complejante a fin de lograr una efectiva disociación de las cadenas y obtener un estado de orientación al azar de las mismas dependerán del contenido de amilosa de dicho material. La formación de CI se ha llevado a cabo utilizando amilosa extraída de diferentes fuentes (papa, arveja, mandioca, etc.), almidones con contenido variable de amilosa (almidón ceroso < normal < alto en amilosa) y almidones modificados (hidrolizados, oxidados, etc.) (Di Marco et al., 2022). La amilosa pura tiene un alto costo de producción ya que su extracción a partir del almidón es un proceso complicado y costoso (Kong y Ziegler, 2014b; Marinopoulou et al., 2021), por lo que no es adecuada para la formación de CI a gran escala. El almidón de maíz con alto contenido de amilosa (HAMS, por sus siglas en inglés) está disponible comercialmente en grandes cantidades y a precios bajos, lo que lo convierte en la fuente más adecuada de amilosa para producir grandes cantidades de CI (Fanta et al., 2015). Además, el HAMS es generalmente reconocido como seguro (GRAS, por sus siglas en inglés) por la Food and Drug Administration (FDA). En el caso de almidones con alto contenido de amilosa, para lograr una completa disolución se requiere la aplicación de altas temperaturas ( $>100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) o de la utilización de soluciones de álcali o DMSO. En el *método de DMSO* (**Figura 1.10**), el almidón o amilosa se disuelve en una solución acuosa de DMSO (ej. 95% v/v) a  $\sim 90\text{ }^{\circ}\text{C}$ , seguido de la adición del ligando. Los complejos formados se separan por precipitación a través de la incorporación de agua. En el *método alcalino*, también conocido como KOH/HCl, el almidón o amilosa se disuelve en una solución acuosa de KOH (0,01-0,1 M) y posteriormente se mezcla con el ligando a una temperatura determinada (**Figura 1.10**). Los CI formados se separan a través de la acidificación de la dispersión hasta  $\text{pH}\sim 4,6$ , seguido de centrifugación. El *método de alta temperatura* consiste en el calentamiento de una dispersión acuosa de almidón o amilosa a una temperatura superior a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , seguido del mezclado con la molécula huésped a una temperatura inferior. Seguidamente, la dispersión se enfría, lo que provoca la separación y precipitación de los CI formados (**Figura 1.10**).

Por otra parte, los métodos alternativos para la producción de CI surgen en respuesta a la necesidad de aplicar tecnologías verdes emergentes en el campo de la ciencia de los alimentos a fin de evitar el uso de solventes y adaptarse a la escala industrial. Kong & Ziegler (2014) desarrollaron el *método de V-amilosa preformada*, el cual consiste en la formación de hélices “vacías” de V-amilosa, a la que luego se le

adiciona el ligando de interés, insertándose dentro de la hélice. Las ventajas de este método consisten en que se evita el desperdicio del material huésped y la exposición del mismo a altas temperaturas durante el proceso de formación y, además, la complejación es rápida cuando se mezclan el ligando con la V-amilosa preformada, lo que lo convierte en un método apropiado para la complejación de ligandos sensibles. Este método se ha utilizado para la complejación de ascorbil palmitato (Kong y Ziegler, 2014b) y mentol (Shi et al., 2019).

También se ha estudiado la aplicación del método de *secado por aspersion* (*spray drying*) para la formación de CI. Bamidele et al. (2019) utilizaron este método para la obtención de complejos entre almidón de maíz y de alta amilosa con ascorbil palmitato, encontrando que la encapsulación de este compuesto se produjo tanto por complejación como por atrapamiento físico dentro de la matriz de almidón. Además, se ha llevado a cabo la producción a escala piloto de complejos de ácidos grasos con almidón de maíz pregelatinizado (Marinopoulou, Karageorgiou, et al., 2019) y almidón de tapioca (Marinopoulou et al., 2021) mediante secado por aspersion. La efectiva complejación ocurrió antes del proceso de secado por aspersion, durante la preparación del material de alimentación y estos CI demostraron ser estables durante el proceso de secado. El tiempo de residencia en la cámara de secado fue aparentemente breve (<10 s) y la evaporación del agua se produjo a temperaturas inferiores o cercanas a la temperatura de disociación de los complejos, evitando así cualquier degradación (Marinopoulou et al., 2021; Marinopoulou, Karageorgiou, et al., 2019). Este método podría ofrecer la posibilidad de producir a escala industrial CI con compuestos bioactivos sensibles a la degradación térmica u oxidativa (Marinopoulou et al., 2021; Marinopoulou, Karageorgiou, et al., 2019).

La *cocción por chorro de vapor* (*steam jet cooking*) es un proceso ampliamente utilizado en la industria del almidón, en el que dispersiones acuosas de almidón se bombean a un equipo donde se calientan instantáneamente bajo condiciones de alta temperatura y alto cizallamiento (Fanta et al., 2015). Este método es considerado práctico y escalable, permitiendo la preparación de complejos en cantidades lo suficientemente grandes como para evaluar sus posibles aplicaciones y así permitir su uso en productos de consumo (Fanta et al., 2015). Los CI tipo V de amilosa-palmitato de sodio se formaron en dispersiones acuosas mediante este método y luego se aislaron como un material sólido en grandes cantidades mediante secado por aspersion (Fanta et al., 2010). En un estudio posterior, se empleó la cocción por chorro de vapor para preparar partículas de complejos

de amilosa-ácido oleico (Fanta et al., 2015). Las bajas concentraciones de almidón y el rápido enfriamiento de las dispersiones permitieron la formación de nanopartículas más pequeñas, con diámetros que oscilaban entre 63 y 375 nm (Fanta et al., 2015). Este método también fue utilizado para la complejación de un derivado lipofílico del ácido ferúlico (ferulato de octadecilo) con almidón de maíz de alta amilosa (Kenar et al., 2016). El producto obtenido mostró un patrón tipo V y una temperatura de disociación alrededor de 94 °C, mientras que no se observó evidencia de estructura tipo V en el precipitado formado entre HAMS con ácido ferúlico (Kenar et al., 2016). Estos resultados indicaron que tanto la lipofilización como la cocción con chorro de vapor permitieron la complejación exitosa de este compuesto bioactivo.

Los tratamientos con altas presiones también se han utilizado para la formación de complejos de inclusión. La *homogeneización con alta presión* (HPH, por sus siglas en inglés) es capaz de inducir fuertes efectos de cizallamiento y cavitación que pueden disgregar los gránulos de almidón y liberar la amilosa (Chen et al., 2017, 2018), así como mejorar la dispersabilidad del ligando en la dispersión del almidón (Meng et al., 2014; Oyeyinka et al., 2016). Esto aumenta la interacción amilosa-ligando, lo que conduce a una complejación exitosa de lípidos, tales como el monoestearato de glicerilo (Chen et al., 2017, 2018) y los ácidos grasos (Guo et al., 2021; Lesmes et al., 2008; Meng et al., 2014; Oyeyinka et al., 2016). La capacidad de formación de complejos con ácidos grasos bajo HPH depende de diferentes factores. Los ácidos grasos saturados mostraron mayor capacidad complejante que los insaturados debido a la presencia de dobles enlaces en estos últimos que dificultan su acceso a la hélice de amilosa (Oyeyinka et al., 2016). Sin embargo, otro trabajo de investigación ha demostrado que el ácido linoleico tiene una mejor capacidad complejante que los ácidos grasos saturados (Meng et al., 2014). La conformación también influye en la capacidad de complejación, ya que el ácido *trans* oleico ha mostrado encajar mejor en la hélice de amilosa que su isómero *cis* (Guo et al., 2021). El aumento de la concentración de ácidos grasos mejoró la formación de complejos por HPH, dando lugar a CI con mayor estabilidad térmica y una estructura cristalina ordenada (Guo et al., 2021). El tratamiento con *alta presión hidrostática* (HHP, por sus siglas en inglés) es un método novedoso que promueve cambios estructurales en el almidón, con la consecuente modificación de sus propiedades fisicoquímicas y funcionales (Guo, Zeng, Lu, et al., 2015; Guo, Zeng, Zhang, et al., 2015). Se han formado complejos de amilosa con ácido linoleico y  $\alpha$ -linolénico utilizando tratamiento de HHP (500 MPa-40 °C) (Le-Bail et al., 2015a). Otro trabajo de investigación ha demostrado que

el aumento de la longitud de la cadena alifática de los ácidos grasos saturados resultó en una disminución de la cristalinidad y del  $\Delta H$  de los CI amilosa-ácidos grasos formados por debajo de 500 MPa, debido al efecto de impedimento estérico (Guo et al., 2018). Las características distintivas del tratamiento con HHP son la utilización de bajas temperaturas y la rápida producción que pueden prevenir la oxidación del ligando (Guo et al., 2018).

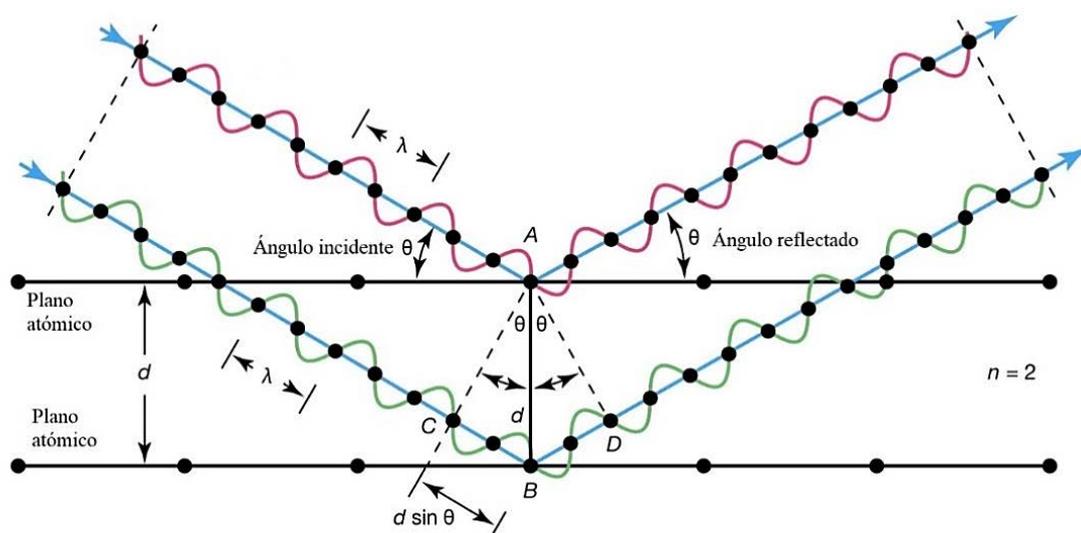
Durante la *extrusión* del almidón, la combinación de calor y cizallamiento hace que se hinche y altere la estructura granular cristalina nativa, facilitando así la liberación de la amilosa. La adición de glicerol y ácidos grasos ha permitido la formación de CI mediante este proceso (Raphaelides et al., 2012). El uso de almidón pregelatinizado ha facilitado la interacción amilosa-ácido graso, dado que la amilosa ya se encuentra liberada de los gránulos de almidón previo a la extrusión (Raphaelides et al., 2015). Esto permitió la complejación de los ácidos mirístico y palmítico a temperaturas de procesamiento inferiores a 100 °C y  $t < 100$  s, lo que ampliaría el uso del método de extrusión para la producción continua de CI con moléculas huésped sensibles al tratamiento térmico (Raphaelides et al., 2015). Una investigación reciente ha demostrado que el grado de insaturación de los ácidos grasos influye en la efectividad de la complejación durante la extrusión, presentando el ácido esteárico mayor capacidad para interactuar con la amilosa que el ácido oleico (Cervantes-Ramírez et al., 2020).

### 1.3.5. Métodos de caracterización de complejos de inclusión

#### 1.3.5.1. Difracción de rayos X (DRX)

La difracción de rayos X es una técnica no destructiva utilizada para la caracterización de materiales cristalinos y semicristalinos. En un difractómetro, los rayos X se generan en un tubo de rayos catódicos a través del calentamiento de un filamento para producir electrones. Estos electrones son acelerados mediante la aplicación de voltaje y dirigidos para bombardear la muestra. Este proceso produce un espectro característico de rayos X, donde  $K_{\alpha}$  es uno de sus componentes principales (Bunaciu et al., 2015). La longitud de onda de los rayos X es característica de cada material, siendo Cu el más común ( $CuK_{\alpha} = 0,154$  nm). Los rayos generados pasan a través de un filtro para producir radiación monocromática y son direccionados hacia la muestra, registrándose la intensidad de los rayos X reflejados a medida que, tanto la muestra como

el detector, se rotan en un ángulo  $2\theta$ . Cuando los rayos inciden en un ángulo tal que satisface la ley de Bragg, se produce una interferencia constructiva y aparece un pico de máxima intensidad (**Figura 1.11**).



**Figura 1.11.** Representación de la Ley de Bragg (Britannica, 2024)

Así, conociendo el ángulo de incidencia ( $2\theta$ ) correspondiente a dicha difracción, se puede calcular la distancia interplanar entre átomos a partir de la ley de Bragg (**Ecuación 1.1**):

$$n \times \lambda = 2 \times d \times \sin \theta \quad \text{Ecuación 1.1}$$

Donde,  $n$  es un número entero,  $\lambda$  es la longitud de onda de la radiación (por ejemplo,  $\text{CuK}\alpha_1 = 0,154 \text{ nm}$ ),  $d$  es la distancia entre los planos de la red cristalina y  $\theta$  es el ángulo de incidencia correspondiente a las intensidades máximas de reflexión.

Para obtener un patrón típico de polvos, los datos se colectan en un rango ( $2\theta$ ) comprendido entre  $5$  y  $70^\circ$  (Bunaciu et al., 2015). Los datos obtenidos sobre las posiciones de los picos de máxima reflexión y las intensidades permiten la identificación y caracterización de materiales, medición de la pureza, cristalinidad, entre otros. En el caso de los complejos de inclusión, el análisis de difracción de rayos X provee evidencia

crystallográfica de la formación de la estructura tipo V (Sección 1.3.2), por lo que se utiliza para la confirmación de la efectiva complejación de la molécula huésped.

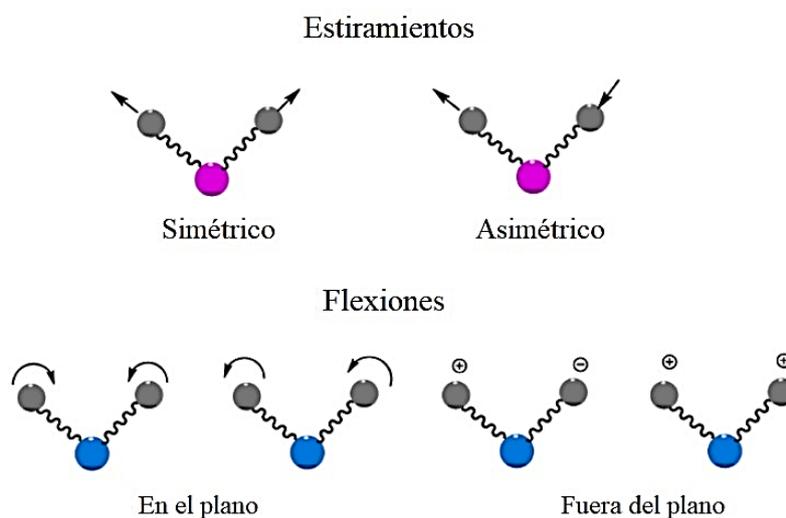
#### 1.3.5.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica de análisis térmico en la cual se mide la cantidad de energía absorbida (proceso endotérmico) o liberada (proceso exotérmico) durante cambios físicos y/o químicos que ocurren en los materiales cuando éstos son sometidos a un cambio de temperatura. La cantidad de calor liberado o absorbido se mide en base a una diferencia de temperatura entre la muestra y un material de referencia (Gill et al., 2010). Según el mecanismo de operación, se lo puede clasificar en DSC de flujo de calor (*heat-flux DSC*) y DSC de balance de potencia (*power-compensated DSC*). En el primero, tanto la muestra (colocada en una cápsula cerrada) como una cápsula vacía de referencia se colocan dentro de un horno y se registra la diferencia de temperatura ( $\Delta T$ ) entre la muestra y la referencia en función de la temperatura o del tiempo. A partir de esta información, se calcula el flujo de calor. En el segundo, en cambio, la muestra y la referencia se colocan en hornos separados y se registra la diferencia de potencia necesaria para mantenerlas a igual temperatura en función del tiempo o la temperatura (Gill et al., 2010). A partir del gráfico obtenido por esta metodología (termograma) se puede obtener información sobre distintos procesos, tales como fusión, cristalización, estabilidad oxidativa, transición vítrea, etc. La calorimetría diferencial de barrido es una técnica ampliamente utilizada para el estudio de las propiedades térmicas de los complejos de inclusión, principalmente como método complementario a la difracción de rayos X para la confirmación de la formación del complejo, así como para conocer el tipo de forma polimórfica presente (ver Sección 1.3.3).

#### 1.3.5.3. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía infrarroja se basa en la absorción o reflexión de la radiación electromagnética que oscila en longitudes de onda ( $\lambda$ ) entre 0,78 y 1000  $\mu\text{m}$  (Mendes y Duarte, 2021). La unidad de frecuencia comúnmente usada en el espectro IR es el número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ), que corresponde a la inversa de la longitud de onda ( $1/\lambda$ ). La región infrarroja del espectro electromagnético generalmente se subdivide en tres zonas: IR cercano (12800-4000  $\text{cm}^{-1}$ ), IR medio (4000-200  $\text{cm}^{-1}$ ) e IR lejano (200-10  $\text{cm}^{-1}$ ). En una

molécula, la absorción de la radiación infrarroja media produce dos modos de vibración principales, ya sea estiramientos (simétricos o asimétricos) o flexiones (en el mismo plano o fuera del plano) (**Figura 1.12**). De este modo, el espectro obtenido presenta varias bandas de absorción o transmisión, cuyo número de onda es característico del modo vibracional de los grupos funcionales presentes en la muestra en estudio.



**Figura 1.12.** Principales modos vibracionales de estiramiento y flexión molecular (Mendes y Duarte, 2021)

Para la presentación de la muestra en la espectroscopía vibracional se pueden usar distintas técnicas: transmisión, reflectancia total atenuada (ATR, por sus siglas en inglés) y reflectancia difusa (DRIFTS). Las técnicas de reflexión se basan en la reflexión del haz infrarrojo luego de entrar en contacto con la muestra. En el caso del ATR, el cual es el empleado en el presente trabajo, el haz infrarrojo se dirige hacia un cristal, cuya reflectancia interna crea una onda evanescente que se extiende hacia la muestra colocada en contacto con el cristal. En las regiones del espectro donde la muestra absorbe energía, la onda se atenuará y el detector registra el haz de IR atenuado como una señal, que luego se usa para generar el espectro IR (Mendes y Duarte, 2021). Las principales ventajas del ATR son que no requiere preparación de la muestra, ya que la misma se coloca directamente sobre el cristal, permitiendo un muestreo rápido y fácil y, además, requiere una cantidad muy pequeña de muestra.

En el caso de los complejos de inclusión, las bandas comúnmente identificadas en un espectro son las que corresponden a las vibraciones de los grupos funcionales de las moléculas de ligando y/o de almidón. En este sentido, esta metodología se ha empleado con fines cualitativos, dado que la detección de bandas típicas de ligando se interpreta como una evidencia de la presencia de ligando en el complejo (Gunenc et al., 2018; Le et al., 2021; Wang et al., 2020; Wang et al., 2019; Zhang et al., 2020). En el caso de compuestos con grupos carbonilo, tales como ácidos grasos o ascorbil palmitato, el corrimiento del pico típico desde  $1700\text{ cm}^{-1}$  (del ligando) hacia un valor mayor (con el ligando complejado) se ha atribuido a la formación efectiva del complejo de inclusión (Gao et al., 2020; Lay Ma et al., 2011; Marinopoulou, Papastergiadis, Raphaelides, et al., 2016a). Adicionalmente, esta metodología se ha utilizado con fines cuantitativos, empleando el área del pico del grupo carbonilo como una medida de la cantidad de ligando (ésteres de ácidos grasos de compuestos bioactivos) retenido en los complejos (Lay Ma et al., 2011). Sin embargo, en el caso de complejos formados con ascorbil palmitato, se ha encontrado que esta técnica no arroja una medida precisa de la cantidad de ligando en los CI, dado que la banda típica de carbonilo se corre hacia valores mayores cuando se forma el complejo. Las absorbancias a  $1047$  y  $1022\text{ cm}^{-1}$  se asocian con la cantidad de regiones cristalinas y amorfas, respectivamente, por lo que la relación  $1047/1022$  se utiliza para caracterizar la estructura ordenada de corto alcance de la molécula de almidón (Guo et al., 2021; Shang et al., 2018; Wang et al., 2015).

#### 1.3.5.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las técnicas de microscopía se han utilizado ampliamente para investigar los complejos de inclusión formados con diferentes ligandos y constituyen una poderosa herramienta para una mejor comprensión de estas estructuras, complementando la información proporcionada por el resto de las técnicas analíticas. En la microscopía óptica, el límite de resolución depende de la longitud de onda de la radiación de luz visible, que se encuentra entre  $400\text{ nm}$  (azul) y  $700\text{ nm}$  (rojo). Los electrones, también se pueden comportar como ondas, cuya longitud se puede modificar acelerándolos a través de un rango de potencial eléctrico. Voltajes de aceleración altos producen electrones altamente energéticos con menores longitudes de onda, pudiéndose alcanzar electrones con longitudes de onda entre  $40$  hasta  $1\text{ pm}$  usando  $1\text{-}300\text{ kV}$  (Inkson, 2016). En este sentido, un microscopio diseñado para usar  $200\text{-}300\text{ kV}$  representa un cambio en la

resolución de la imagen con respecto a la microscopía óptica, de hasta menos de 0,1 nm (100 pm) (Inkson, 2016). Un microscopio electrónico de barrido posee una magnificación en el rango de 10-500000 veces, lo que permite la caracterización de estructuras desde micro- hasta nanoescalas. En la microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés), los electrones se originan de una fuente, son acelerados por un ánodo y enfocados a través de lentes condensadores. Las interacciones de los electrones con la muestra originan la emisión de señales, las cuales pueden ser detectadas y utilizadas para formar imágenes estructurales de áreas específicas de la muestra. En la SEM, el haz de electrones se enfoca en un punto y se escanea secuencialmente a través de la muestra. En cada ubicación, la muestra emite señales que son recogidas por detectores. La señal del detector se sincroniza con la ubicación conocida del haz en la muestra y la intensidad de la señal se utiliza para modular el píxel de la imagen correspondiente. Las señales recopiladas en serie se combinan para formar una imagen cuyas dimensiones/distribución de píxeles depende del patrón de escaneo elegido (Inkson, 2016). Dado que los electrones interactúan con las moléculas de aire, la SEM requiere el empleo de vacío, para asegurar que no ocurra dispersión en el haz de electrones en su viaje desde la fuente hasta la muestra. A su vez, los materiales no conductores deben ser recubiertos con una película delgada (comúnmente de oro o plata), que sirve para conducir la carga electrostática superficial acumulada.

La microscopía electrónica de barrido se ha utilizado ampliamente para estudiar la morfología de los complejos de inclusión aplicados a los sistemas alimentarios (Fanta et al., 2008; Marinopoulou, Karageorgiou, et al., 2019; Marinopoulou et al., 2016a; Zabar et al., 2009). Los complejos de amilosa están dispuestos en lamelas cristalinas y amorfas, formando diferentes estructuras a escala nano o micrométricas (Obiro et al., 2012). Zabar et al. (2009) y Marinopoulou et al. (2016a) mostraron que los cristales de los complejos de amilosa-lípido se entremezclan entre áreas amorfas y pueden formar diferentes estructuras supramoleculares, tales como esferulitas y lamelas. Las características de los complejos varían según el tipo de ácido graso. En este sentido, los complejos con ácido linoleico y con ácido linoleico conjugado eran lisos, sin características distintivas a nivel microscópico, mientras que las micrografías de los complejos de amilosa-ácidos grasos saturados mostraban grandes cristales incrustados en la matriz (Zabar et al., 2009). Fanta et al. (2008) caracterizaron esferulitas de almidón con alto contenido de amilosa y ácidos grasos obtenidas del proceso de *jet-cooking*. Estos autores encontraron que la morfología de dichas esferulitas se ve afectada por interacciones complejas entre variables, tales

como las condiciones y procedimientos experimentales. En otro trabajo, Marinopoulou et al. (2019) observaron que las micrografías SEM de muestras secadas por aspersión revelaron un sistema formado por partículas que presentan una forma esférica con uno o más cráteres o cavidades. Estas cavidades aumentan la superficie de las partículas y mejoran sus características funcionales.

#### 1.3.5.5. Eficiencia de complejación

El término *eficiencia de complejación* se refiere a la cantidad de ligando retenido en la matriz de complejo. Se trata de un parámetro que idealmente debería alcanzar valores altos. Sin embargo, la masa inicial de ligando adicionado durante la formación de los complejos puede no ser totalmente retenida por éstos debido a distintas razones, tales como complejación no efectiva (por restricciones estéricas, de solubilidad, entre otros) (Kenar et al., 2016; Yeo et al., 2016), degradación del ligando durante el proceso de formación (Seo et al., 2015) y/o por saturación de la amilosa (Bamidele et al., 2017; Karkalas y Raphaelides, 1986; Lv et al., 2019; Zhou et al., 2020). Por lo tanto, para una descripción cuantitativa completa del proceso de complejación, se deberían considerar los siguientes parámetros:

$$\text{Rendimiento másico (\%)} = (M_c / (M_{L \text{ inicial}} + M_s)) \times 100 \quad \text{Ecuación 1.2}$$

$$\text{Contenido de ligando (\%)} = (M_{L \text{ en complejos}} / M_c) \times 100 \quad \text{Ecuación 1.3}$$

$$\text{Recuperación de ligando (\%)} = (M_{L \text{ en complejos}} / M_{L \text{ inicial}}) \times 100 \quad \text{Ecuación 1.4}$$

Donde,  $M_c$  es la masa de CI seco, mientras que  $M_L$  y  $M_s$  son las masas de ligando y material complejante (almidón o amilosa), respectivamente.

Si la masa del ligando complejado se expresa por unidad de masa de material complejante, se habla de *capacidad de carga* “*loading capacity*” (McClements et al., 2009; Wang et al., 2020; Wang et al., 2021). En algunos casos, se puede obtener un bajo rendimiento másico, pero el contenido de ligando puede ser lo suficientemente alto como para obtener una alta recuperación de ligando (Park et al., 2018). A su vez, en algunos casos podría ocurrir una disminución en la recuperación del ligando cuando la masa

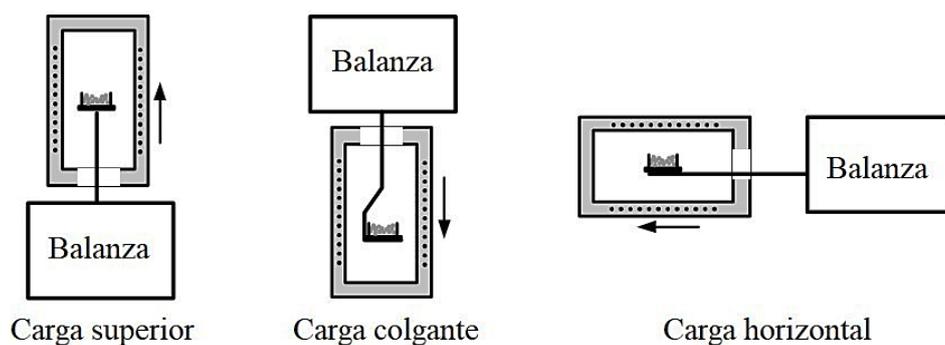
inicial de ligando añadido supera cierto valor, debido a la saturación de la amilosa (Lv et al., 2019; Zhou et al., 2020).

El *rendimiento másico* se obtiene a través del pesaje del ligando, del almidón o amilosa y de la masa de complejos secos obtenidos al final del proceso de formación. Por otro lado, el análisis del *contenido o recuperación de ligando* requiere una primera liberación del huésped de los CI, seguida de su separación y cuantificación. El método utilizado en cada caso dependerá principalmente del tipo de ligando en cuestión. En el caso de los complejos amilosa-ácidos grasos, la liberación inicial de ligando se ha llevado a cabo a través de hidrólisis enzimática (Ades et al., 2012; Lalush et al., 2005; Marinopoulou et al., 2016a; Yang et al., 2009) o hidrólisis ácida (Lalush et al., 2005) del almidón, empleando un tratamiento térmico en condiciones alcalinas (Seo et al., 2015; Seok et al., 2019), o bien a través de extracción con solvente (Kang et al., 2020; Marinopoulou et al., 2016a). En el caso de la utilización de hidrólisis enzimática, el ligando liberado se debe extraer de la mezcla de reacción para ser cuantificado posteriormente. Marinopoulou et al. (2016a) demostraron que la extracción de ácidos grasos utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico era más eficaz que el uso de solventes, ya que las condiciones son suaves y no interfieren ni con la enzima hidrolítica ni con el ligando, mejorando así los rendimientos de recuperación de la molécula huésped. Así, los valores de contenido/recuperación de ligando pueden variar dependiendo de la metodología elegida para su extracción, incluso para el mismo tipo de compuesto. La metodología analítica utilizada para la cuantificación del ligando liberado dependerá del tipo de ligando. Para el caso de ácidos grasos, el método empleado es la cromatografía gaseosa (CG) (Lalush et al., 2005; Seo et al., 2015; Seok et al., 2019).

### 1.3.5.6. Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés) es una técnica experimental en la que se mide la masa de una muestra en función de la temperatura o del tiempo (Bottom, 2008). El calentamiento de la muestra se realiza en una termobalanza (**Figura 1.13**) y se puede llevar a cabo a una velocidad constante (medición dinámica), a una temperatura constante (medición isotérmica), o bien aplicando un programa de temperatura no lineal. Adicionalmente, la atmósfera utilizada en la determinación juega un rol importante, pudiendo ésta ser reactiva, oxidante o inerte. Las condiciones empleadas dependerán del tipo de información buscada en cada análisis. Los resultados

obtenidos se representan en una curva termogravimétrica, en donde se grafica la masa o el porcentaje de masa en función de la temperatura y/o del tiempo. A su vez, la derivada de la curva de TGA (curva termogravimétrica diferencial, DTG) permite conocer la velocidad de cambio de masa.



**Figura 1.13.** Diseños de termobalanza con carga superior, colgante y horizontal (Bottom, 2008)

Los cambios de masa ocurren cuando la muestra pierde material por algún mecanismo o cuando reacciona con la atmósfera circundante. Esto produce pasos en la curva de TGA o picos en la curva de DTG (Bottom, 2008). Entre los cambios que se pueden analizar a través de esta metodología, se incluyen: la evaporación de componentes volátiles, la oxidación con el oxígeno atmosférico, la descomposición térmica en una atmósfera inerte, la ganancia o pérdida de agua en un experimento con humedad controlada, entre otros (Bottom, 2008). En el caso de los complejos de inclusión con amilosa, el análisis termogravimétrico se ha empleado para la medición de la estabilidad oxidativa acelerada, a través de la determinación de la ganancia de masa que ocurre como consecuencia de la captación de oxígeno durante la oxidación del ligando libre (sin complejar) en comparación con el ligando complejado (Marinopoulou et al., 2016a). A su vez, el análisis realizado en un rango de temperatura comprendido entre 50 y 400 °C, ha sido utilizado para estudiar la descomposición térmica de los complejos (Chai et al., 2013; Liu et al., 2020; Xu et al., 2013; Yang et al., 2009; Zhang et al., 2018). En este caso, se analiza tanto la temperatura a la que se inicia la pérdida de masa debido a la descomposición térmica (*estabilidad térmica*), como el número de pasos de la curva termogravimétrica obtenida (*patrón de descomposición*). Si el complejo arroja una curva de descomposición de un solo paso, se considera que éste se comporta como una

estructura unificada, sugiriendo una interacción amilosa-ligando fuerte. Por el contrario, si se descompone como una mezcla física de compuestos individuales, la curva presentará tantos pasos como número de componentes haya presentes en la muestra (Xu et al., 2013; Zhang et al., 2018).

### 1.3.5.7. Digestibilidad *in vitro*

Para la evaluación del comportamiento de los alimentos en el tracto gastrointestinal, se han adoptado modelos gastrointestinales y farmacocinéticos estandarizados *in vitro* e *in vivo* (McClements, 2021). Sin embargo, dado que los ensayos *in vivo* son costosos, requieren muchos recursos y presentan problemas éticos, los métodos *in vitro* se están empleando más ampliamente. Las variaciones en los parámetros de digestibilidad *in vitro* entre los distintos modelos usados (tipo y concentración de enzima, pH, tiempo y temperatura) limitan la comparación de resultados entre grupos de investigación (Hur et al., 2011; Minekus et al., 2014), incluso en el caso de la digestibilidad de los CI (Tan & Kong, 2020). En este contexto, a partir de un consenso internacional (Minekus et al., 2014), se ha desarrollado un método estandarizado de digestión estática *in vitro* de alimentos, el cual fue posteriormente actualizado (Brodkorb et al., 2019). La aplicación de este método facilita la comparación de resultados, ayudando a la estandarización y armonización de la digestión de los alimentos (Brodkorb et al., 2019). Se trata de un protocolo estático, es decir, utiliza proporciones constantes de alimento y fluidos digestivos y un pH constante para cada paso, e incluye las fases oral, gástrica e intestinal. Si bien no puede imitar la compleja dinámica del proceso de digestión o las interacciones fisiológicas con el huésped, las principales ventajas de este método residen en su simplicidad, reproducibilidad, robustez y definición clara de las condiciones experimentales (Brodkorb et al., 2019).

En el caso de los complejos de inclusión, los ensayos de digestibilidad *in vitro* se pueden agrupar en dos categorías, basadas en:

- La *digestibilidad del almidón*, que comúnmente estudia la relación entre la formación de los CI con el incremento del contenido de almidón resistente, a través de la medición de los productos de digestión del almidón (oligosacáridos o glucosa) (Amoako y Awika, 2019; Zhou et al., 2020), o

- la *bioaccesibilidad* del compuesto bioactivo, es decir, la cantidad de ligando liberado de la matriz que se considera que está disponible para ser absorbido a través de la pared intestinal (Minekus et al., 2014).

Se ha sugerido que la hidrólisis de los complejos de inclusión con  $\alpha$ -amilasa ocurre principalmente en las partes amorfas que interconectan las regiones lamelares cristalinas (Jane y Robyt, 1984). Los CI con mayor cristalinidad son más resistentes a la degradación enzimática, pero incluso los complejos cristalinos podrían ser completamente degradados bajo tiempos de digestión prolongados y altas concentraciones enzimáticas (Seneviratne y Biliaderis, 1991). Holm et al. (1983) demostraron que el CI amilosa-lisolecitina fue completamente degradado y absorbido luego de 120 min de digestión *in vivo*. Sin embargo, los complejos amilosa-lípido se consideran almidón resistente (RS, por sus siglas en inglés), el cual escapa a la digestión en el intestino delgado, alcanzando el colon, donde es fermentado por los microorganismos intestinales (Panyoo y Emmambux, 2017). Se han identificado cinco tipos de RS, siendo los complejos amilosa-lípido considerados en la categoría 5 (RS5) (Li et al., 2019). Recientemente, el concepto de RS5 se ha extendido a complejos tipo V formados con una variedad más amplia de ligandos, además de los lípidos (Gutiérrez y Tovar, 2021). A pesar de la incorporación de los CI dentro de la categoría de almidón resistente, su comportamiento durante la digestión está íntimamente relacionado con su estructura la que, a su vez, varía con la estructura del ligando y con el método de formación (Tan y Kong, 2020). Por lo tanto, el conocimiento de cómo estos factores determinan la estructura del complejo contribuye al desarrollo de CI con las propiedades necesarias de acuerdo a la aplicación que se les dará posteriormente, ya sea como almidón resistente o como sistema de vehiculización.

### 1.3.6. Aplicación de complejos de inclusión para el desarrollo de alimentos funcionales

De acuerdo a la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), un alimento puede ser considerado funcional si se logra demostrar satisfactoriamente que posee un efecto benéfico sobre una o varias funciones del organismo (más allá de los efectos nutricionales habituales), que mejora el estado de salud y de bienestar o bien que reduce el riesgo de una enfermedad. También puede definirse como aquel alimento capaz de aportar sustancias con funciones fisiológicas definidas, brindando beneficios para la salud de quien los consume.

Los complejos de inclusión pueden presentar diversas propiedades funcionales, actuando tanto como fibra dietaria o como sistemas de vehiculización de ingredientes bioactivos en alimentos (Di Marco et al., 2022). La formación de complejos amilosa-lípido ocurre durante el procesamiento de alimentos (Fu et al., 2015) y retarda la retrogradación del almidón en alimentos tales como pan (Kang et al., 2021) y tortillas (Mariscal-Moreno et al., 2019). Sin embargo, existe un interés creciente en la incorporación de CI exógenos en alimentos, para otorgar distintos beneficios funcionales y/o tecnológicos. Estos CI pueden ser adicionados en polvo o en forma de dispersiones acuosas, según el tipo de producto final. Lee et al., (2020) utilizaron complejos formados entre almidón de maíz con ácido esteárico para reemplazar el *shortening* en una formulación de pan de molde. En dicho trabajo, se logró reemplazar un 50% de la materia grasa con complejos sin modificar la calidad de los panes, dado que la forma y apariencia de los panes formados con CI no se vio significativamente afectada, mientras que el volumen específico disminuyó sólo en un 4%. Además, los CI contribuyeron a retardar la retrogradación del almidón en los panes luego de 3 días de almacenamiento (Lee et al., 2020). En otro trabajo, se utilizaron complejos de amilosa-oleato de potasio para reemplazar los sólidos de leche desnatada usada en la preparación de yogur descremado (Singh et al., 2014). La adición de CI (reemplazo del 3%) no afectó la velocidad de fermentación, fortaleció significativamente el gel y redujo la sinéresis durante 4 semanas de almacenamiento, lo que sugirió una interacción positiva de los complejos con la matriz del yogur (Singh et al., 2014). Otra aplicación relevante de los CI en el desarrollo de alimentos funcionales es su incorporación como sistemas de vehiculización de compuestos bioactivos, tales como vitaminas, antioxidantes, minerales, fibras dietarias, fitoesteroles, probióticos y ácidos grasos esenciales, entre otros. Se ha demostrado que la amilosa es capaz de formar complejos de inclusión con distintos compuestos, como ascorbil palmitato, ácido alfa-lipoico, compuestos fenólicos, aromáticos y ácido linoleico conjugado (Di Marco et al., 2022). Debido a la elevada susceptibilidad de los ácidos grasos poliinsaturados a las condiciones de procesamiento y almacenamiento (luz, T, pH, O<sub>2</sub>), la encapsulación molecular a través de la complejación con amilosa podría representar un mecanismo que permita la incorporación de estos compuestos en matrices alimentarias. En este contexto, el desarrollo de alimentos funcionales a través de la incorporación de ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 de chía representa un campo de estudio relevante en el área de la ciencia y tecnología de alimentos, debido a los efectos beneficiosos que éstos poseen sobre la salud. El desarrollo de este sistema de

vehiculización requiere el estudio de diversos aspectos, incluyendo el efecto de distintas variables operativas sobre las propiedades fisicoquímicas de los CI, sus propiedades funcionales, su compatibilidad con la matriz alimentaria y su comportamiento durante la digestión.

#### **1.4. Hipótesis**

- Las condiciones operativas de la encapsulación de compuestos funcionales provenientes del aceite de chía mediante complejación por inclusión (T y t de reacción, relación másica ligando/almidón, aplicación de ultrasonido, omisión de la etapa de templado), tienen incidencia en la eficiencia del proceso, en las propiedades fisicoquímicas y calidad de los complejos de inclusión amilosa-ácidos grasos de chía.
- Las micropartículas obtenidas mediante complejación por inclusión constituyen sistemas de provisión eficientes para la fortificación de productos alimenticios con componentes funcionales y bioactivos de la chía, contribuyendo a una mayor calidad nutricional.

## 1.5. Objetivos

En virtud de lo expuesto, se detallan a continuación los objetivos del presente trabajo de Tesis Doctoral.

### Objetivos generales

- Desarrollar sistemas de provisión “*delivery systems*” (complejos de inclusión) como vehículos de ingredientes funcionales (ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6) provenientes de la semilla de chía (*Salvia hispanica* L.).
- Evaluar el efecto de la incorporación de los complejos de inclusión en una matriz alimentaria.

### Objetivos específicos

- Obtener micropartículas mediante la complejación por inclusión (amilosa-ácidos grasos de chía) a través del método alcalino con templado, evaluando la influencia de las condiciones operativas (tiempo y temperatura, relación másica ligando/almidón, aplicación de ultrasonido) en la eficiencia del proceso, en las propiedades fisicoquímicas y calidad de los complejos de inclusión.
- Estudiar el efecto de la omisión de la etapa de templado en el proceso de obtención sobre las características fisicoquímicas y la estabilidad de los complejos de inclusión amilosa-ácidos grasos de chía.
- Fortificar una sopa instantánea comercial con ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 a través de la adición de complejos de inclusión amilosa-ácidos grasos de chía, evaluando sus propiedades fisicoquímicas, atributos sensoriales y digestibilidad *in vitro*.

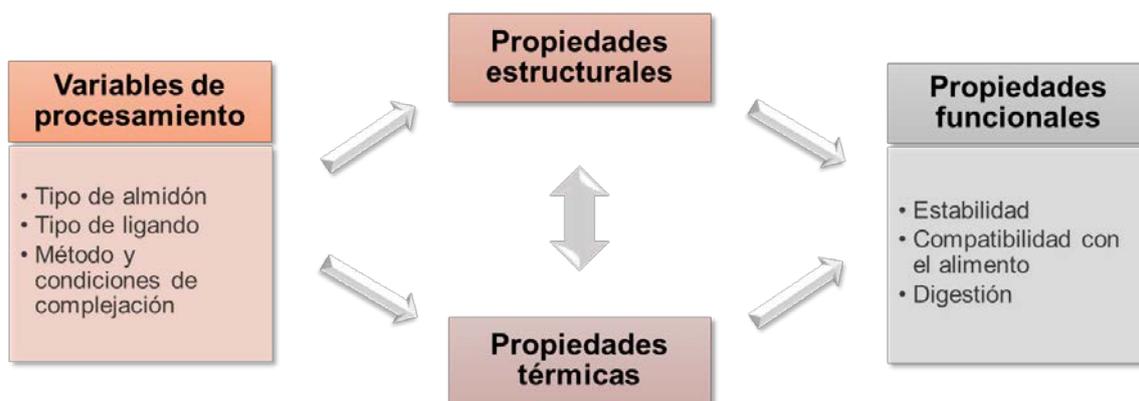
## CAPITULO 2

# **Complejos de inclusión amilosa-ácidos grasos de aceite de chía formados con templado**

## Capítulo 2. Complejos de inclusión amilosa-ácidos grasos de aceite de chía formados con templado

### 2.1. Introducción

Existen diversos factores que influyen tanto en el éxito de la formación de complejos de inclusión entre la amilosa y las moléculas huésped, como en la estructura de dichos complejos. En el caso de los complejos con lípidos, entre los factores que gobiernan su formación y estructura se incluyen el *tipo de almidón* (contenido de amilosa y amilopectina, grado de polimerización, humedad), el *tipo de molécula lipídica* (mono-, di-, triacilglicerol o ácido graso libre, grado de insaturación, longitud de cadena, configuración *cis* o *trans*, ionización del grupo carboxilo) y las *condiciones de reacción* (pH, temperatura, tiempo) (Marinopoulou et al., 2016b; Seo et al., 2015; Seok et al., 2019; Zhou et al., 2022). Asimismo, el *método de formación* (dimetilsulfóxido, alcalino, V-amilosa preformada, entre otros) y la *aplicación de tratamientos físicos* (sonicación, altas presiones, entre otros) también influyen sobre las propiedades de los complejos de inclusión. El conocimiento de cómo estas variables inciden en las propiedades estructurales y térmicas de los complejos presenta una gran relevancia, dado que dichas propiedades fisicoquímicas se encuentran estrechamente relacionadas con la funcionalidad de los complejos (estabilidad, compatibilidad con la matriz del alimento, comportamiento durante la digestión), tal como se ilustra en la **Figura 2.1**.



**Figura 2.1.** Relación entre las variables de procesamiento con las propiedades estructurales, térmicas y funcionales de los complejos de inclusión (Di Marco et al., 2022)

A continuación, se describen con mayor detalle aquellas variables de procesamiento que fueron seleccionadas para ser estudiadas en el presente Capítulo, con el objetivo de conocer su efecto sobre las propiedades de los complejos amilosa-ácidos grasos de chía.

### 2.1.1. Efecto del tipo de molécula lipídica

En el caso de los ligandos de naturaleza lipídica, si bien existen investigaciones que sostienen que fue posible formar CI con triacilglicerolos (TAGs) de aceites de semilla de lino (Gökmen et al., 2011) y de pescado (Park et al., 2018), en la mayor parte de los trabajos se demostró que los TAGs no son capaces de formar complejos de inclusión (Cervantes-Ramírez et al., 2020; Chao et al., 2018; Eliasson, 1994; Li et al., 2020; Tang & Copeland, 2007; Yun et al., 2020). La baja solubilidad en agua y los efectos de impedimento estérico, dificultan la formación de complejos de inclusión entre la amilosa con dichas moléculas lipídicas (Cervantes-Ramírez et al., 2020; Chao et al., 2018; Yun et al., 2020). Aún existe poca evidencia que demuestre la capacidad de los TAGs para formar CI, en base a pruebas de DRX, DSC y/o FTIR (Di Marco et al., 2022). Por el contrario, tanto los ácidos grasos como los mono y diacilglicerolos son capaces de formar complejos con amilosa (Eliasson, 1994; Tufvesson et al., 2003a, 2003b). Adicionalmente, los ácidos grasos forman complejos más fácilmente que los monoacilglicerolos (Tufvesson et al., 2003b). En este sentido, en la mayoría de las investigaciones llevadas a cabo hasta el momento, se han empleado ácidos grasos comerciales puros como ligando.

Dado que el aceite de chía está compuesto mayoritariamente por TAGs, conteniendo sólo un 0,68-1,27% de material insaponificable (Ixtaina et al., 2011), se optó por aplicar un tratamiento de hidrólisis enzimática, con el fin de obtener un ligando formado por ácidos grasos libres, para así facilitar su incorporación en la hélice de amilosa.

### 2.1.2. Efecto del tiempo y de la temperatura de templado

La aplicación de una etapa de templado (*annealing*), permite a las hélices de V-amilosa adquirir un cierto grado de ordenamiento, dando lugar a la formación de estructuras cristalinas o semicristalinas. Dicho tratamiento, consiste en el calentamiento de los complejos durante un tiempo (t) y a una temperatura (T) determinados (Kong y

Ziegler, 2014b). Tanto el tiempo como la temperatura empleados durante esta etapa de templado influyen sobre las características de los complejos. La *concentración de ligando en los complejos* es uno de los parámetros que se ve influenciado por las condiciones de t-T. Seo et al. (2015), mostraron que existe una combinación t-T que permite alcanzar el máximo porcentaje de ácidos grasos recuperados en los complejos respecto de la masa inicial, el cual varía según el tipo de ácido graso. Por ejemplo, en complejos amilosa-ácido  $\alpha$ -linolénico, el tratamiento durante 6 h a 90 °C fue el que permitió alcanzar el mayor porcentaje de ácido graso recuperado (>70%), mientras que dicho valor disminuyó cuando el calentamiento se extendió durante un período de tiempo mayor, debido a la degradación del ligando por oxidación. Por otra parte, las condiciones óptimas para alcanzar la mayor concentración de ácidos esteárico y oleico en los CI fueron 24 h a 90 °C (Seo et al., 2015).

Las *propiedades térmicas* de los complejos también dependen de las condiciones de t-T empleadas durante la etapa de templado. Tal como se describió en el Capítulo I, el tratamiento térmico determina el tipo de polimorfo que se formará (I o II) (Karkalas et al., 1995; Tufvesson et al., 2003a, 2003b). En general, el aumento de la temperatura de complejación, promueve la transición desde la forma polimórfica I hacia la II, caracterizada por una mayor temperatura de disociación (Karkalas et al., 1995). El tratamiento de los CI a temperaturas superiores a la temperatura de pico ( $T_p$ ) de la forma I, favorece la generación de la forma II (Seo et al., 2015; Tufvesson et al., 2003b, 2003a). En el caso de una mezcla amilosa-monoacilglicerol-agua sin tratamiento térmico previo, se observó una transición endotérmica mediante DSC correspondiente a la forma I ( $T_p < 100$  °C) (Tufvesson et al., 2003a). Por el contrario, cuando dicha mezcla se sometió a un tratamiento previo durante 24 h-100 °C, los complejos formados mostraron una endoterma correspondiente a la forma II ( $T_p > 100$  °C) (Tufvesson et al., 2003a). Un comportamiento similar se encontró en complejos formados entre la amilosa con distintos ácidos grasos, es decir, aquellos complejos que no fueron sometidos a tratamiento térmico, mostraron sólo la presencia de la forma I, mientras que la incorporación de un pretratamiento durante 24 h a 100 °C, indujo la generación de la forma II a expensas de la I (Tufvesson et al., 2003a). Por lo tanto, se puede decir que el aumento de la temperatura de templado en general produce un incremento de la estabilidad térmica de los CI. Asimismo, el proceso de complejación no sólo compite con la retrogradación del almidón, sino también con la cristalización de la molécula huésped. En general, la temperatura de formación debería ser mayor a la temperatura de fusión del ligando, con

el fin de evitar que éste cristalice y así pueda estar disponible para la formación de complejos (Kong et al., 2019).

En relación a la *estructura cristalina*, el grado de cristalinidad observado en los patrones de difracción de rayos X en general tiende a aumentar con mayores temperaturas y/o tiempos de cristalización (Lalush et al., 2005; Marinopoulou, Papastergiadis, y Raphaelides, 2016; Seo et al., 2016). A mayores temperaturas, las hélices de amilosa tienen mayor energía cinética y, por lo tanto, presentan mayor movilidad y tienden a asociarse más fácilmente y a formar más núcleos, que eventualmente se transforman en cristales (Marinopoulou et al., 2016b).

### 2.1.3. Efecto de la concentración de ligando

La concentración de ligando es otro factor relevante durante la formación de complejos de inclusión. Karkalas & Raphaelides (1986) demostraron que existe una relación cuantitativa en la interacción amilosa-ácido graso y que la relación molar ácido graso/amilosa necesaria para alcanzar la saturación de la amilosa depende de la longitud de cadena de la molécula lipídica. Para ello, estos autores partieron de cálculos teóricos para los distintos tipos de ácidos grasos. Por ejemplo, en el caso del ácido esteárico, teniendo en cuenta que su longitud de cadena es de 2,49 nm y que la distancia entre giros consecutivos en la hélice de amilosa es de aproximadamente 0,8 nm, la hélice de amilosa presentaría tres giros por molécula de ácido esteárico. A su vez, asumiendo que cada giro contiene al menos 6 unidades de glucosa, se obtiene una concentración teórica de saturación de 9,4% p/p (esteárico/amilosa) (Karkalas y Raphaelides, 1986). En dicho cálculo, se asume que la cavidad helicoidal se encuentra saturada por ácidos grasos dispuestos linealmente y que no existen moléculas de ligando ocupando los espacios intersticiales. Posteriormente, encontraron que dichas concentraciones teóricas de saturación fueron similares a aquellas medidas experimentalmente. El ácido cáprico fue aquel que presentó la mayor concentración de saturación (10% p/p), mientras que para los ácidos  $\alpha$ -linolénico y linoleico, la misma fue de 7,6% (Karkalas y Raphaelides, 1986). La adición de lípidos por encima de dichos niveles resulta en lípidos libres, no complejados (Raphaelides y Karkalas, 1988).

En una investigación posterior, se evidenció que existe una concentración óptima de los lípidos para formar complejos con almidón, la cual depende tanto del tipo de lípido como de su solubilidad en agua (Tang y Copeland, 2007). Por encima de dicha

concentración, algunos ácidos grasos tendieron a auto asociarse en lugar de formar complejos con la amilosa, resultando en una disminución de la cantidad de complejo formado. Por el contrario, a concentraciones menores, la amilosa puede adoptar una conformación de doble hélice, compitiendo así con la formación de la simple hélice requerida para los complejos de inclusión (Putseys et al., 2010).

Teniendo en cuenta que el efecto de la concentración de ligando varía con el tipo de ácido graso y, además, considerando que los datos disponibles hasta el presente corresponden principalmente a estudios realizados en complejos monoácidos (formados con ácidos grasos puros), resulta de interés el estudio del efecto de la concentración de ligando cuando el mismo está formado por una mezcla de ácidos grasos, como es el caso del aceite de chía hidrolizado.

#### 2.1.4. Efecto de la aplicación de tratamientos físicos: ultrasonido

Otro factor relevante que influye en la complejación de ácidos grasos es la aplicación de tratamientos físicos, tales como altas presiones, temperatura y ultrasonido. Éstos han sido ampliamente usados para la modificación del almidón (Alcázar-Alay y Meireles, 2015) y también se aplicaron durante la formación de complejos de inclusión (Cervantes-Ramírez et al., 2020; Guo et al., 2021; Guo et al., 2018). En particular, el tratamiento con *ultrasonido* (U) ha mostrado inducir cambios físicos en el almidón (Alcázar-Alay y Meireles, 2015) y está emergiendo como una tecnología no térmica para promover la complejación de lípidos (Kang et al., 2020; Raza et al., 2021). El ultrasonido crea ondas de presión en el líquido que forman millones de burbujas microscópicas, las cuales colapsan generando ondas de choque. Este fenómeno, conocido como *cavitación*, libera altos niveles de energía, produce altas temperaturas y gradientes de presión, y puede causar fuerzas de cizallamiento, capaces de romper las cadenas de polímeros (Chan et al., 2010).

Este tratamiento se ha aplicado recientemente para promover la complejación de varios ácidos grasos. Por ejemplo, el ultrasonido de baja densidad de potencia (320 W-5 min) mejoró la formación del complejo almidón-ácido láurico, mientras que las intensidades más altas resultaron en la ruptura de la interacción amilosa-ácido graso, destruyendo así la estructura de los complejos (Liu et al., 2018). El mismo efecto se observó en los CI almidón-monoestearato de glicerol, alcanzando el índice de formación de complejos más alto por debajo de 375 W-10 min (Shi et al., 2021). Un tratamiento de

sonicación de 320 W-15 min ha mejorado la complejación de los ácidos saturados láurico, octanoico, mirístico y cáprico (Kang et al., 2020), mientras que el ultrasonido con potencia de multifrecuencia favoreció la complejación del ácido linoleico (Raza et al., 2021). Como puede apreciarse, los resultados disponibles en la actualidad sobre el efecto del ultrasonido se enfocan principalmente en complejos monoácidos amilosa-lípido, es decir, CI formados con ácidos grasos comerciales puros.

Por lo antes expuesto, resulta de interés el conocimiento del efecto de dichas variables, ya que permite seleccionar aquellos materiales y condiciones de procesamiento apropiados para promover la formación de complejos adaptados a necesidades específicas, aptos para aplicaciones alimentarias especiales. En este sentido, en el presente Capítulo se seleccionaron distintos parámetros de interés, con el objetivo de conocer su efecto sobre las propiedades de los complejos amilosa-ácidos grasos de chía. En una primera etapa, se realizó una caracterización del almidón de maíz de alta amilosa y del aceite de chía inicial. Asimismo, se estudió la hidrólisis del aceite de chía empleando dos enzimas, una de origen animal y otra de origen microbiano, y la extracción por solvente y por acidificación y centrifugación de los ácidos grasos liberados, los cuales se utilizaron como ligando durante la formación de los complejos. Posteriormente, en la Parte I, se abordó el estudio del efecto del tiempo y de la temperatura de templado sobre las propiedades fisicoquímicas de los complejos amilosa-ácidos grasos de chía. En la Parte II, se analizó el efecto de la relación másica hidrolizado de aceite de chía/almidón y de la aplicación del tratamiento de ultrasonido sobre complejos templados bajo condiciones (t-T) seleccionadas a partir de los resultados obtenidos en la Parte I.

## 2.2. Materiales y métodos

### 2.2.1. Materiales

El aceite de chía fue proporcionado por Solazteca SDA S.A. (Buenos Aires, Argentina). El almidón de maíz de alta amilosa (HYLON VII, >70% amilosa) fue provisto por Ingredion Inc. (Westchester, Illinois, EE. UU.). La lipasa pancreática porcina tipo II (actividad enzimática 100-400 U/mg) y la de *Candida rugosa* tipo VII (EC 3.1.1.3) (actividad enzimática  $\geq 700$  U/mg, 1 unidad hidroliza 1  $\mu$ E de ácido graso a partir de un triacilglicerol en 1 h a pH 7,2 y 37 °C usando aceite de oliva) fueron adquiridas a Sigma-

Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

### 2.2.2. Caracterización inicial del almidón de maíz de alta amilosa (HYLON VII): medición del contenido de amilosa

El contenido de amilosa total del almidón de maíz utilizado en el presente trabajo (medido sobre almidón libre de lípidos, precipitado a partir de una solución de urea-dimetilsulfóxido con etanol) se determinó de acuerdo al protocolo descrito por Monroy (2021), basado en el método de Morrison & Laignelet (1983), con algunas modificaciones. Para ello, se pesaron aproximadamente 20 mg de almidón ( $\pm 0,01$  mg) en un tubo con tapa a rosca. Luego, se agregaron 5 mL de una solución 1:9 de urea 6 M y DMSO. El tubo se selló y se transfirió a una estufa a 105 °C durante 1 h. Después de enfriar, se pesó una alícuota (0,5 mL) en un tubo con tapa a rosca de 10 mL. Este paso se realizó por duplicado. Posteriormente, se agregaron 5 mL de etanol al 99,5% v/v para remover los lípidos. El tubo se tapó, se mezcló con un vórtex y se centrifugó durante 30 min a 5000xg utilizando una centrífuga Sorvall ST 16R (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Se descartó el sobrenadante y el almidón precipitado se disolvió añadiendo 1 mL de la solución de urea-DMSO y mezclando nuevamente con un vórtex. La solución se transfirió a un matraz de 50 mL y se agregaron aproximadamente 25 mL de agua destilada y 1 mL de una solución acuosa de I<sub>2</sub>-KI (2 mg I<sub>2</sub> y 20 mg KI/mL). Luego, se ajustó el volumen a 50 mL con agua destilada y se midió la absorbancia a 635 nm con un espectrofotómetro Shimadzu UVmini-1240 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón). Se calcularon el valor azul y el contenido total de amilosa del almidón utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Valor azul} = (A_{635} \times 100) / (2 \times m_{sc} \times m_s) \quad \text{Ecuación 2.1}$$

$$\text{Contenido de amilosa (\%)} = 28.414 \times \text{valor azul} \quad \text{Ecuación 2.2}$$

Donde,  $m_{sc}$  es la masa de solución (g) y  $m_s$  es la masa de almidón (mg).

El resultado informado corresponde al promedio de dos determinaciones.

### 2.2.3. Caracterización inicial del aceite de chía

#### 2.2.3.1. Ácidos grasos libres (FFA)

El contenido de ácidos grasos libres (FFA, por sus siglas en inglés) (%), como ácido oleico) del aceite de chía se determinó de acuerdo al método de la AOCS Ca 5a-40 (AOCS, 1997a). Para ello, se pesó aproximadamente 1 g de aceite en un Erlenmeyer y se mezclaron con etanol 96° a 70 °C previamente neutralizado con NaOH 0,1 N. Se adicionaron unas gotas de indicador fenolftaleína y se valoró con NaOH 0,1 N hasta viraje al color rosa. El FFA (%) se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{FFA (\%)} = \frac{V_{\text{NaOH}} \times N_{\text{NaOH}} \times 28,2}{m} \quad \text{Ecuación 2.3}$$

Donde:

$V_{\text{NaOH}}$ : volumen de NaOH (mL)

$N_{\text{NaOH}}$ : normalidad del NaOH

28,2: factor correspondiente al ácido oleico

m: masa de aceite (g)

#### 2.2.3.2. Índice de peróxidos

La determinación del índice de peróxidos se realizó de acuerdo a la norma AOCS Cd 8-53 (AOCS, 1997b). Para ello, se pesaron aproximadamente 5 g de aceite de chía en un Erlenmeyer, se adicionaron 30 mL de una mezcla ácido acético/cloroformo 3:2 v/v y se mezcló por agitación. Luego, se adicionaron 0,5 mL de KI saturado y la mezcla se almacenó en oscuridad durante 1 min. Posteriormente, se agregaron 30 mL de agua destilada y 2 mL de una solución de almidón (1% p/v) y se valoró con  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,01 N hasta la completa desaparición del color azul. La determinación del blanco de reactivos se realizó de la misma manera, pero sin el agregado de aceite. El índice de peróxidos (PV, por sus siglas en inglés), expresado como mEqO<sub>2</sub>/kg aceite, se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de peróxidos (mEqO}_2\text{/kg)} = \frac{(A - B) \times N \times 1000}{m} \quad \text{Ecuación 2.4}$$

Donde:

A: volumen de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  utilizados en la titulación del aceite (mL)

B: volumen de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  utilizado durante la titulación del blanco (mL)

N: normalidad del  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

m: masa de aceite (g)

### 2.2.3.3. Composición de ácidos grasos por cromatografía gaseosa (CG)

La identificación y cuantificación de los ácidos grasos del aceite de chía se llevó a cabo por cromatografía gaseosa. Para ello, ~200  $\mu\text{L}$  de aceite se colocaron en un tubo con tapa a rosca y se adicionaron 4 mL de una mezcla HCl/metanol (5% v/v). El tubo se selló y se calentó a 100 °C durante 10 min. Una vez enfriado, se adicionaron 2 mL de agua Milli-Q y 1 mL de hexano grado HPLC (95% de pureza) y se centrifugó durante 15 min a 1610xg usando una centrífuga Rolco CM 2036 (Rolco SRL, Buenos Aires, Argentina). Los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME, por sus siglas en inglés) presentes en la fracción de hexano se cuantificaron usando un cromatógrafo gaseoso Agilent Technologies 7890 A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) equipado con un detector de ionización de llama. La separación se realizó en una columna capilar DB-23 (largo 30 m, diámetro interno 0,25 mm, espesor de película 0,25  $\mu\text{m}$ ). Las temperaturas del inyector y detector fueron 250 y 280 °C, respectivamente. El programa de temperatura fue el siguiente: 50 °C durante 1 min, calentamiento hasta 175 °C a 25 °C/min, calentamiento desde 175 hasta 230 °C a 4 °C/min y una isoterma a 230 °C durante 15 min. Los picos se identificaron usando un estándar externo Supelco 37 Component FAME MIX (Supelco Inc., Bellefonte, PA, EE. UU.). El *porcentaje de cada ácido graso* identificado se calculó a partir de las áreas relativas de cada pico usando el software Agilent ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) y se expresó como valor porcentual en relación al contenido total de los mismos.

### 2.2.4. Hidrólisis enzimática del aceite de chía con lipasa pancreática porcina y de *Candida rugosa*

Para llevar a cabo la reacción de hidrólisis del aceite de chía, se preparó una emulsión de aceite en agua (20% p/p) empleando un homogeneizador Ultra-Turrax T-25 (IKA-Werke, Staufen, Alemania) a una velocidad de 9500 rpm durante 1 min. Posteriormente, se incorporó la lipasa pancreática porcina (LPP) o de *Candida rugosa*

(LCR) (4% p/p enzima/aceite). Dicha reacción, se llevó a cabo en un frasco color caramelo con atmósfera de nitrógeno para evitar el deterioro de los ácidos grasos insaturados, bajo las condiciones enzimáticas óptimas (37 °C, pH=7) con agitación magnética constante (400 rpm) usando un agitador DLAB MS-H280-PRO (DLAB Scientific, Johor, Malasia). El progreso de la hidrólisis se monitoreó extrayendo alícuotas de la mezcla de reacción a distintos intervalos de tiempo y determinando el contenido de ácidos grasos libres (FFA, % como ácido oleico) por titulación con NaOH 0,1 N, de acuerdo al método de la AOCS Ca 5a-40 (AOCS, 1997a). El valor de FFA (%) se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{FFA (\%)} = \frac{V_{\text{NaOH}} \times N_{\text{NaOH}} \times 28,2}{m \times f} \quad \text{Ecuación 2.5}$$

Donde:

$V_{\text{NaOH}}$ : volumen de NaOH requerido durante la titulación (mL)

$N_{\text{NaOH}}$ : normalidad del NaOH

28,2: factor correspondiente al ácido oleico

m: masa de la mezcla de reacción (g)

f: es la fracción de aceite al inicio de la reacción hidrolítica (0,2)

### 2.2.5. Extracción de la fracción lipídica (aceite de chía hidrolizado)

#### 2.2.5.1. Extracción con solvente

Los ácidos grasos libres resultantes de la hidrólisis se recuperaron empleando una extracción líquido-líquido. Para ello, una vez alcanzado un valor constante de FFA en función del tiempo, la mezcla de reacción se transfirió a una ampolla de decantación y se realizaron tres extracciones con hexano (1/1 v/v mezcla de reacción/hexano). La fase orgánica se colectó en un balón y el solvente se evaporó bajo vacío a 30 °C usando un rotavapor Büchi R-124 (Labortechnik AG, Flawil, Suiza). La fracción lipídica obtenida (hidrolizado) se almacenó a -20 °C en un frasco color caramelo hasta su posterior utilización en la etapa de formación de los complejos de inclusión. La composición acídica del aceite hidrolizado se determinó siguiendo el mismo protocolo utilizado para el aceite sin hidrolizar (ver Sección 2.2.3.3).

### 2.2.5.2. Extracción ácida

Con el objetivo de evaluar la aplicación de un método más rápido y sencillo que la extracción líquido-líquido empleada en la Sección 2.2.5.1, se evaluó un método de extracción ácida, basado en la tendencia de los ácidos grasos a agregarse a pHs bajos (Kanicky y Shah, 2002). Para ello, los ácidos grasos liberados en la reacción de hidrólisis se extrajeron por acidificación de la mezcla de reacción hasta  $\text{pH} \sim 2$  con HCl 4 N, seguido de centrifugación (4000xg, 20 min). La fracción lipídica superior obtenida (hidrolizado) se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un frasco color caramelo sellado herméticamente con atmósfera de nitrógeno para evitar su deterioro. La composición ácida del aceite hidrolizado se determinó siguiendo el mismo protocolo utilizado para el aceite sin hidrolizar (ver Sección 2.2.3.3).

### 2.2.6. Formación de complejos amilosa-ácidos grasos de aceite de chía con templado

#### 2.2.6.1. Efecto del tiempo y de la temperatura de templado

Para evaluar el efecto del tiempo y la temperatura de templado, la formación de los complejos de inclusión de amilosa con aceite de chía hidrolizado se realizó de acuerdo al método alcalino de Karkalas et al. (1995), con algunas modificaciones. Para ello, se preparó una solución de almidón de alta amilosa (1,5 % p/v) en KOH 0,1 M y se calentó a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 20 min con agitación. Posteriormente, se mezcló con una solución de hidrolizado en KOH 0,1 M (10% p/p hidrolizado/almidón) a cada temperatura de templado (50, 70 o  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Una vez enfriado a temperatura ambiente, se ajustó el pH hasta  $\sim 4,6$  con HCl concentrado y la mezcla se templó a 50, 70 o  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 o 6 h con agitación constante (400 rpm) bajo atmósfera de nitrógeno para prevenir la oxidación de los ácidos grasos insaturados. Las muestras se dejaron enfriar durante la noche. Los complejos se separaron por centrifugación (4000xg, 20 min) y se realizaron dos lavados de los mismos con etanol/agua 50/50 v/v, centrifugando entre cada lavado. Los precipitados se congelaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se sometieron a liofilización durante 48 h usando un liofilizador L-A-B4-C (Rificor, Buenos Aires, Argentina) y, posteriormente, se molieron con un mortero.

2.2.6.2. Efecto de la relación hidrolizado de aceite de chía/almidón y del tratamiento con ultrasonido

Para el estudio del efecto de la relación hidrolizado/almidón, los CI se prepararon de acuerdo con el método alcalino (ver Sección 2.2.6.1), mezclando la solución de hidrolizado con la de almidón en distintas proporciones (10, 20 y 30% p/p hidrolizado/almidón, H/S), incluyendo una etapa de templado a 90 °C durante 2 h. Estos complejos templados (T) no tratados con ultrasonido formados con 10, 20 y 30% H/S se designaron como T-CI10, T-CI20 y T-CI30, respectivamente.

Los complejos tratados con ultrasonido (U) se obtuvieron mediante un protocolo similar al descrito en el párrafo anterior, al que se le incorporó una etapa de tratamiento con ultrasonido (1 min, 30% de amplitud, ciclos on/off durante 5 s cada uno) usando un homogeneizador ultrasónico VCX 750 (Sonics & Materials Inc., Newtown, EE. UU.) (**Figura 2.2**). Dicho tratamiento se realizó sobre la mezcla de hidrolizado de aceite de chía-almidón, como paso previo a la etapa de neutralización con HCl y posterior templado (ver Sección 2.2.6.1). Las condiciones de tratamiento ultrasónico fueron seleccionadas en base a un trabajo previo (Liu et al., 2018), empleándose una exposición corta para evitar la oxidación de los ácidos grasos insaturados de chía. Durante este proceso, las muestras se mantuvieron en un baño de hielo para prevenir un incremento de temperatura. Estos complejos tratados con ultrasonido (U), templados durante 2 h a 90 °C (T) y formados con 10, 20 y 30% H/S se designaron como UT-CI10, UT-CI20 y UT-CI30, respectivamente.



**Figura 2.2.** Homogeneizador ultrasónico VCX 750 (Sonics & Materials Inc., Newtown, EE. UU.)

2.2.7. Caracterización de los complejos de inclusión amilosa-ácidos grasos de chíá

2.2.7.1. Rendimiento másico

El rendimiento másico del proceso de complejación se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento másico (\%)} = \frac{M_c}{M_s + M_h} \times 100 \quad \text{Ecuación 2.6}$$

Donde:

$M_c$ : masa obtenida de complejo de inclusión luego de la liofilización (g)

$M_s$ : masa inicial de almidón (g)

$M_h$ : masa inicial de hidrolizado (g)

2.2.7.2. Contenido de ácidos  $\alpha$ -linolénico ( $C_{18:3}$ ) y linoleico ( $C_{18:2}$ ) por cromatografía gaseosa (CG)

El contenido de ácidos  $\alpha$ -linolénico y linoleico en los complejos se determinó de acuerdo al método de hidrólisis ácida descrito por Lalush et al. (2005), con algunas modificaciones. Para ello, se pesaron ~15 mg de complejo en un tubo con tapa a rosca y se adicionaron 4 mL de HCl:metanol (10% v/v). El tubo se selló y se calentó durante 20 min a 100 °C. Luego, se agregaron 2 mL de agua Milli-Q y 1 mL de hexano grado HPLC y se centrifugó durante 15 min a 1610xg usando una centrífuga Rolco CM 2036 (Rolco SRL, Buenos Aires, Argentina). La fracción de hexano superior se filtró (nylon, 25 mm x 0,22  $\mu$ m) y se cuantificaron los ésteres metílicos de ácidos grasos presentes en dicha fracción usando un cromatógrafo gaseoso Agilent Technologies 7890 A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.), empleando las mismas condiciones de separación descriptas en la Sección 2.2.3.3. El *contenido de  $C_{18:3}$  y  $C_{18:2}$*  (expresado como g de  $C_{18:3} + C_{18:2}$  / 100 g de complejo) se midió a partir de las áreas de pico de  $C_{18:3}$  y  $C_{18:2}$ , empleando curvas de calibración hechas con estándares externos de ésteres metílicos de ácidos  $\alpha$ -linolénico y linoleico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) disueltos en hexano grado HPLC.

2.2.7.3. Difracción de rayos X (DRX)

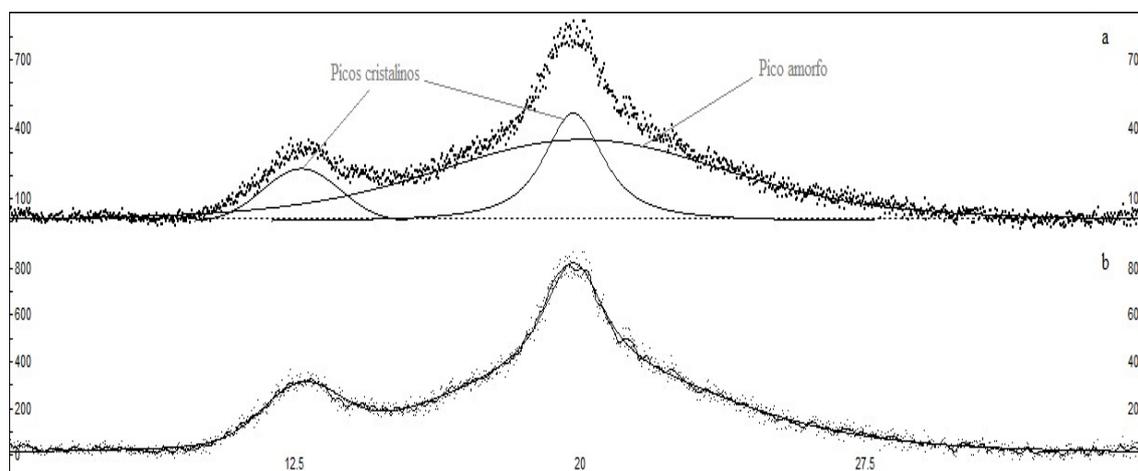
Las mediciones de difracción de rayos X de los complejos de inclusión se realizaron usando un difractómetro PANalytical X'Pert Pro (PANalytical, Países Bajos). Las condiciones operativas fueron: radiación de  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda=0,154$  nm), 40 kV de voltaje y una corriente de 40 mA. Las muestras en polvo se escanearon en un rango comprendido entre  $5$  y  $35^\circ$  ( $2\theta$ ), en pasos de  $0,02^\circ$  por 2 s. Los difractogramas obtenidos se analizaron usando el software PeakFit v4.12 (SeaSolve Software Inc., EE. UU.). El *grado de cristalinidad (%)* se calculó a partir de las áreas de los picos cristalinos y amorfo (**Figura 2.3**), usando la siguiente ecuación (Stribeck, 2007):

$$\text{Grado de cristalinidad (\%)} = \frac{A_{\text{cr}}}{A_{\text{cr}} + A_{\text{am}}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2.7}$$

Donde:

$A_{\text{cr}}$ : suma de las áreas de los picos cristalinos

$A_{\text{am}}$ : área del pico amorfo



**Figura 2.3.** Ejemplo de análisis de deconvolución de un difractograma de complejos de inclusión para el cálculo del grado de cristalinidad (a) gráfico experimental (línea punteada) y representación de los picos amorfo y cristalinos y (b) gráfico experimental (línea punteada) y gráfico resultante del ajuste por deconvolución (línea continua)

#### 2.2.7.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Las transiciones térmicas de los complejos se analizaron usando un calorímetro MDSC Q-200 (TA Instruments, New Castle, DE, EE. UU.). Los polvos se suspendieron en agua destilada (1/4 p/p complejo/agua), se pesaron aproximadamente 8-10 mg (b. h.) en cápsulas de aluminio ( $\pm 0,01$  mg) y se sellaron herméticamente. Las cápsulas se mantuvieron hasta el día siguiente a temperatura ambiente. Seguidamente, las muestras se calentaron desde 20 hasta 150 °C a una velocidad de 5 °C/min, usando una cápsula vacía como referencia. Los termogramas obtenidos se analizaron usando el software TA Instruments Universal Analysis 2000 (TA, New Castle, DE, EE. UU.).

#### 2.2.7.5. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)

Aproximadamente 5 mg de CI en polvo se colocaron directamente sobre el portamuestras de un espectrómetro de ATR-FTIR Thermo Nicolet iS10 (Thermo Scientific, MA, EE. UU.). Los espectros se midieron en un rango de 4000-500  $\text{cm}^{-1}$ , registrando 32 espectros con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ , usando el software OMNIC (versión 8.3, Thermo Scientific, MA, EE. UU.). Mediante esta metodología también se caracterizaron el almidón de maíz de alta amilosa nativo, el aceite de chía inicial y el hidrolizado de aceite libre (sin complejar). El almidón en polvo se analizó al igual que los complejos mientras que, en el caso del aceite y del hidrolizado, se colocó una gota de muestra directamente sobre el portamuestras del espectrómetro.

#### 2.2.7.6. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología de las muestras se estudió por microscopía electrónica de barrido. Los polvos se adhirieron a un portaobjetos cubierto con una película delgada de Au/Pd y se examinaron bajo condiciones de alto vacío a 5-15 kV en un microscopio electrónico de barrido modelo MA10 (Carl Zeiss SMT Ltd., Cambridge, Reino Unido).

#### 2.2.7.7. Análisis termogravimétrico (TGA)

El estudio de la estabilidad oxidativa de los CI y del hidrolizado se llevó a cabo en una termobalanza Shimadzu TA-50 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón), de acuerdo al protocolo de Marinopoulou et al. (2016a), con algunas modificaciones. Los

complejos de inclusión en polvo se secaron previamente bajo vacío a temperatura ambiente durante 48 h para eliminar cualquier humedad residual. Se colocaron aproximadamente 20 mg de CI o 4 mg de hidrolizado en cápsulas de aluminio y se sometieron al siguiente programa térmico: calentamiento desde temperatura ambiente hasta 50 °C a una velocidad de 5 °C/min, isoterma a 50 °C durante 1 min y posterior calentamiento hasta 130 °C a 0,3 °C/min. Se registró la masa de muestra durante el calentamiento y los resultados se expresaron como masa remanente (%) en función del tiempo y la temperatura.

#### 2.2.8. Análisis estadístico

Los resultados experimentales se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés) unifactorial o multifactorial, según corresponda, usando el software Statgraphics Centurion XV.II (StatPoint Technologies, Warrenton, VA, EE. UU.). La homogeneidad de las varianzas fue comprobada mediante el test de Cochran's. Cuando fue necesario, los datos fueron transformados a fin de no violar los supuestos en los que se basa este análisis. Las comparaciones múltiples entre medias se realizaron usando la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

## 2.3. Resultados y discusión

### 2.3.1. Caracterización inicial del almidón de maíz de alta amilosa (HYLON VII)

En el presente trabajo de Tesis se empleó almidón de maíz de alta amilosa (HAMS) como material complejante. El mismo, se caracterizó a través de la determinación del contenido de amilosa total, el cual fue de  $77\pm 3\%$ , valor cercano al especificado en la ficha técnica del proveedor (72%). Además, este valor se encuentra dentro del rango esperado para un HAMS (Obadi et al., 2023), el cual posee un contenido de amilosa mayor que el de un almidón normal ( $\sim 30\%$ ) (Obadi et al., 2023).

La amilosa es el componente del almidón capaz de complejar moléculas hidrofóbicas (Yang et al., 2024). Sin embargo, para la formación de los complejos de inclusión, resulta conveniente el uso del HAMS en vez de amilosa pura, dado que el primero está disponible comercialmente en grandes cantidades y a bajo costo (Fanta et al., 2015), mientras que, el segundo, tiene un elevado costo de producción ya que su extracción a partir del almidón es un proceso complejo y costoso (Kong y Ziegler, 2014b; Marinopoulou et al., 2021).

### 2.3.2. Caracterización inicial del aceite de chía

Se realizó la caracterización inicial del aceite de chía antes de la reacción de hidrólisis enzimática y la formación de los complejos. Para ello, se evaluó su calidad a través de la medición del porcentaje de ácidos grasos libres y del índice de peróxidos y se determinó su composición en ácidos grasos. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 2.1**.

**Tabla 2.1.** Ácidos grasos libres, índice de peróxidos y composición de ácidos grasos del aceite de chía

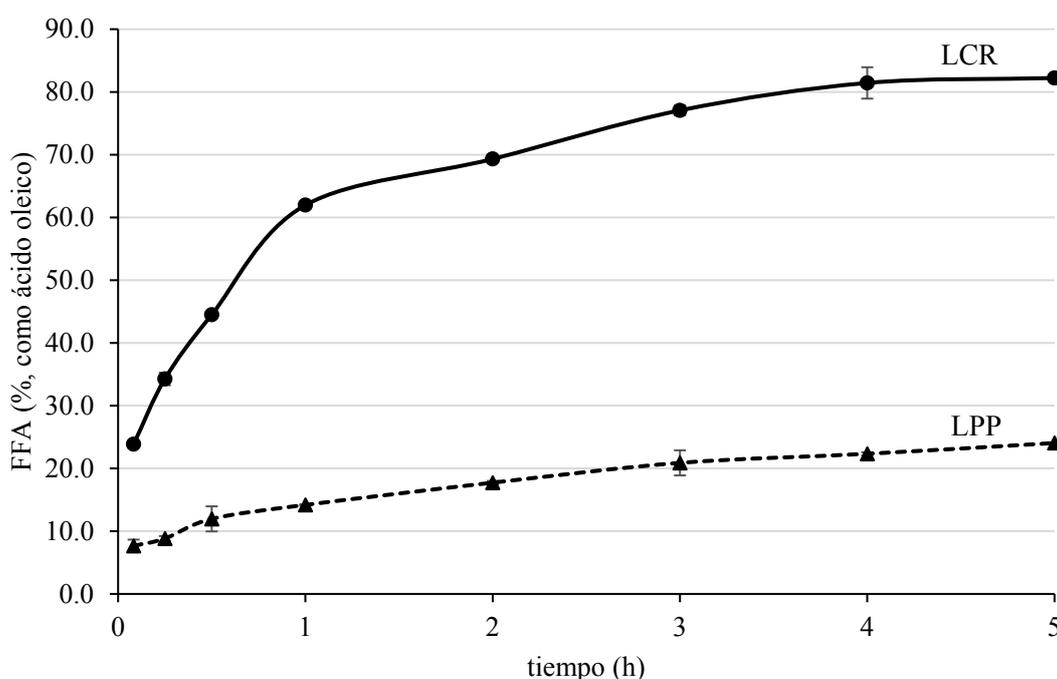
Caracterización del aceite de chía	
Ácidos grasos libres (% como ácido oleico)	0,27 ± 0,01
Índice de peróxidos (mEqO <sub>2</sub> /kg)	0,48 ± 0,00
<b>Ácido graso</b>	<b>(% del total de ácidos grasos)</b>
Palmítico (C <sub>16:0</sub> )	9,4 ± 0,7
Esteárico (C <sub>18:0</sub> )	3,2 ± 0,5
Oleico (C <sub>18:1</sub> )	5,7 ± 0,6
Linoleico (C <sub>18:2</sub> )	18,2 ± 0,3
α-Linolénico (C <sub>18:3</sub> )	63,5 ± 2,1
C <sub>18:2</sub> / C <sub>18:3</sub>	0,29 ± 0,01
SFAs	12,6 ± 1,2
MUFAs	5,7 ± 0,6
PUFAs	81,7 ± 1,8

Valores medios ± desviación estándar (n=2). MUFAs: ácidos grasos monoinsaturados; PUFAs: ácidos grasos poliinsaturados; SFAs: ácidos grasos saturados, por sus siglas en inglés

Tanto el porcentaje de ácidos grasos libres como el índice de peróxidos se encontraron por debajo de los límites máximos establecidos en el Art. 527 bis del Capítulo VII del Código Alimentario Argentino para aceite de chía de uso industrial (Código Alimentario Argentino, 2023a). A su vez, la composición de ácidos grasos mostró la predominancia de los ácidos α-linolénico (63%) y linoleico (18%), en concordancia con un perfil típico de aceite de chía (Ayerza, 1995; Ixtaina et al., 2011). Dichos ácidos grasos se encuentran esterificados a la molécula de glicerol principalmente en la forma de 1,2,3-trilínenina y 1,2-linolenin-3-linolein glicerol (Ixtaina et al., 2011). También se detectó la presencia de los ácidos palmítico, esteárico y oleico, en menor porcentaje (**Tabla 2.1**). A partir de estos resultados, podemos decir que el aceite de chía utilizado presentó altos índices de calidad y que el mismo representa una fuente natural rica en los ácidos grasos esenciales α-linolénico y linoleico.

### 2.3.3. Hidrólisis enzimática del aceite de chía y caracterización del hidrolizado extraído con solvente y por acidificación

La hidrólisis enzimática del aceite de chía se llevó a cabo previo a la formación de los complejos de inclusión, con el objetivo de obtener los ácidos grasos en forma libre, y así facilitar su complejación. Se optó por una hidrólisis enzimática, dado que las condiciones de reacción, en comparación con una hidrólisis química, son más suaves, por lo que ayudan a prevenir el deterioro de los ácidos grasos insaturados (Castejón et al., 2019). Para ello, se realizó un ensayo preliminar en el que se comparó la efectividad de dos tipos de enzimas, una de origen microbiano (lipasa de *Candida rugosa*, LCR) y otra de origen animal (lipasa pancreática porcina, LPP), para hidrolizar el aceite de chía. En la **Figura 2.4** se muestran los resultados correspondientes al progreso de los ácidos grasos liberados (FFA, %) por ambas lipasas en función del tiempo de reacción.



**Figura 2.4** Ácidos grasos libres (FFA) (% como ácido oleico) liberados por la hidrólisis enzimática del aceite de chía con las enzimas lipasas de *Candida rugosa* (LCR) y pancreática porcina (LPP)

Como puede observarse, en ambos casos se evidenció un aumento rápido en el valor de FFA (%) al inicio de la reacción, seguido de una zona de aplanamiento de la curva, en donde los FFA permanecieron casi constantes en función del tiempo. Los valores máximos alcanzados por la LCR y la LPP luego de 5 h de reacción fueron 82 y

24%, respectivamente, indicando que la LCR presentó una mayor efectividad hidrolítica que la LPP (**Figura 2.4**). Este resultado coincide con el de un estudio previo, en el que se observó que, en términos de la formación de ácidos grasos libres, la LCR es más efectiva que la LPP durante la hidrólisis de aceite de soja (Freitas et al., 2007). La enzima microbiana cataliza la hidrólisis de los triacilgliceroles al azar y, por lo tanto, es capaz de liberar todo tipo de cadenas acílicas, independientemente de su posición en la molécula de glicerol (Freitas et al., 2007). La enzima de origen animal, en cambio, es una enzima típica *sn*-1,3 específica, es decir, la hidrólisis de los triacilgliceroles ocurre tanto en las posiciones *sn*-1 como *sn*-3 del glicerol, mientras que el ácido graso esterificado en la posición *sn*-2 permanece no hidrolizado (Carvalho et al., 2003; Mendes et al., 2012). Esto podría explicar la mayor efectividad de la LCR en comparación con la LPP durante la hidrólisis del aceite de chía.

En base a estos resultados, se seleccionó la enzima de *Candida rugosa* para la obtención de los ácidos grasos libres de chía (*hidrolizado*), los cuales posteriormente se utilizarán como ligando en la etapa de complejación. El hidrolizado empleado en la Parte I del presente Capítulo, se recuperó de la mezcla de reacción mediante una extracción líquido-líquido (Sección 2.2.5.1) mientras que, el usado en la Parte II fue obtenido por un método de extracción ácida (Sección 2.2.5.2). En la **Tabla 2.2** se presenta la composición de ácidos grasos de los hidrolizados extraídos por ambos métodos.

**Tabla 2.2.** Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) del hidrolizado de aceite de chía obtenido por reacción con la lipasa de *Candida rugosa* y posterior extracción con solvente y ácida

Ácido graso	Perfil de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos)	
	Extracción con solvente	Extracción ácida
Palmítico (C <sub>16:0</sub> )	7,4 ± 0,7	6,6 ± 0,5
Estearico (C <sub>18:0</sub> )	2,4 ± 0,1	2,1 ± 0,4
Oleico (C <sub>18:1</sub> )	6,2 ± 0,0	4,7 ± 0,4
Linoleico (C <sub>18:2</sub> )	18,4 ± 0,0	18,2 ± 0,7
α-Linolénico (C <sub>18:3</sub> )	65,3 ± 0,5	68,4 ± 0,1
Araquídico (C <sub>20:0</sub> )	0,2 ± 0,1	n. d.
Gadoleico (C <sub>20:1</sub> )	0,1 ± 0,0	n. d.

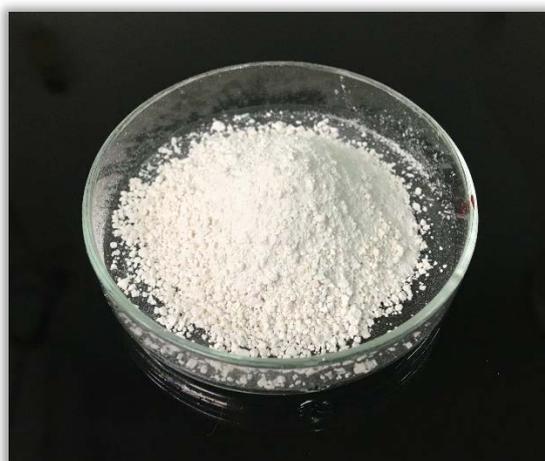
Valores medios ± desviación estándar (n=2). n. d: no detectado

Como puede observarse, el aceite de chía hidrolizado con la LCR y extraído tanto con solvente como por acidificación mostraron una composición similar a la del aceite original, con la predominancia de los ácidos  $\alpha$ -linolénico (65-68%) y linoleico (~18%) (**Tabla 2.2**). Este resultado sugiere que la reacción enzimática no modificó la composición ácida respecto a la del aceite original y que el hidrolizado obtenido por ambos tipos de extracción es apto para ser empleado como un ligando rico en ácidos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 durante la etapa posterior de complejación.

## Parte I. Caracterización de los complejos de inclusión templados: efecto del tiempo y de la temperatura de templado

### 2.3.4. Rendimiento másico y contenido de ácidos grasos

Durante la formación de los complejos de inclusión, luego de la etapa de acidificación con HCl, se observó la formación de una dispersión de partículas blancas, asociada a la formación de los complejos (Seo et al., 2015). Posteriormente, los complejos se separaron por centrifugación, se lavaron con una mezcla etanol/agua, se liofilizaron y molieron, obteniéndose un polvo de color blanco (**Figura 2.5**).



**Figura 2.5.** Complejos de inclusión formados entre el almidón de maíz de alta amilosa y los ácidos grasos de aceite de chía luego de la liofilización y molienda

En la **Tabla 2.3** se muestran los rendimientos másicos del proceso de complejación empleando distintos tiempos (2 y 6 h) y temperaturas (50, 70 y 90 °C) de templado. Como puede observarse, dicho parámetro estuvo comprendido entre 62,5 y 72,0%, registrándose una disminución a medida que aumentó la temperatura de templado. Sin embargo, dicho descenso sólo fue significativo cuando el tratamiento de templado se incrementó desde 50 °C-6 h hasta 90 °C durante 2 o 6 h ( $p \leq 0,05$ ). El tiempo de templado no tuvo efecto significativo en el rendimiento másico ( $p > 0,05$ ) (**Tabla 2.3**).

**Tabla 2.3.** Rendimiento másico (%), contenido de ácidos linoleico (C<sub>18:2</sub>) +  $\alpha$ -linolénico (C<sub>18:3</sub>) y relación C<sub>18:2</sub>/C<sub>18:3</sub> de los complejos amilosa-ácidos grasos de chía formados usando diferentes tiempos y temperaturas de templado

Temperatura (°C)	tiempo (h)	Rendimiento másico (%) (g CI/g almidón+g hidrolizado)	C <sub>18:2</sub> + C <sub>18:3</sub> (g/100 g CI)	C <sub>18:2</sub> / C <sub>18:3</sub>
50	2	69,5 ± 0,2 <sup>ab</sup>	2,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,42 ± 0,00 <sup>a</sup>
	6	72,0 ± 1,3 <sup>a</sup>	3,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,08 <sup>a</sup>
70	2	66,6 ± 3,5 <sup>ab</sup>	2,4 ± 0,4 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,06 <sup>a</sup>
	6	67,1 ± 1,6 <sup>ab</sup>	2,7 ± 0,8 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,03 <sup>a</sup>
90	2	62,5 ± 3,2 <sup>b</sup>	3,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,42 ± 0,03 <sup>a</sup>
	6	62,9 ± 1,8 <sup>b</sup>	3,0 ± 1,1 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,01 <sup>a</sup>

Valores medios ± desviación estándar (n=2) seguidos por distintas letras en cada columna difieren significativamente ( $p \leq 0,05$ ), de acuerdo al test de Tukey (HSD). CI: complejo de inclusión

A la temperatura más alta estudiada (90 °C), una mayor cantidad de almidón pudo haber permanecido soluble en el medio, interactuando más débilmente con los ácidos grasos de chía, resultando así en una disminución de la cantidad de complejo amilosa-lípido obtenido como precipitado, lo que se tradujo en un menor rendimiento másico. En un trabajo previo, se realizó la complejación del ácido  $\alpha$ -linolénico por el método alcalino usando condiciones de reacción similares a las empleadas en el presente Capítulo (relación ligando/almidón 10% p/p, a 50, 70 y 90 °C) (Lin et al., 2011). En dicho trabajo, se informó un rendimiento másico comprendido entre ~60 y 80%, el cual es similar al obtenido en los CI amilosa-ácidos grasos de chía (**Tabla 2.3**). Por lo tanto, si bien el ligando usado en el presente trabajo no está formado por C<sub>18:3</sub> puro, sino por una mezcla de ácidos grasos en la que el C<sub>18:3</sub> es el que se encuentra en mayor porcentaje (**Tabla 2.2**), se alcanzaron valores de rendimiento similares a aquellos obtenidos cuando se emplea C<sub>18:3</sub> puro como molécula huésped. Asimismo, la complejación de ácido linoleico conjugado (CLA) con amilosa de papa empleando los métodos de DMSO y alcalino revelaron valores de rendimiento comprendidos entre 52 y 72% (Lalush et al., 2005; Yang et al., 2009). Por lo tanto, el rendimiento encontrado en el caso de los complejos formados

con ácidos grasos de chía es similar al que se obtiene usando ácidos grasos comerciales puros como molécula huésped.

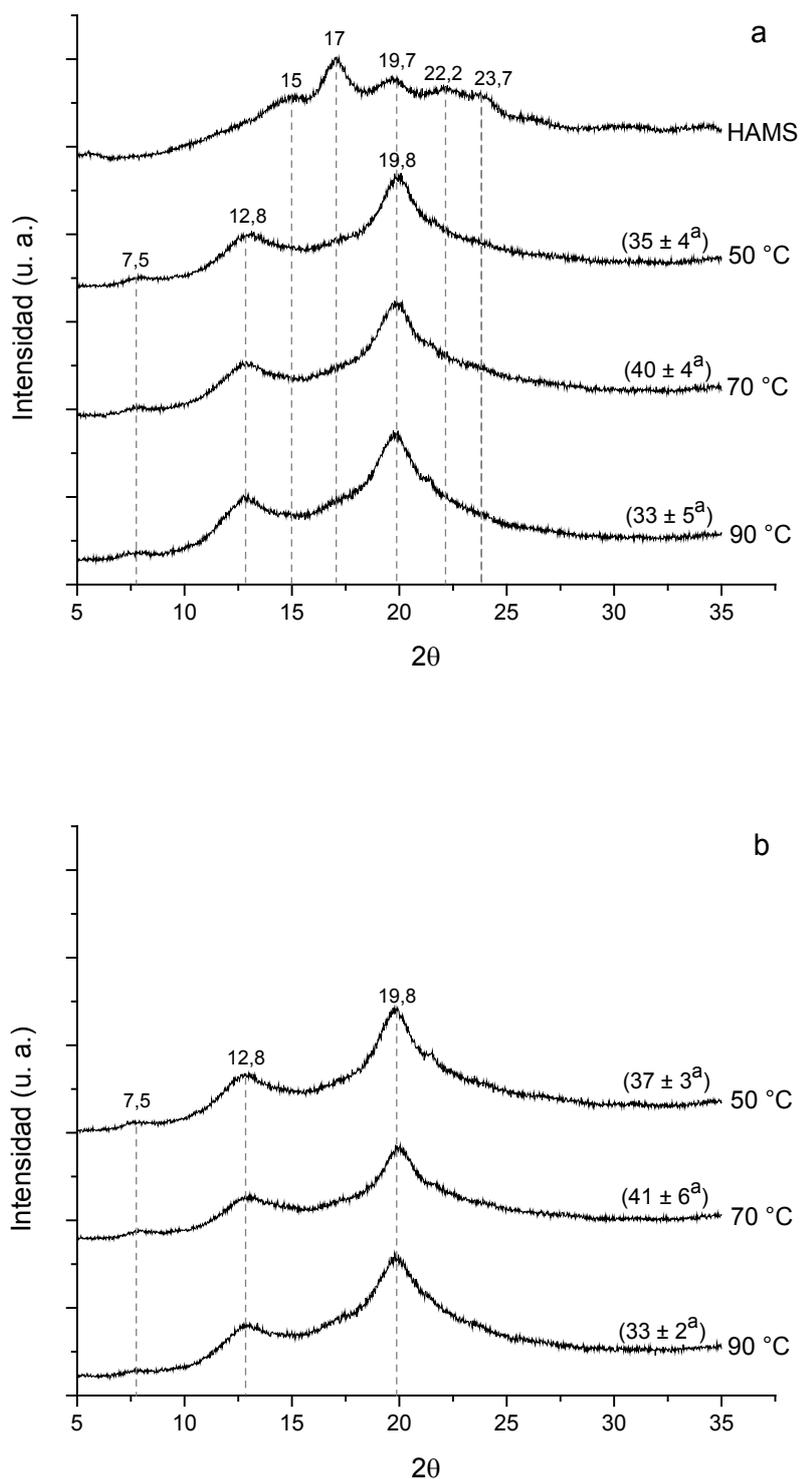
Cuando los CI se caracterizaron en términos de su composición en ácidos grasos, se encontró que el contenido de ácidos  $C_{18:2} + C_{18:3}$  estuvo comprendido entre 2,4 y 3,1% (**Tabla 2.3**). Karkalas y Raphaelides (1986), demostraron que la concentración de saturación de amilosa de los ácidos  $C_{18:3}$  y  $C_{18:2}$  es de 7,6% (ver Sección 2.1.3). Dicho valor, es superior a aquel encontrado en los complejos almidón-ácidos grasos de chía. Esto podría atribuirse a distintos factores. Por un lado, el aceite de chía hidrolizado empleado como ligando posee otros ácidos grasos (además del  $C_{18:3}$  y  $C_{18:2}$ ), los cuales también fueron retenidos por la matriz del complejo. Por otro lado, en el trabajo mencionado anteriormente, se empleó amilosa pura como material complejante, mientras que en el presente Capítulo se usó almidón de maíz con 77% de amilosa (Sección 2.3.1). Dado que la amilosa es el componente capaz de formar complejos (Yang et al., 2024), en el HAMS existe una menor cantidad de amilosa disponible para complejar, lo que podría resultar en una menor cantidad de ácido graso retenido por cada 100 g de complejo. Otro aspecto importante a analizar es la relación  $C_{18:2} / C_{18:3}$ . El aceite de chía inicial presentó una relación  $C_{18:2} / C_{18:3}$  de 0,29 (**Tabla 2.1**) mientras que, en los complejos, ésta fue de  $\sim 0,40$ , no encontrándose diferencias significativas entre los complejos templados bajo las distintas condiciones de t-T ( $p > 0,05$ ) (**Tabla 2.3**). Este aumento en la relación  $C_{18:2} / C_{18:3}$  con respecto al ligando inicial podría atribuirse a una degradación del ácido  $\alpha$ -linolénico durante el proceso de complejación y/o a que el mayor número de dobles enlaces *cis* C=C presentes en el ácido  $\alpha$ -linolénico genera una distorsión de la hélice de amilosa, dificultando su complejación (Guo et al., 2021; Zhou et al., 2022), resultando así en una menor cantidad de  $C_{18:3}$  retenido en la matriz del complejo. A pesar de esta variación en la relación  $C_{18:2} / C_{18:3}$  luego de la complejación, el contenido de ácido  $\alpha$ -linolénico se mantuvo siempre por encima del contenido de ácido linoleico, al igual que ocurre en el aceite de chía original.

Los complejos formados bajo las distintas condiciones de t-T ensayadas no presentaron diferencias significativas en su contenido de  $C_{18:2} + C_{18:3}$  ( $p > 0,05$ ) (**Tabla 2.3**). En otro trabajo en el que se estudió el efecto del tiempo y la temperatura de reacción en los CI formados entre la amilosa con distintos ácidos grasos, se encontró que el contenido de  $C_{18:3}$  y  $C_{18:2}$  disminuyó cuando el tiempo de reacción a 90 °C fue superior a 6 h y cuando la temperatura de reacción durante 24 h fue mayor a 70 °C (Seo et al., 2015). Los autores atribuyeron dicho comportamiento a la degradación oxidativa de los PUFAs

que ocurre cuando éstos son sometidos a altas temperaturas y largos períodos de tiempo de complejación. En el presente Capítulo, por el contrario, no se observó una disminución de los PUFAs de chía cuando el tiempo de reacción se incrementó desde 2 hasta 6 h, ni cuando la temperatura se aumentó desde 50 hasta 90 °C. Esto podría atribuirse a que las condiciones empleadas fueron más suaves, en comparación con aquellas usadas en el trabajo mencionado anteriormente.

### 2.3.5. Difracción de rayos X (DRX)

La estructura cristalina de los complejos se caracterizó por difracción de rayos X. En la **Figura 2.6** se muestran los patrones correspondientes al almidón de maíz de alta amilosa nativo y a los complejos amilosa-ácidos grasos de chía templados durante 2 y 6 h a 50, 70 y 90 °C (**Figura 2.6**). Como puede observarse, el almidón de maíz nativo mostró una reflexión principal a  $\sim 17^\circ$  ( $2\theta$ ) junto con otras de menor intensidad a aproximadamente 15,0; 19,7; 22,2 y 23,7° (**Figura 2.6a**). Estos valores concuerdan con los de un patrón típico tipo B, el cual es característico de almidones de alta amilosa (Han et al., 2023; Lopez-Rubio, Flanagan, Shrestha, et al., 2008; Zobel, 1988b, 1988a). Además de dichos picos, también puede apreciarse un halo amplio subyacente, reflejando una baja cristalinidad debido a la contribución de regiones amorfas al patrón de difracción. En este sentido, el grado de cristalinidad del almidón de maíz de alta amilosa nativo fue de 20%, el cual es típico de almidones con estructura tipo B (Obadi et al., 2023; Zobel, 1988a).



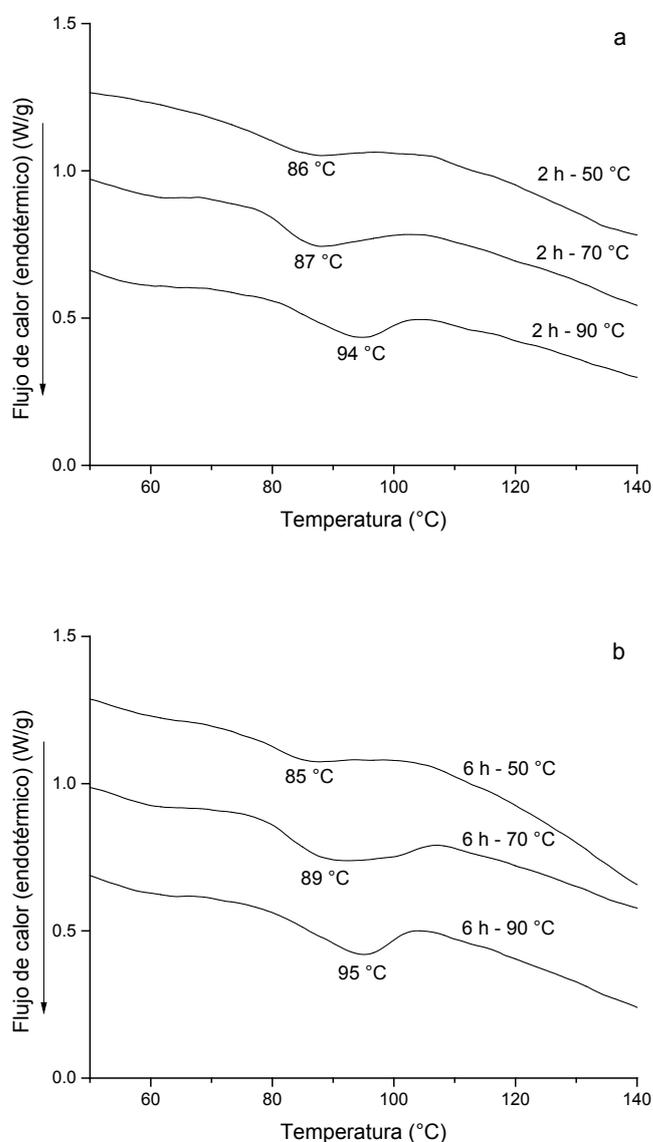
**Figura 2.6.** Difractogramas de rayos X de (a) almidón de maíz de alta amilosa nativo (HAMS) y complejos amilosa-ácidos grasos de chía templados durante 2 h a 50, 70 y 90 °C y (b) complejos amilosa-ácidos grasos de chía templados durante 6 h. Los valores entre paréntesis indican el grado de cristalinidad. Letras superíndices iguales indican que no hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), de acuerdo al test de Tukey

Todos los complejos de inclusión templados bajo las distintas condiciones de tiempo y temperatura presentaron dos reflexiones principales a  $\sim 12,8$  y  $19,8^\circ$  y un pico de muy baja intensidad a  $\sim 7,5^\circ$  (**Figura 2.6a y b**). Esto concuerda con un patrón típico de V-amilosa hidratada ( $V_h$ ) (Zobel, 1988b), la cual contiene seis unidades de glucosa por giro helicoidal e incluye moléculas de agua en la celda unidad. Estos resultados sugieren que todas las condiciones de reacción empleadas promovieron la efectiva formación de los complejos de inclusión amilosa-ácidos grasos de chía bajo la forma V. Si bien se considera que la cadena lineal de los ácidos grasos saturados facilita la formación de los CI, se ha demostrado que también es posible formar exitosamente complejos de inclusión con distintos ácidos grasos insaturados, incluyendo el ácido oleico, linoleico,  $\alpha$ -linolénico y linoleico conjugado (Karkalas et al., 1995; Lalush et al., 2005; Marinopoulou et al., 2016b; Seo et al., 2015; Seok et al., 2019). Karkalas et al. (1995) sugirió que la rotación libre alrededor de los enlaces simples C-C adyacentes a los dobles enlaces C=C, permite a los ácidos insaturados adoptar una conformación casi lineal, exhibiendo así una capacidad de complejación similar a la de los ácidos saturados. En trabajos previos se ha demostrado que los ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico y  $\alpha$ -linolénico (aquellos que componen el hidrolizado), son capaces de formar complejos tipo V cuando se los utiliza como ligando individualmente, es decir, en la forma comercial pura, y empleando distintos métodos, tales como el de alta temperatura, DMSO, alcalino y V-amilosa preformada (Marinopoulou et al., 2016b; Seo et al., 2015; Zhou et al., 2022). A partir de los resultados de DRX encontrados, podemos decir que también es posible formar complejos amilosa-lípido cuando el ligando está compuesto por una mezcla de dichos ácidos grasos, resultante de la hidrólisis enzimática del aceite de chía.

Todos los difractogramas de los CI fueron consistentes con una estructura semicristalina, con un grado de cristalinidad comprendido entre 33 y 41% (**Figura 2.6a y b**). Este valor es similar a aquel encontrado en complejos formados con ácidos grasos puros (Marinopoulou et al., 2016b; Zhou et al., 2022). Asimismo, no se observaron diferencias significativas en el grado de cristalinidad de los distintos complejos estudiados ( $p > 0,05$ ) (**Figura 2.6a y b**). Teniendo en cuenta que dicho parámetro se ha relacionado positivamente con la habilidad de complejación (Kong & Ziegler, 2014; Li & Lim, 2016; Liu et al., 2018; Seok et al., 2019) y con la cantidad de ácido graso retenido en los CI (Seo et al., 2015), el comportamiento observado concuerda con el contenido de ácidos grasos de los CI, el cual no varió significativamente bajo las distintas condiciones experimentales evaluadas (Sección 2.3.4).

2.3.6. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

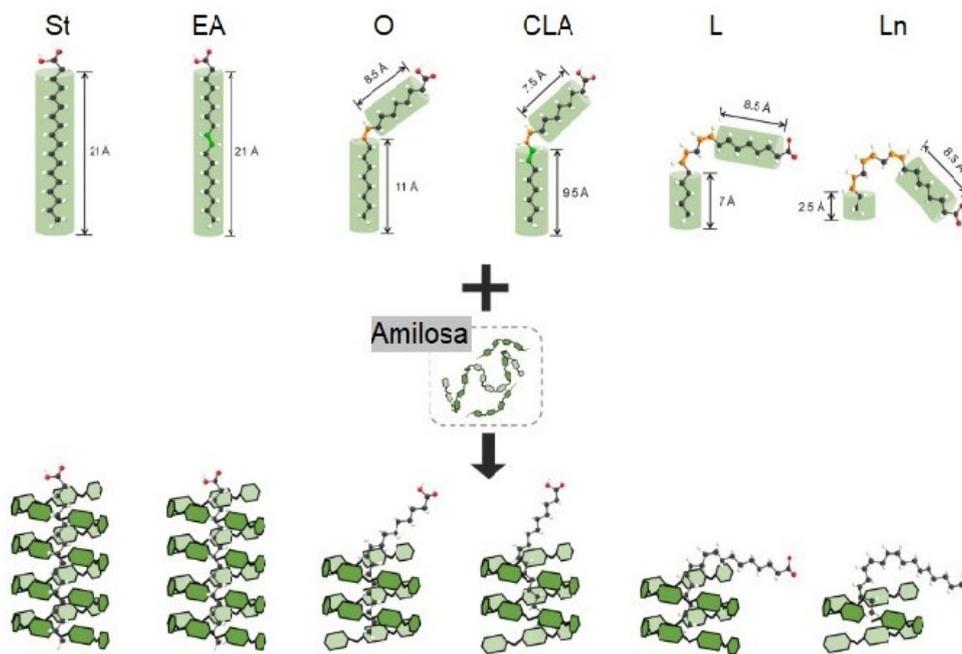
El análisis de DSC de los complejos de inclusión se llevó a cabo con el objetivo de estudiar el efecto del tiempo y la temperatura de templado sobre sus propiedades térmicas. Los termogramas obtenidos se muestran en la **Figura 2.7**. Como puede observarse, todas las muestras exhibieron una única endoterma amplia, cuya temperatura de pico ( $T_p$ ) estuvo comprendida en el rango de 85-95 °C. Dicha transición, se asocia a la disociación del complejo amilosa-lípido (Karkalas et al., 1995; Kong et al., 2019), por lo que confirma la efectiva complejación de los ácidos grasos de chía, en concordancia con los resultados de DRX (Sección 2.3.5).



**Figura 2.7.** Termogramas de DSC de complejos amilosa-ácidos grasos de chía templados durante (a) 2 h y (b) 6 h a diferentes temperaturas (50, 70 y 90 °C). Se indica la temperatura de pico ( $T_p$ )

No se registró un efecto significativo sobre la  $T_p$  ( $p > 0,05$ ) cuando el tiempo de templado se incrementó desde 2 hasta 6 h. Contrariamente, dicho parámetro aumentó significativamente ( $p \leq 0,05$ ) a medida que se incrementó la temperatura de templado. Esto concuerda con el comportamiento observado en complejos monoácidos (formados con ácidos grasos puros) (Biliaderis y Galloway, 1989; Karkalas et al., 1995; Marinopoulou, Papastergiadis, et al., 2019; Marinopoulou et al., 2016a, 2016b; Seo et al., 2015, 2016; Zabar et al., 2010). En general, el aumento de la  $T_p$  con el incremento en la temperatura de formación se ha asociado a la transición desde la forma polimórfica I hacia la II (Sección 1.3.3). A bajas temperaturas ( $\leq 60$  °C), la velocidad de nucleación es alta, lo que promueve un “congelamiento” rápido y aleatorio de los segmentos de cadena helicoidales, favoreciendo la formación de polimorfos tipo I. A temperaturas mayores ( $\geq 90$  °C), la velocidad de nucleación es menor, permitiendo a la formación de los complejos progresar como un proceso de cristalización convencional, dando origen a una estructura parcialmente cristalina (tipo II), la cual se caracteriza por una mayor  $T_p$ . Las endotermas de los complejos amilosa-ácidos grasos de chía son amplias, y no se detectan picos separados bien definidos asociados a las distintas formas polimórficas (**Figura 2.7**), lo que dificulta la distinción entre polimorfos I y II. Sin embargo, teniendo en cuenta que las  $T_p$  de todas las muestras en estudio fueron inferiores a 100 °C, se podría considerar que todas las condiciones de reacción ensayadas (t-T) promovieron la formación de la Forma I (Zhou et al., 2022).

Otro aspecto relevante a analizar es la variación de la  $T_p$  con el tipo de ligando. La  $T_p$  de los CI se asocia al espesor lamelar (Kong et al., 2019; Shi et al., 2019), el cual depende principalmente de la estructura del ligando. Aquellos ligandos cuya estructura molecular favorece la interacción hidrofóbica con la amilosa (cadena alquílica larga, menor sección transversal) generalmente forman CI con mayor estabilidad térmica (Gao et al., 2020, 2021; Lay Ma et al., 2011; Zhang et al., 2020). En este sentido, en el caso de complejos amilosa-ácido graso, se ha observado que en general la estabilidad térmica aumenta a medida que se incrementa la longitud de cadena y disminuye con el aumento del grado de insaturación (Tufvesson et al., 2003b). Esto se ilustra en la **Figura 2.8**, para complejos formados con ácidos grasos de 18 átomos de carbono, que difieren en el grado de insaturación y en el tipo de configuración.



**Figura 2.8.** Representación esquemática de la complejación entre la amilosa con varios ácidos grasos de 18 átomos de carbono, incluyendo ácido esteárico (St), eláidico (*trans* C<sub>18:1</sub>, EA), oleico (O), linoleico conjugado (CLA), linoleico (L) y  $\alpha$ -linolénico (Ln) (Zhou et al., 2022)

Dado que el ligando utilizado consiste en una mezcla de ácidos grasos, las endotermas amplias observadas en la **Figura 2.7** podrían ser el resultado de la superposición de varias endotermas individuales, originadas por la disociación de complejos formados entre la amilosa con los distintos ácidos grasos del aceite de chía. Tufvesson et al. (2003b) demostraron que los complejos formados con ácidos  $\alpha$ -linolénico, linoleico, oleico, palmítico y esteárico presentaron endotermas cuya  $T_p$  fue de 85,7; 93,6; 102,8; 96,8 y 109,1 °C. Por lo tanto, aquellos CI amilosa-hidrolizado de aceite de chía formados a 50 °C, presentaron una  $T_p$  (85 °C) similar a la del complejo amilosa-ácido  $\alpha$ -linolénico, el cual es el ácido graso que se encuentra en mayor proporción en el hidrolizado (ver Sección 2.3.3). Adicionalmente, los complejos tratados a 90 °C, presentaron una  $T_p$  (95 °C) similar a la de los complejos monoácidos formados con aquellos ácidos saturados que componen el hidrolizado, especialmente palmítico. Por lo tanto, el incremento en la  $T_p$  observado como resultado del aumento de la temperatura de formación podría asociarse a que el tratamiento a altas temperaturas favorecería la interacción entre la amilosa con la fracción de ácidos grasos más saturados que componen el hidrolizado, mientras que las bajas temperaturas podrían promover la interacción con los ácidos poliinsaturados, especialmente  $\alpha$ -linolénico. Dicha variación observada en la

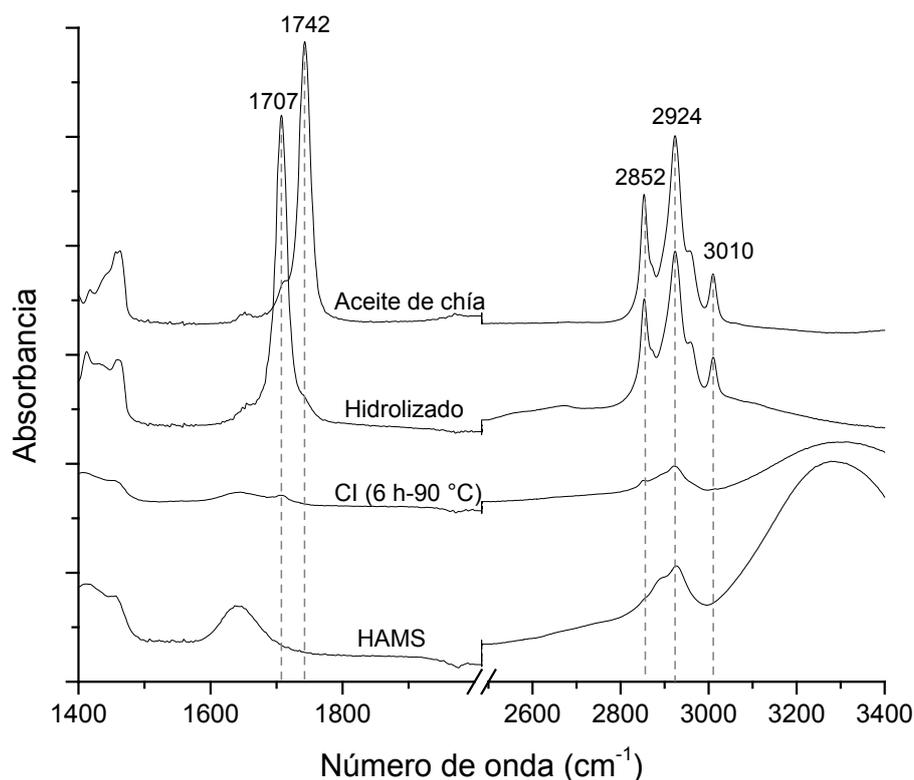
estabilidad térmica de los complejos en función de la temperatura de templado es un aspecto relevante a tener en cuenta para poder seleccionar aquellas condiciones (t-T) que promuevan la formación de CI cuyas propiedades fisicoquímicas se ajusten a la matriz alimentaria y a las condiciones de procesamiento a las que serán sometidos en el futuro.

Los complejos amilosa-ácidos grasos de chía presentaron una entalpía de fusión comprendida entre 8,0 y 11,2 J/g (b. s.). Este valor es similar al de complejos monoácidos formados con aquellos ácidos grasos mayoritarios que componen el hidrolizado ( $\alpha$ -linolénico, linoleico y oleico) ( $\Delta H \sim 9-10$  J/g) (Tufvesson et al., 2003b). Adicionalmente, se observó que tanto el tiempo como la temperatura de templado no tuvieron efecto significativo ( $p > 0,05$ ) en los valores de  $\Delta H$ . Este parámetro se ha asociado a la cantidad de moléculas huésped incluidas (Shi et al., 2019) y se ha correlacionado positivamente con el contenido de ácidos grasos de los CI y, por lo tanto, con la habilidad de complejación (Karkalas et al., 1995; Seo et al., 2015). En este sentido, el comportamiento observado en los valores de  $\Delta H$  concuerda con el contenido de ácidos grasos de los CI, el cual no varió significativamente bajo las distintas condiciones de templado evaluadas (ver Sección 2.3.4).

### 2.3.7. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)

La caracterización de las muestras en estudio a través de la identificación de bandas típicas de grupos funcionales se llevó a cabo mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR). Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 2.9**.

Como puede observarse, el espectro del aceite de chía presentó dos bandas de alta intensidad en 2852 y 2924  $\text{cm}^{-1}$ , correspondientes a la vibración simétrica y asimétrica de los grupos  $\text{CH}_2$  de las cadenas alquílicas de ácidos grasos, respectivamente (Guillen y Cabo, 1997) (**Figura 2.9**). Además, se encontró una banda de menor intensidad a 3010  $\text{cm}^{-1}$ , originada por la vibración  $=\text{C-H}$  de los dobles enlaces *cis* presentes en los ácidos grasos insaturados. A su vez, el aceite presentó un pico principal a 1742  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponde al estiramiento del enlace éster entre el glicerol y los ácidos grasos en la molécula de triacilglicerol.



**Figura 2.9.** Espectros de ATR- FTIR de aceite de chía, aceite de chía hidrolizado, complejos de inclusión amilosa-ácidos grasos de chía (templados 6 h a 90 °C) y almidón de maíz de alta amilosa nativo (HAMS)

Contrariamente, en el espectro del hidrolizado de aceite de chía obtenido por reacción con la enzima de *Candida rugosa*, no se detectó la presencia del pico a 1742  $\text{cm}^{-1}$  (**Figura 2.9**). Esto se debe a la ruptura del enlace éster por la reacción de hidrólisis y confirma que el hidrolizado está formado principalmente por ácidos grasos libres. En este sentido, en dicha muestra se detectó la presencia de un nuevo pico de alta intensidad a 1707  $\text{cm}^{-1}$ , originado por la vibración del  $\text{-C=O}$  del grupo funcional ácido de los ácidos grasos libres (**Figura 2.9**).

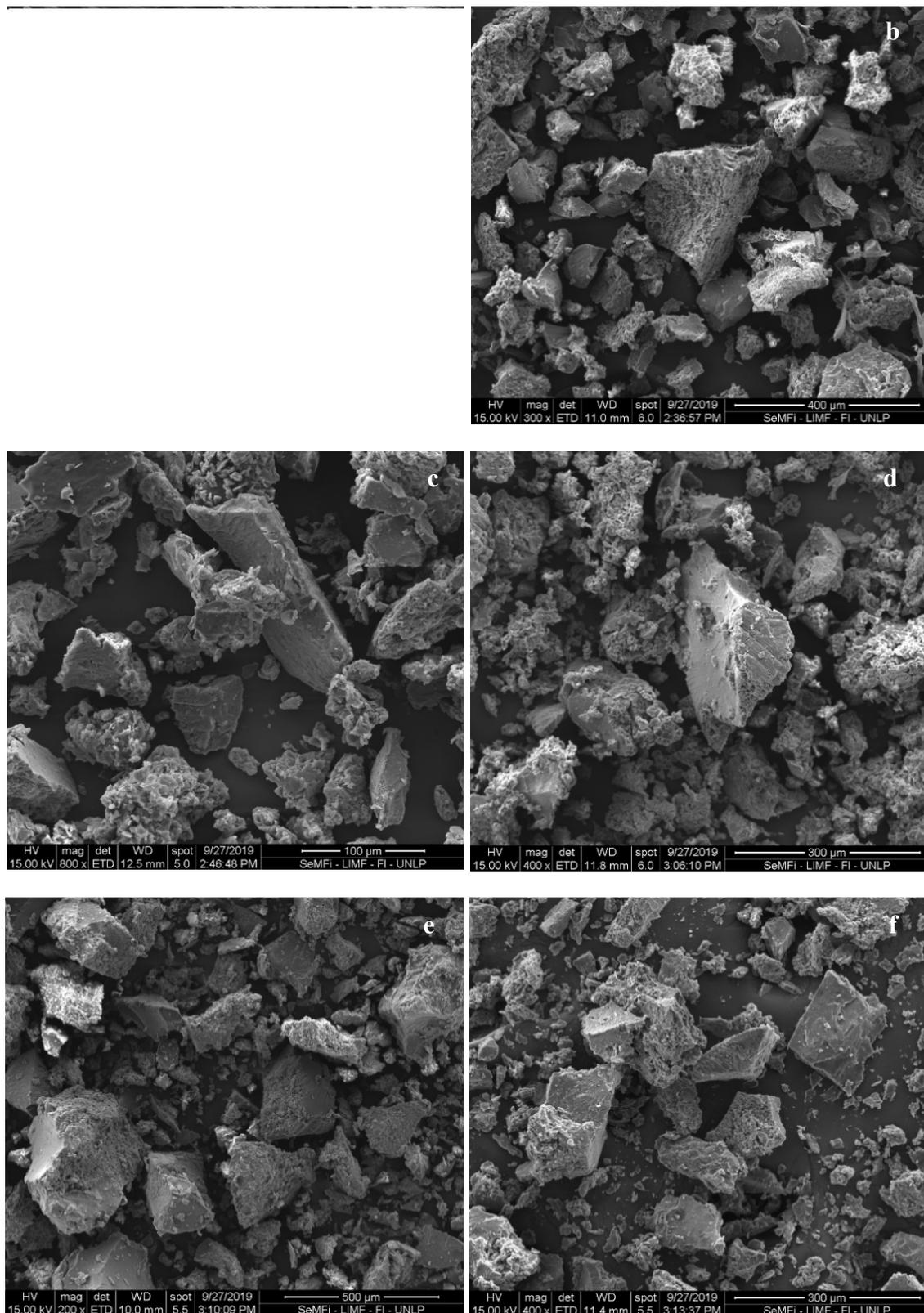
Los complejos de inclusión formados bajo las distintas condiciones de t-T exhibieron espectros similares, por lo que en la **Figura 2.9** se muestra sólo el espectro correspondiente al CI templado durante 6 h a 90 °C. En el mismo, se observan dos bandas de baja intensidad a 1707 y 2852  $\text{cm}^{-1}$ , las cuales no están presentes en el espectro del HAMS nativo (**Figura 2.9**). La detección de estas bandas típicas de ácidos grasos en el espectro de los CI confirma la presencia de ácidos grasos de chía retenidos en la matriz del complejo (Fanta et al., 1999), que podrían ubicarse tanto en la cavidad interna de la

hélice de amilosa como atrapados físicamente en los espacios intersticiales de hélices adyacentes (Guo et al., 2018). Este resultado concuerda con la confirmación de la formación de los complejos por DRX y DSC. A pesar de que el aceite de chía hidrolizado usado como ligando presenta un alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados y que por CG se pudo evidenciar la presencia de estos ácidos en los complejos, la banda a  $3010\text{ cm}^{-1}$  originada por la vibración  $=\text{C-H}$  de los dobles enlaces *cis* fue prácticamente indetectable en el espectro de los complejos (**Figura 2.9**). Esto podría deberse a la retención de dichos ácidos grasos insaturados en la estructura del almidón, lo que podría enmascarar la absorción en IR (Guo et al., 2021).

### 2.3.8. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las propiedades morfológicas de los complejos amilosa-lípido se analizaron por microscopía electrónica de barrido. En la **Figura 2.10** se muestran las micrografías de los CI templados durante 2 y 6 h a 50, 70 y 90 °C.

En ellas, puede apreciarse la presencia de partículas sólidas con formas y tamaños variables. Las mismas, presentaron una forma irregular y una superficie principalmente rugosa, con características similares a las partículas de complejos monoácidos formados por el método alcalino (Marinopoulou et al., 2016a). No se observan diferencias en las micrografías de los CI formados bajo las distintas condiciones de reacción en estudio (**Figura 2.10**), indicando que tanto el tiempo como la temperatura de templado no tuvieron efecto sobre las propiedades morfológicas de los complejos a nivel microscópico.

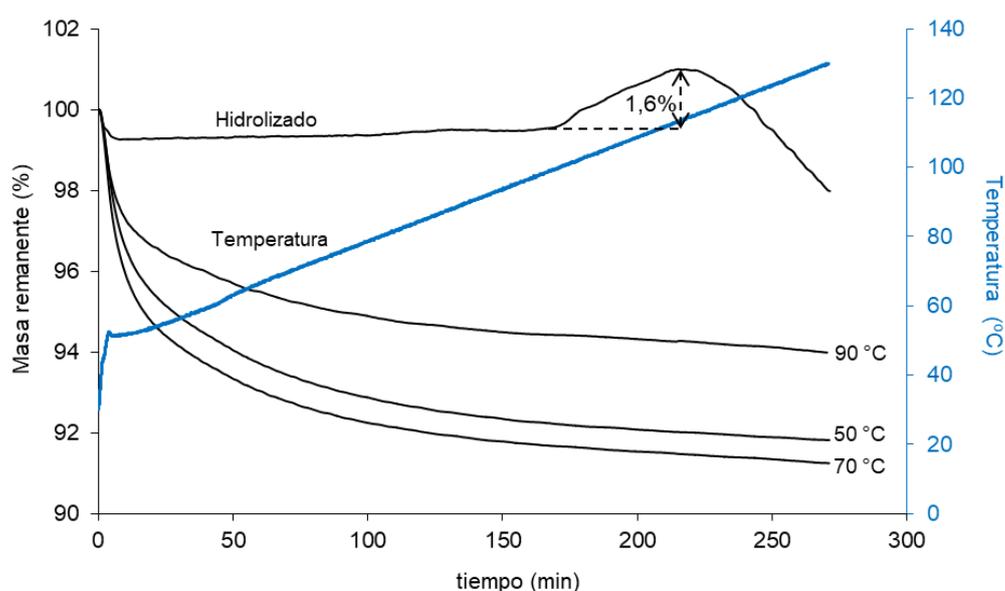


**Figura 2.10.** Micrografías electrónicas de barrido de complejos amilosa-ácidos grasos de chíá templados durante (a) 2 h-50 °C, (b) 2 h-70 °C, (c) 2 h-90 °C, (d) 6 h-50 °C, (e) 6 h-70 °C y (f) 6 h-90 °C

Estos resultados coinciden con los registrados en complejos monoácidos, en los que no se observaron diferencias entre las micrografías de los CI formados a distintas temperaturas (Marinopoulou et al., 2016a; Zabar et al., 2009). Zabar et al. (2010) mostraron que los complejos amilosa-ácido linoleico conjugado eran lisos, mientras que aquellos formados con ácido esteárico presentaban cristales de ácido graso incrustados en la matriz. Si bien el aceite de chía hidrolizado usado como ligando presenta ácidos grasos saturados en su composición (palmítico y esteárico), en las imágenes de SEM de los complejos formados no se detectó la presencia de cristales de ácidos grasos saturados. Esto podría atribuirse a que el hidrolizado está formado mayoritariamente por ácidos insaturados, mientras que los saturados se encuentran en una baja proporción (<10%).

### 2.3.9. Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico se usó para estudiar la estabilidad oxidativa acelerada de los complejos de inclusión y del aceite de chía hidrolizado. Teniendo en cuenta que el tiempo de templado no tuvo efecto significativo en las distintas propiedades de los CI estudiadas en las secciones anteriores, en el presente ensayo se analizaron sólo aquellas muestras templadas durante 2 h a las distintas temperaturas (50, 70 y 90 °C). Los resultados obtenidos se presentan en la **Figura 2.11**.



**Figura 2.11.** Estabilidad oxidativa determinada mediante análisis termogravimétrico del aceite de chía hidrolizado y de los complejos amilosa-ácidos grasos de chía templados durante 2 h a 50, 70 y 90 °C

En el caso del hidrolizado libre (sin complejar), se registró un aumento gradual de la masa, el cual se inició a  $\sim 100$  °C, alcanzando un valor máximo (+1,6%) a  $\sim 115$  °C con respecto a la masa inicial (**Figura 2.11**). Esta ganancia de masa puede atribuirse a la captación de oxígeno que ocurre durante la oxidación del hidrolizado, dado que el mismo está formado principalmente por ácidos grasos poliinsaturados ( $C_{18:3}$  y  $C_{18:2}$ ) (ver Sección 2.3.3), los cuales son altamente susceptibles a la oxidación lipídica debido a la presencia de dobles enlaces *cis* en sus cadenas hidrocarbonadas, que reaccionan fácilmente con el oxígeno generando así el aumento en la masa registrado por la termobalanza. Por encima de 115 °C, se observó una pérdida de masa, atribuible a la degradación térmica de los ácidos grasos. Un comportamiento similar fue descrito por Marinopoulou et al. (2016a) para el ácido oleico, el cual alcanzó un valor máximo de ganancia de masa a 102 °C, seguido de una pérdida de masa por encima de dicha temperatura, lo cual se atribuyó a la oxidación y a la degradación térmica de dicho ácido graso, respectivamente. Adicionalmente, durante un estudio de oxidación de trilinoleína (1,2,3-trilinoileilglicerol) por análisis termogravimétrico, se encontró que la misma alcanzó una ganancia de masa máxima a 126,4 °C (Van Aardt et al. 2004). Este valor es superior a aquel correspondiente al hidrolizado (115 °C), lo que podría atribuirse a distintos motivos. Por un lado, el mayor grado de insaturación del principal ácido graso presente en el hidrolizado ( $\alpha$ -linolénico), lo hace más susceptible a la oxidación en comparación con el ácido linoleico (Van Aardt et al., 2004). A su vez, en la trilinoleína los ácidos grasos se encuentran esterificados a la molécula de glicerol, mientras que, en el hidrolizado, los mismos se encuentran en estado libre, lo que los hace más propensos a la oxidación.

En el caso de los complejos de inclusión, se observó una pérdida de masa al inicio del calentamiento, la cual se podría atribuir a la evaporación de agua residual (Marinopoulou et al., 2016a). A su vez, todos los CI analizados no presentaron una variación de la masa en la región donde el hidrolizado libre se había oxidado, y no se registraron diferencias entre los CI templados durante 2 h a 50, 70 y 90 °C (**Figura 2.11**). Este comportamiento coincide con el de complejos amilosa-ácido oleico y amilosa-ácido linoleico conjugado formados a 30, 50 y 70 °C, los cuales no mostraron aumento de masa durante el calentamiento en el análisis termogravimétrico (Marinopoulou et al., 2016a). Esta estabilidad puede atribuirse a la capacidad de los CI de impedir la accesibilidad del oxígeno (Lalush et al., 2005). Por lo tanto, los resultados encontrados sugieren que todos los complejos de inclusión templados a las distintas temperaturas protegieron a los ácidos grasos de chía contra la oxidación lipídica durante el calentamiento bajo las condiciones

de medida empleadas, indicando que podrían representar potenciales sistemas de vehiculización de ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 en alimentos.

A partir de los resultados encontrados en la parte I del presente Capítulo, podemos decir que la temperatura de templado fue el parámetro que presentó un mayor efecto sobre las propiedades de los CI, principalmente en la temperatura de pico determinada por DSC. Si bien los complejos templados durante 2 h a 50, 70 y 90 °C fueron estables en el análisis termogravimétrico, los templados a 90 °C fueron aquellos que presentaron una mayor  $T_p$ . Por este motivo, podrían ser los que presenten mayor estabilidad cuando se los incorpora a una matriz alimentaria. Así, para la formación de los CI en la Parte II del presente Capítulo, se seleccionó el tratamiento de templado durante 2 h a 90 °C.

**Parte II. Caracterización de complejos de inclusión templados: efecto de la relación aceite hidrolizado de chía/almidón y del tratamiento con ultrasonido**

2.3.10. Rendimiento másico y contenido de ácidos grasos

Para la formación los complejos en la Parte II del presente Capítulo, se utilizó como ligando el aceite de chía hidrolizado con la lipasa de *Cándida rugosa*, cuya extracción de la mezcla de hidrólisis se realizó por acidificación y centrifugación (ver Sección 2.2.5.2). Tal como se mostró en la Sección 2.3.3, dicho hidrolizado presentó una composición acídica similar a la del hidrolizado extraído con solvente. En la **Tabla 2.4.** se presentan los valores de rendimiento másico correspondientes a los complejos de inclusión obtenidos empleando distintas relaciones iniciales de hidrolizado/almidón con y sin la aplicación del tratamiento de ultrasonido.

**Tabla 2.4.** Rendimiento másico de los complejos de inclusión templados (2 h-90 °C), formados usando distintas relaciones hidrolizado/almidón con y sin la aplicación del tratamiento de ultrasonido

Hidrolizado/almidón (% p/p)	Tratamiento de ultrasonido	Rendimiento másico (%) (g CI/g almidón+g hidrolizado)
10	No	62,8 ± 3,1 <sup>ab</sup>
	Sí	65,1 ± 1,3 <sup>a</sup>
20	No	61,5 ± 1,8 <sup>abc</sup>
	Sí	57,4 ± 2,6 <sup>bcd</sup>
30	No	54,9 ± 0,5 <sup>cd</sup>
	Sí	53,7 ± 0,3 <sup>d</sup>

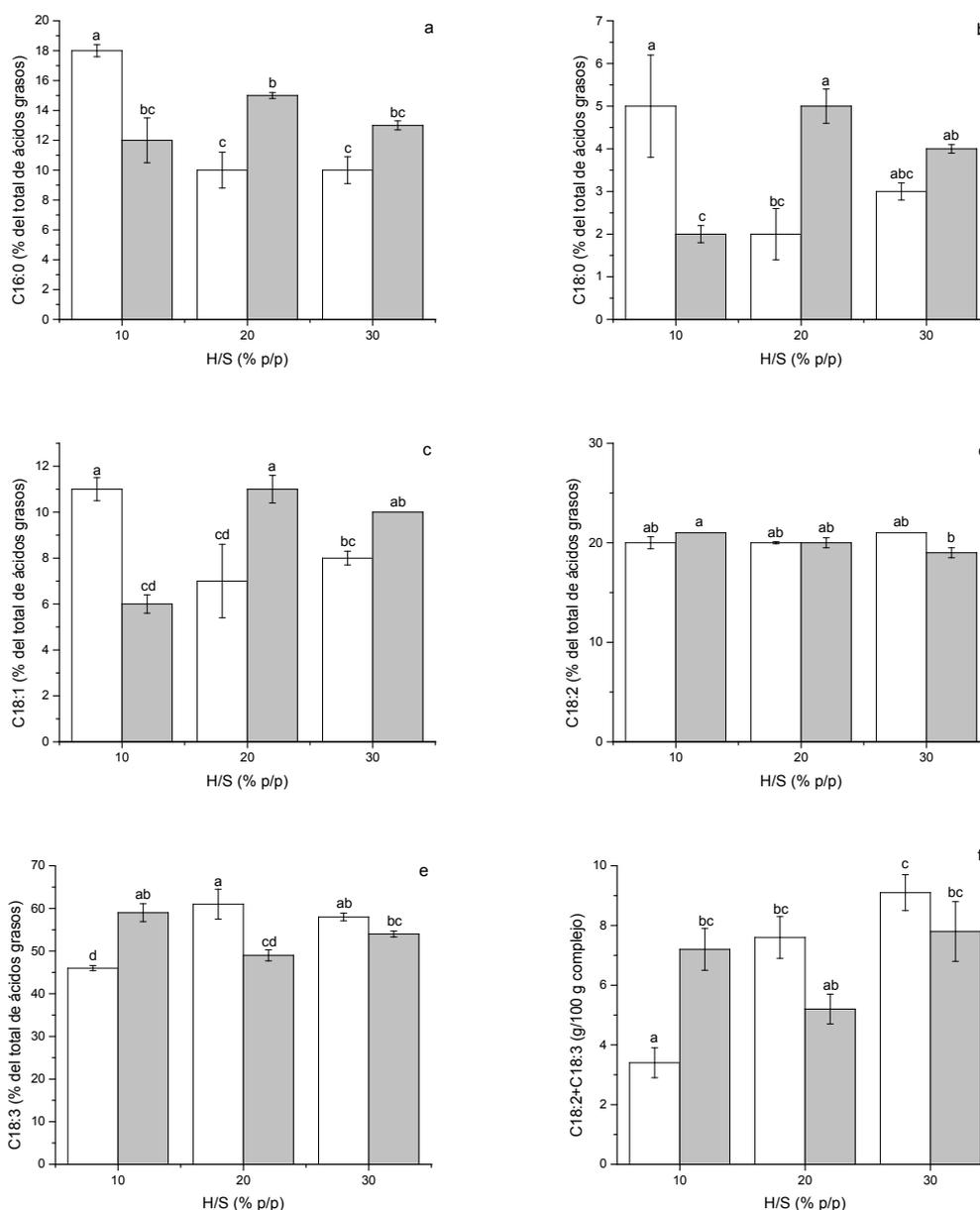
Valores medios ± desviación estándar (n=2) seguidos por distintas letras en cada columna difieren significativamente (p≤0,05) de acuerdo con el test de Tukey. CI: complejo de inclusión

Como puede verse en la **Tabla 2.4**, el rendimiento del proceso de complejación estuvo comprendido en el rango de 53,7-65,1% p/p. Si bien la cantidad inicial de hidrolizado se incrementó desde 10 hasta 30% H/S, no se encontraron diferencias significativas en la masa neta final de los complejos en polvo obtenidos (p>0,05). Esto resultó en un descenso significativo del rendimiento másico (p≤0,05) (calculado de acuerdo a la **Ecuación 2.6**) cuando la relación H/S se incrementó, especialmente desde

10 hasta 30% (**Tabla 2.4**). Además, cuando el hidrolizado se adicionó en una proporción de 20 y 30%, se observó la presencia de ligando no complejado en la forma de gotas en la fase superior de la mezcla de reacción, el cual se removió posteriormente durante la centrifugación y lavado. Estos resultados sugieren que la masa inicial de ligando no fue completamente retenida por los CI cuando la relación H/S fue superior a 10%. Teniendo en cuenta que la amilosa es el componente del almidón que posee la capacidad de complejar moléculas hidrofóbicas y que el almidón usado para la formación de los CI presenta un 77% de amilosa (Sección 2.3.1), las relaciones hidrolizado/almidón de 10, 20 y 30% evaluadas equivalen a una relación de 13, 26 y 39% p/p hidrolizado/amilosa, respectivamente. Por lo tanto, las concentraciones de hidrolizado estudiadas son superiores a la concentración de saturación de amilosa con ácidos grasos, la cual es de ~10% (Karkalas y Raphaelides, 1986; Tang y Copeland, 2007). La adición de lípidos por encima del valor de saturación de amilosa resulta en lípidos libres, no complejados (Raphaelides y Karkalas, 1988), tal como se evidenció a través de la presencia de gotas de ligando en exceso en la mezcla de reacción y a través de la disminución en el rendimiento másico a medida que se aumentó la relación H/S. Adicionalmente, la incorporación del tratamiento de ultrasonido no tuvo efecto significativo sobre el rendimiento másico del proceso de complejación ( $p > 0,05$ ) (**Tabla 2.4**).

En la **Figura 2.12** se muestran los resultados correspondientes al perfil de ácidos grasos de los CI determinado por cromatografía gaseosa. Como puede apreciarse, todos los ácidos grasos que componen el hidrolizado se encontraron presentes en los CI obtenidos bajo las distintas condiciones en estudio, con la predominancia de ácido  $\alpha$ -linolénico (**Figura 2.12**). Sin embargo, en comparación con la composición acídica del hidrolizado inicial, el contenido de  $C_{18:3}$  en los CI fue significativamente inferior, mientras que el porcentaje de  $C_{16:0}$  fue superior ( $p \leq 0,05$ ). Este resultado concuerda con el de Szejtli y Bánky-Elöd (1975), quienes observaron que la fracción de ácidos grasos de aceite de lino hidrolizado mostró un enriquecimiento en ácidos grasos saturados luego de su incorporación en la amilosa. Esta variación en la composición acídica relativa luego de la complejación se podría atribuir a distintos motivos. Por un lado, el grado de insaturación del ácido  $\alpha$ -linolénico y la alta temperatura empleada durante el proceso de formación (90 °C) pudieron haber facilitado su degradación, dando origen a CI con un menor contenido de  $C_{18:3}$  (%), en comparación con el ligando inicial. Por otro lado, los ácidos grasos exhiben distintas capacidades de complejación dependiendo de su estructura molecular (longitud de cadena, grado de insaturación y configuración de los

dobles enlaces). Tal como se mencionó previamente, la curvatura de la cadena alifática originada por los dobles enlaces *cis* C=C en los ácidos insaturados genera una distorsión de la hélice de amilosa (Guo et al., 2021; Zhou et al., 2022), mientras que la cadena más corta y lineal del ácido palmítico pudo haber facilitado su interacción con la amilosa, favoreciendo así su complejación por sobre la de C<sub>18:3</sub> bajo las condiciones de reacción empleadas.



**Figura 2.12.** Contenido (% del total de ácidos grasos) del ácido (a) palmítico, (b) esteárico, (c) oleico, (d) linoleico y (e)  $\alpha$ -linolénico y (f) contenido (g/100g de complejo) de ácidos linoleico +  $\alpha$ -linolénico en complejos formados con 10, 20 y 30% H/S sin (barras blancas) y con (barras grises) la aplicación del tratamiento de ultrasonido. Las distintas letras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ), de acuerdo al test de Tukey

En los complejos no tratados con ultrasonido (T-CI), el incremento de la relación H/S desde 10 hasta 20% generó un aumento significativo en el porcentaje de C<sub>18:3</sub> ( $p \leq 0,05$ ), mientras que no se observó un aumento adicional por encima del 20% H/S (**Figura 2.12e**). El efecto opuesto se encontró en los porcentajes de los ácidos C<sub>16:0</sub>, C<sub>18:0</sub> y C<sub>18:1</sub>, ya que los mismos disminuyeron con el aumento de la relación H/S desde 10 hasta 20% y no se registraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) cuando el contenido de hidrolizado se incrementó desde 20 hasta 30% (**Figura 2.12a-c**). El porcentaje de C<sub>18:2</sub> se mantuvo constante (19-21%) bajo los distintos niveles de adición de ligando (**Figura 2.12d**). Este comportamiento podría deberse, por un lado, a que una parte de la masa inicial de C<sub>18:3</sub> contenida en el hidrolizado pudo haberse perdido durante el templado durante 2 h a 90 °C (tal como se mencionó en el párrafo anterior), mientras que el incremento en la relación H/S desde 10 hasta 20 o 30% pudo haber compensado dicha pérdida, resultando en CI con un mayor porcentaje de C<sub>18:3</sub>. Adicionalmente, en un sistema almidón-lípido-agua, las moléculas lipídicas pueden formar complejos con amilosa, pueden interactuar con el agua, o bien pueden asociarse con otras moléculas lipídicas, formando micelas (Marinopoulou et al., 2016b; Tang y Copeland, 2007). Existe un rango óptimo de concentración para que los ácidos grasos puedan formar complejos con almidón y alcanzar la saturación de la amilosa, el cual varía dependiendo del tipo de molécula y de su solubilidad en agua (Karkalas y Raphaelides, 1986; Tang y Copeland, 2007). La solubilidad de los ácidos grasos depende del pH del medio (Gurr y Harwood, 1991). A niveles de pH altos (~12,7), la amilosa se encuentra expandida, los ácidos grasos están en su forma disociada soluble (Banks y Greenwood, 1971; Marinopoulou, Kalogianni, et al., 2016) y existe un equilibrio entre los ácidos libres y los complejados, el cual depende de su concentración (Marinopoulou, Kalogianni, et al., 2016). En este sentido, Tang y Copeland (2007) mostraron que la complejación de C<sub>18:2</sub>, C<sub>18:1</sub>, C<sub>18:0</sub> y C<sub>16:0</sub> en solución acuosa disminuye por encima de cierta concentración óptima, debido a su baja solubilidad en agua y su consecuente tendencia a auto asociarse, mientras que esto es menos evidente en C<sub>18:3</sub>, debido a la mayor hidrofiliidad de los dobles enlaces C=C en comparación con los enlaces simples saturados. Este fenómeno, podría ser otra posible explicación a la mayor complejación de C<sub>18:3</sub> en comparación con los demás ácidos grasos de chíá con el incremento de la concentración de hidrolizado.

En el caso de los complejos tratados con ultrasonido (UT-CI), aquellos formados con 10% H/S (UT-CI10) presentaron un mayor porcentaje de C<sub>18:3</sub> (**Figura 2.12e**) y un menor porcentaje de C<sub>16:0</sub>, C<sub>18:0</sub> y C<sub>18:1</sub> (**Figura 2.12a-c**) en comparación con aquellos no

tratados (T-CI-10). Esto concuerda con los resultados de Tian et al. (2013), quienes demostraron que la sonicación aumentó el contenido aparente de amilosa, incrementando así la retención de ligando en los complejos. En contraste, cuando se aplicó tratamiento de ultrasonido en los complejos formados con 20 y 30% H/S (UT-CI20 y UT-CI30), se observó el efecto opuesto, ya que originó complejos con un porcentaje significativamente mayor de  $C_{16:0}$ ,  $C_{18:0}$  y  $C_{18:1}$  (**Figura 2.12a-c**) y menor de  $C_{18:3}$  (**Figura 2.12e**), en comparación con los no tratados, lo cual fue más evidente en UT-CI20. Esto indica que el efecto del tratamiento con ultrasonido en la composición ácida de los CI depende de la concentración de hidrolizado inicial. La sonicación pudo romper los agregados de ácidos grasos formados cuando el contenido de ligando fue de 20 y 30%, mejorando la solubilidad de  $C_{16:0}$ ,  $C_{18:0}$  y  $C_{18:1}$ , favoreciendo así su interacción con la amilosa. Esto, a su vez, concuerda con estudios previos en los que se demostró que este tratamiento mejoró la formación de complejos a través del aumento de la solubilidad de los ácidos grasos (Kang et al., 2020; Raza et al., 2021; Zhang et al., 2022). Sin embargo, se requieren otros estudios, tales como DRX y DSC, para poder dilucidar si las variaciones observadas en el perfil de ácidos grasos de los CI causadas por las variables en estudio se deben a una mayor retención de ligando en las hélices de amilosa y/o a un atrapamiento físico en la matriz de almidón.

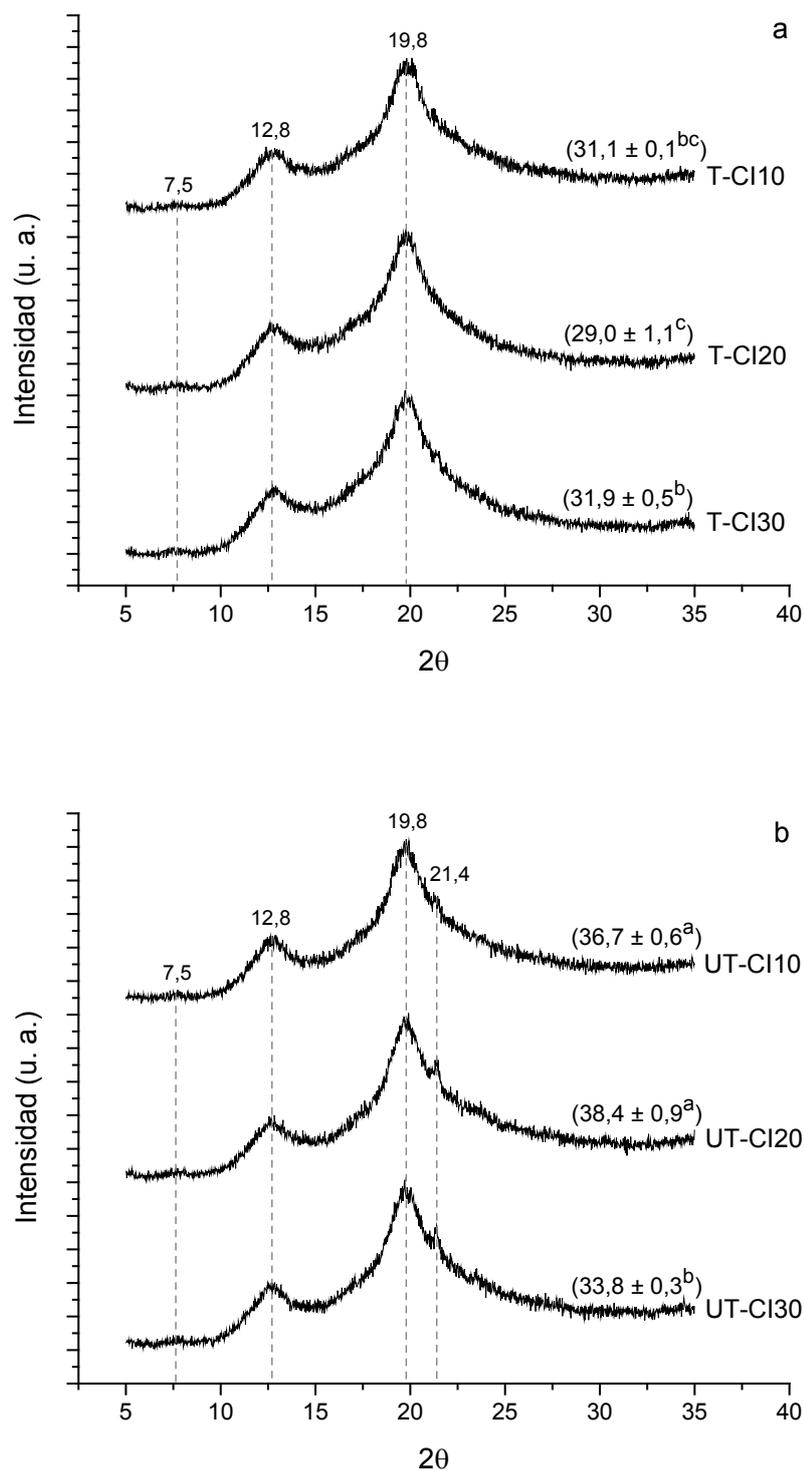
Además del perfil relativo de ácidos grasos discutido anteriormente, se determinó el contenido de  $C_{18:2} + C_{18:3}$ , debido a la potencial aplicación de los complejos como sistemas de vehiculización de ambos ácidos grasos esenciales. En aquellas muestras no tratadas, el aumento de la relación H/S desde 10 hasta 20% incrementó significativamente el contenido de  $C_{18:2} + C_{18:3}$  desde 3 hasta 7% ( $p \leq 0,05$ ), mientras que no hubo un incremento adicional incorporando un 30% de hidrolizado (**Figura 2.12f**). Este comportamiento concuerda con aquel observado en el porcentaje de  $C_{18:3}$ , el cual se discutió anteriormente (**Figura 2.12e**). Tal como se observó previamente en la distribución ácida porcentual, el efecto de ultrasonido en el contenido de  $C_{18:2} + C_{18:3}$  dependió de la relación H/S, debido a una interacción entre factores (ultrasonido x H/S). El tratamiento con ultrasonido sólo tuvo efecto significativo cuando la relación H/S fue de 10%, generando un aumento en el contenido de  $C_{18:2} + C_{18:3}$  que permitió alcanzar un valor tan alto como aquel encontrado en T-CI20 y T-CI30 (**Figura 2.12f**). De acuerdo con estos resultados, la complejación de  $C_{18:3}$  y  $C_{18:2}$  provenientes de una mezcla de ácidos grasos (aceite de chía hidrolizado) se pudo favorecer a través del aumento del contenido inicial de ligando o, en aquellos complejos formados con 10% H/S, a través de

la aplicación de tratamiento con ultrasonido, alcanzándose el mayor contenido de  $C_{18:2} + C_{18:3}$  en las muestras UT-CI10, T-CI20, T-CI30 y UT-CI30.

### 2.3.11. Difracción de rayos X (DRX)

En la **Figura 2.13** se muestran los resultados de la caracterización de la estructura cristalina de los complejos de inclusión a través de difracción de rayos-X. Como puede apreciarse, todos los difractogramas presentaron dos reflexiones principales a  $\sim 12,8$  y  $19,8^\circ$  ( $2\theta$ ) y una muy pequeña a  $\sim 7,5^\circ$ , indicando la efectiva formación de una estructura tipo V-amilosa hidratada ( $V_{6h}$ ) (Zobel, 1988b). Esto indica que bajo todas las condiciones estudiadas (distintas relaciones H/S, con y sin la aplicación de ultrasonido) se logró la complejación de los ácidos grasos de chíá. Asimismo, en todos los complejos se observó una estructura semicristalina (grado de cristalinidad 29-38%), con un halo subyacente debido a la contribución de regiones amorfas (**Figura 2.13**). Este valor es similar a la cristalinidad de complejos amilosa-ácidos grasos formados por el método alcalino (Marinopoulou et al., 2016b; Marinopoulou, Papastergiadis y Raphaelides, 2016).

El efecto del tratamiento con ultrasonido sobre la cristalinidad de los complejos dependió de la relación H/S, debido a una interacción entre los factores. Aquellos complejos tratados con ultrasonido presentaron una cristalinidad mayor que la de los no tratados, especialmente el UT-CI10 y UT-CI20. Liu et al. (2018) y Zhang et al. (2022) mostraron que el ultrasonido favorece la formación de CI con ácido láurico y con monolaurato de glicerol, respectivamente, lo que resultó en un aumento del grado de cristalinidad. El ultrasonido promueve la formación de complejos a través de dos mecanismos. Por un lado, el efecto de cavitación durante la sonicación rompe los gránulos de almidón y produce una despolimerización parcial de la amilosa al romper los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,6 (puntos de ramificación de la amilopectina), aumentando la cantidad de cadenas lineales y el contenido aparente de amilosa del almidón de maíz (Chan et al., 2010; Kang et al., 2016; Tian et al., 2013). Por otro lado, las ondas de choque de la sonda ultrasónica mejoran la dispersabilidad del ligando en la solución de almidón (Kang et al., 2020; Raza et al., 2021; Zhang et al., 2022). Estos dos factores aumentan la probabilidad de contacto entre el ligando y la amilosa, favoreciendo así la formación de complejos de inclusión (Kang et al., 2020; Liu et al., 2018; Tian et al., 2013; Zhang et al., 2022).



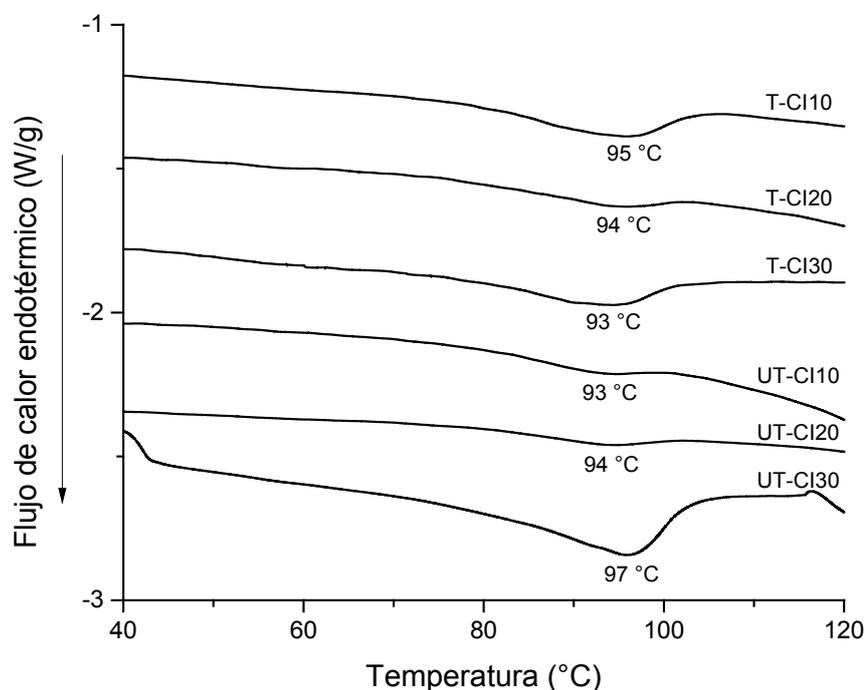
**Figura 2.13.** Patrones de difracción de rayos X de complejos de inclusión (a) no tratados y (b) tratados con ultrasonido, formados con 10, 20 y 30% (p/p) hidrolizado/almidón. Los valores entre paréntesis indican el grado de cristalinidad (%). Las distintas letras superíndices indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ), de acuerdo al test de Tukey

Otro aspecto importante a analizar es que los espectros de los complejos tratados con ultrasonido mostraron un pico adicional a  $\sim 21,4^\circ$ , el cual fue más evidente en las muestras UT-CI20 y UT-CI30 (**Figura 2.13b**). Esto sugiere la presencia de ácidos grasos saturados cristalizados, que pueden estar atrapados físicamente y no incluidos molecularmente (Cao et al., 2015; Marinopoulou, Papastergiadis, et al., 2019; Marinopoulou, Papastergiadis, Raphaelides, et al., 2016b; Zabar et al., 2009; Zhou et al., 2022). Cabe mencionar que el hidrolizado usado como ligando contiene ácidos saturados (esteárico y palmítico) en su composición (Sección 2.3.3). El proceso de lavado con etanol/agua durante la formación de los CI pudo no haber eliminado por completo dichos ácidos grasos saturados no complejados (Lesmes et al., 2009; Marinopoulou et al., 2016b; Zhou et al., 2022). De acuerdo con estos resultados, el mayor porcentaje de SFA observado previamente en UT-CI20 y UT-CI30 (ver Sección 2.3.10) podría atribuirse tanto a una mayor cantidad de ácidos esteárico y palmítico complejados, como así también en estado no complejado y atrapados físicamente en la matriz de almidón. En las muestras no tratadas con ultrasonido T-CI20 y T-CI30, las cuales habían presentado un menor porcentaje de SFA que aquellas tratadas (ver Sección 2.3.10), el pico extra a  $21,4^\circ$  no se observó o fue casi despreciable (**Figura 2.13**). Lo mismo ocurrió en el UT-CI10, en el que la relación H/S pudo no haber sido lo suficientemente alta como para promover la recristalización de los ácidos saturados (**Figura 2.13**). Adicionalmente, no fue posible detectar por DRX la presencia de cristales de  $C_{18:3}$ ,  $C_{18:2}$  y  $C_{18:1}$  no complejados, ya que éstos se encuentran en estado fundido a temperatura ambiente.

### 2.3.12. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En la **Figura 2.14** se muestran los resultados del análisis de calorimetría diferencial de barrido de los complejos de inclusión. Como puede apreciarse, todas las muestras mostraron una única endoterma amplia con una temperatura de pico ( $T_p$ ) comprendida entre  $93$  y  $97^\circ\text{C}$  y una entalpía de  $7\text{ J/g}$  (b. s.), originada por la disociación amilosa-lípido (Karkalas et al., 1995; Zhou et al., 2022). Este resultado confirma la efectiva complejación de los ácidos grasos de chía bajo todas las condiciones operativas en estudio, en concordancia con los resultados de DRX mostrados en la sección anterior. Tal como se discutió en la Parte I del presente Capítulo (Sección 2.3.6), teniendo en cuenta que el hidrolizado de aceite de chía empleado como ligando consiste en una mezcla de ácidos grasos, las endotermas amplias observadas podrían deberse de la superposición

de varias endotermas individuales originadas por la disociación de complejos formados con los distintos ácidos grasos que componen el hidrolizado.



**Figura 2.14.** Termogramas de DSC de complejos no tratados con ultrasonido formados con 10 (T-CI10), 20 (T-CI20) y 30% H/S (T-CI30) y complejos tratados con ultrasonido formados con 10 (UT-CI10), 20 (UT-CI20) y 30% H/S (UT-CI30). H: hidrolizado, S: almidón. Se indica la temperatura de pico ( $T_p$ )

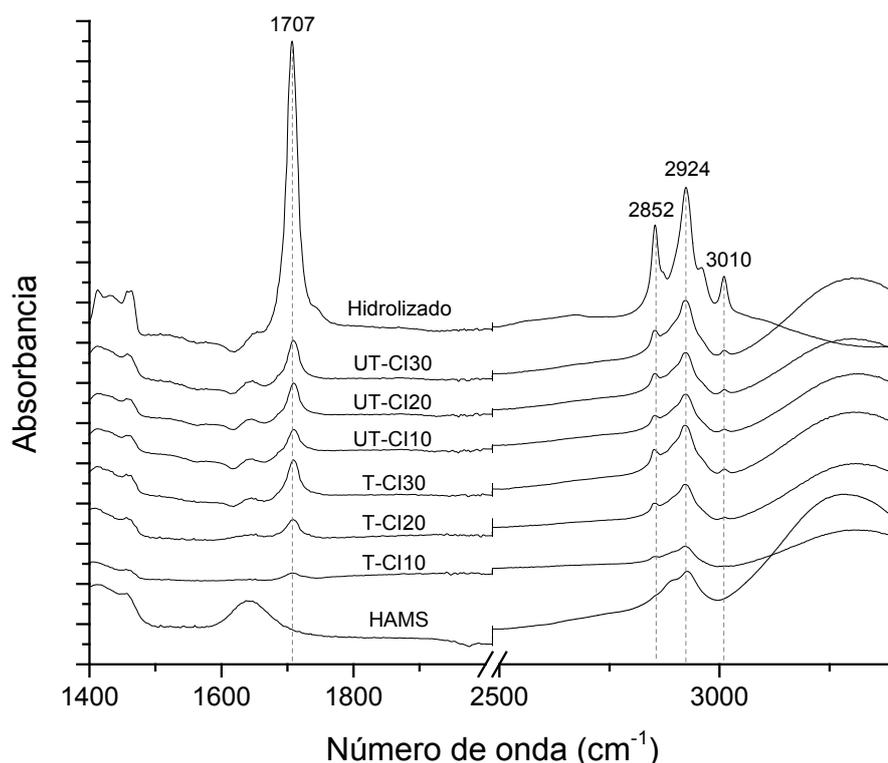
Dado que la  $T_p$  de todos los CI fue menor a 105 °C, las endotermas corresponderían a polimorfos tipo I (Kong et al., 2019; Putseys et al., 2010; Seo et al., 2015; Sun et al., 2021; Zhou et al., 2022). El comportamiento térmico de los complejos amilosa-ácido graso depende tanto de las condiciones de reacción como también del tipo de ácido graso (Karkalas et al., 1995; Seo et al., 2015; Sun et al., 2021; Zhou et al., 2022). Sin embargo, a pesar de las diferencias encontradas previamente en la composición acídica de los CI, no hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en la  $T_p$  ni en la entalpía de las muestras en estudio, indicando que sus propiedades térmicas no se modificaron con la variación de concentración inicial de ligando, ni con la incorporación de una etapa de tratamiento ultrasónico durante el proceso de formación.

Si bien en los espectros de rayos X de los complejos tratados con ultrasonido se había detectado la presencia de cristales de ácidos palmítico y esteárico no complejados

(ver Sección 2.3.11), en los termogramas no se observó la presencia de una endoterma originada por la fusión de dichos cristales (**Figura 2.14**), cuya  $T_p$  se encontraría a aproximadamente 61 y 68 °C, respectivamente (Sun et al., 2021). El bajo porcentaje (<18%) de dichos ácidos grasos en los complejos pudo haber dificultado su detección por DSC, en comparación con otros trabajos en los cuales se emplearon ácidos grasos saturados puros como ligando (Sun et al., 2021; Zhou et al., 2022). Asimismo, no fue posible detectar la presencia de  $C_{18:3}$ ,  $C_{18:2}$  y/o  $C_{18:1}$  no complejados, dado que su temperatura de fusión es inferior al rango de temperatura de medida usado en el análisis de DSC.

### 2.3.13. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)

En la **Figura 2.15** se presentan los espectros de ATR-FTIR correspondientes a las muestras en estudio. En el aceite de chía hidrolizado con la enzima lipasa de *Candida rugosa* y extraído por acidificación, se detectó una banda de alta intensidad a  $\sim 1707\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a la vibración de estiramiento del carbonilo ( $-C=O$ ) del grupo funcional ácido de los ácidos grasos libres (Guillen y Cabo, 1997). Esta muestra también mostró bandas en 2852 y 2924  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponden a la vibración simétrica y asimétrica de los grupos  $\text{CH}_2$  de las cadenas alquílicas de ácidos grasos, respectivamente, y una banda de intensidad media alrededor de 3010  $\text{cm}^{-1}$  (**Figura 2.15**) que se originó a partir de la vibración  $=C-H$  de los dobles enlaces *cis* de los ácidos insaturados (Guillen y Cabo, 1997). De acuerdo con estos resultados, el hidrolizado extraído por acidificación presentó un espectro similar a aquel extraído con solvente, el cual había sido utilizado como ligando en la Parte I del presente Capítulo. Este resultado es esperable, dado que ambos hidrolizados presentaron una composición ácida similar (Sección 2.3.3).



**Figura 2.15.** Espectros de ATR-FTIR del hidrolizado de aceite de chía, de complejos de inclusión no tratados con ultrasonido formados con 10% (T-CI10), 20% (T-CI20) y 30% (T-CI30) H/S, complejos tratados con ultrasonido formados con 10% (UT-CI10), 20% (UT-CI20) y 30% (UT-CI30) H/S y del almidón de maíz de alta amilosa nativo (HAMS)

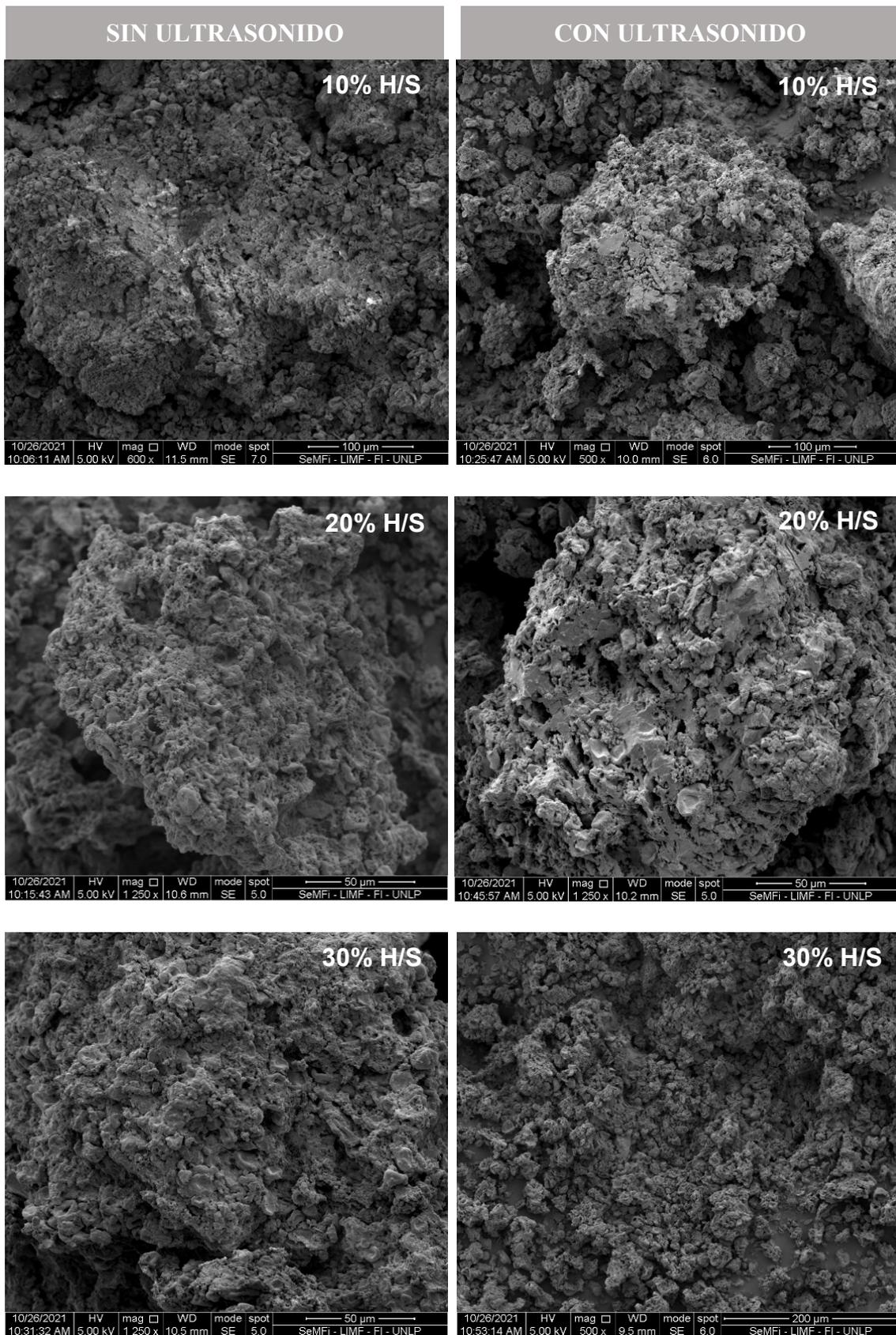
Estas bandas típicas del hidrolizado se pueden observar en los espectros de los CI (**Figura 2.15**), lo que indica la presencia de ácidos grasos retenidos en los complejos (Cao et al., 2015; Fanta et al., 1999). Las mismas, pueden atribuirse a ácidos grasos que podrían encontrarse retenidos en la cavidad helicoidal de amilosa y/o atrapados físicamente en los espacios intersticiales entre las hélices (Guo et al., 2018; Zhou et al., 2022), como se observó previamente en los espectros de DRX. Otro aspecto importante a analizar en los espectros de los CI es la intensidad de las bandas, la cual aumentó a medida que se incrementó el H/S (%) y luego de la aplicación del tratamiento ultrasónico (**Figura 2.15**). Este comportamiento indica un aumento en el contenido de ligando en los CI (Cervantes-Ramírez et al., 2020). Particularmente, la banda a  $3010\text{ cm}^{-1}$  de los dobles enlaces *cis* no se detectó en el complejo formado con 10% H/S sin la aplicación de ultrasonido (T-CI10), tal como se había observado en la Sección 2.3.7. Sin embargo, dicha banda aparece cuando al complejo formado con 10% H/S se le aplica ultrasonido (UT-CI10), y su

intensidad aumentó cuando el contenido de H/S se incrementó hasta 20 y 30%. Esto indica un mayor contenido de ácidos grasos insaturados en los CI como consecuencia de la aplicación del tratamiento ultrasónico y del aumento de la concentración inicial de hidrolizado, lo que coincide con la tendencia observada previamente en el perfil de ácidos grasos de los complejos (ver Sección 2.3.10).

### 2.3.14. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las características morfológicas de los complejos se estudiaron mediante SEM. En la **Figura 2.16** se muestran las micrografías de los complejos en polvo obtenidos luego de la liofilización y molienda.

Como puede apreciarse, todas las imágenes revelaron un sistema particulado, formado por agregados irregulares con tamaños variables (<1 mm) y una superficie porosa, en concordancia con las micrografías de complejos de amilosa-ácido graso formados por el método alcalino y liofilizados (Zabar et al., 2010). Adicionalmente, no se observaron diferencias estructurales entre los complejos formados bajo las distintas condiciones operativas evaluadas (**Figura 2.16**), lo que indica que el nivel de hidrolizado/almidón y la aplicación de ultrasonido no modificaron las propiedades morfológicas de los complejos a nivel microscópico.

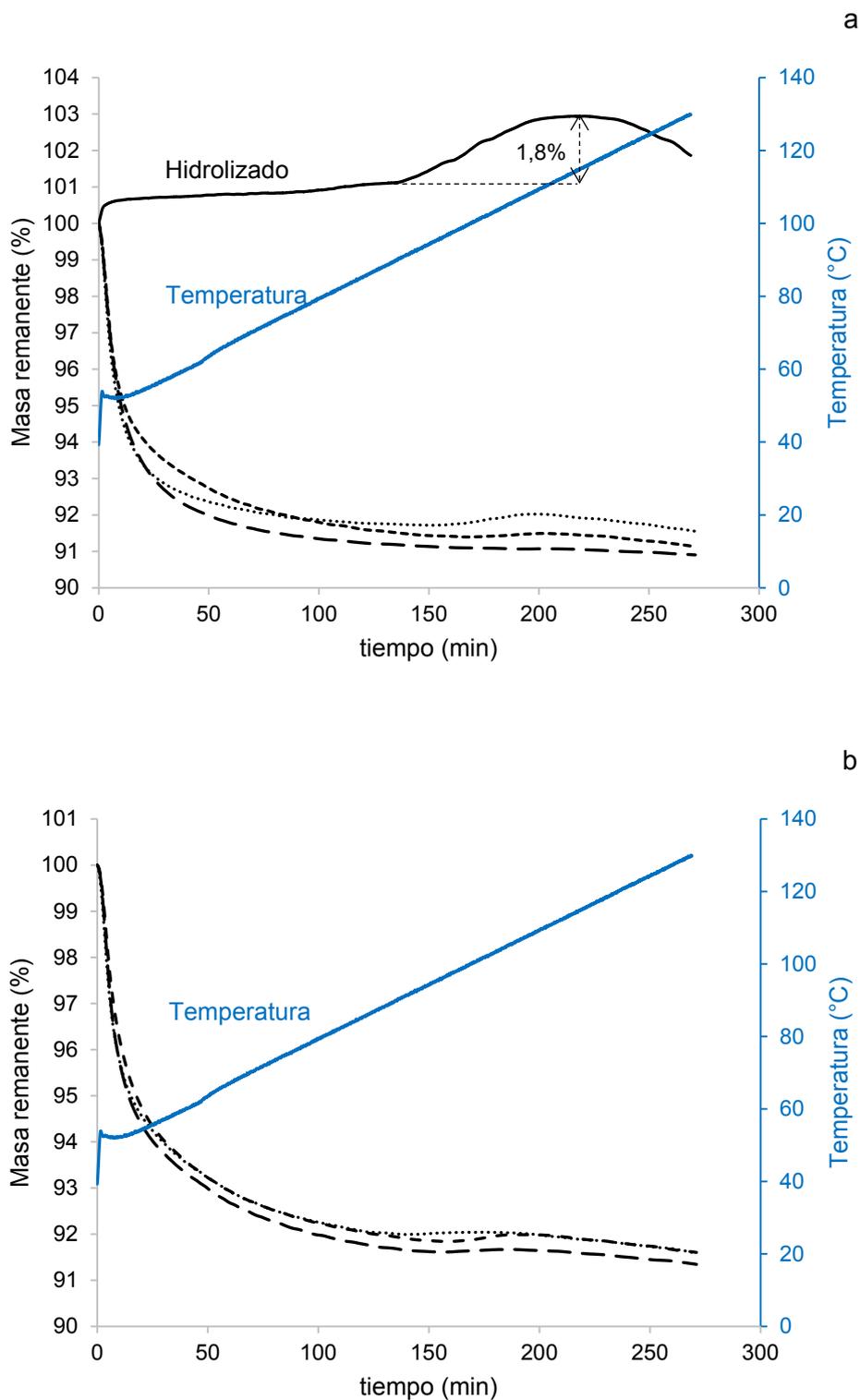


**Figura 2.16.** Micrografías de barrido electrónico de complejos de inclusión formados con una relación inicial de 10, 20 y 30% p/p hidrolizado/almidón (H/S), sin (izquierda) y con (derecha) la aplicación de tratamiento de ultrasonido

En un trabajo previo, se demostró que la sonicación de complejos almidón-ácido linoleico durante 30 min induce la formación de fisuras y de una superficie porosa no uniforme debido a los efectos de cizallamiento, cavitación y temperatura y presión elevadas (Raza et al., 2021). Sin embargo, el menor tiempo empleado en el presente Capítulo durante el proceso de sonicación (1 min) pudo no haber sido suficiente como para producir cambios morfológicos en los complejos tratados con ultrasonido, en comparación con los no tratados. Asimismo, si bien en los espectros de DRX de los complejos sonicados se detectó la presencia de cristales de ácidos grasos saturados no complejados, dichos cristales no se observaron en las micrografías de barrido electrónico de los complejos. Por lo tanto, éstos podrían estar atrapados físicamente en la matriz de almidón.

### 2.3.15. Análisis termogravimétrico (TGA)

La estabilidad oxidativa acelerada de los complejos de inclusión y del hidrolizado se evaluó a través del análisis termogravimétrico. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 2.17**. Como puede observarse, el hidrolizado libre (no complejado) extraído por acidificación y centrifugación mostró una ganancia de masa (1,8%) en el rango de temperatura comprendido entre ~90 y 115 °C (**Figura 2.17a**), la cual puede atribuirse a la unión del oxígeno a los dobles enlaces que se produce durante la oxidación de los PUFAs, dando como resultado la formación de peróxidos (Marinopoulou, Papastergiadis, y Raphaelides, 2016). Además, se detectó una pérdida de masa por encima de 115 °C, lo que puede deberse a la degradación térmica de los ácidos grasos oxidados (Marinopoulou et al., 2016a). Este comportamiento, coincide con aquel observado previamente en el hidrolizado de aceite de chía extraído con solvente (Sección 2.3.9), lo cual es esperable, dado que ambos hidrolizados presentaron una composición acídica similar (Sección 2.3.3).



**Figura 2.17.** Estabilidad oxidativa por análisis termogravimétrico de (a) hidrolizado de aceite de chía y complejos de inclusión no tratados con ultrasonido y (b) complejos tratados con ultrasonido formados con una relación hidrolizado/almidón de 10% (—), 20% (- - -) y 30% (···) p/p

Todos los CI mostraron una pérdida de masa (~8%) inmediatamente al inicio del calentamiento (**Figura 2.17a, b**), atribuida a la evaporación de la humedad residual. Tal como se observó previamente en la parte I del presente Capítulo, la muestra T-CI10 no mostró un aumento de masa, lo que demuestra su potencial para proteger eficazmente los ácidos grasos de aceite de semilla de chía frente al deterioro oxidativo bajo las condiciones de medida empleadas. La interacción amilosa-ácido graso pudo haber impedido la oxidación lipídica a través de la limitación de la accesibilidad del oxígeno (Yang et al., 2009). Contrariamente, tanto los CI sin tratar formados con una relación H/S >10%, como así también todos aquellos tratados con ultrasonido mostraron una captación de oxígeno (ganancia de masa ~0,05-0,30%) en el mismo rango de temperatura en el que se oxidó el hidrolizado libre (**Figura 2.17a, b**). Dado que en la Sección 2.3.10 se vio que estos CI presentaron un mayor contenido de PUFAs, a partir de los resultados obtenidos por TGA, se deduce que éstos ácidos grasos podrían estar atrapados físicamente en los espacios inter-hélice y no incluidos molecularmente. Esto podría dar como resultado una interacción más débil con la amilosa, facilitando así la accesibilidad del oxígeno y disminuyendo la capacidad de los complejos de protección contra el deterioro oxidativo. Adicionalmente, en los UT-IC, el efecto de cavitación de la sonicación pudo haber iniciado el proceso de oxidación, ya que se sabe que provoca la oxidación de lípidos a través de tres mecanismos. El primero, se debe a las elevadas temperaturas originadas por la cavitación, el segundo se debe a las fuerzas de cizallamiento originadas por las ondas de choque, mientras que el tercero se debe a los radicales libres generados por la sonólisis (Chemat et al., 2004). A partir de estos resultados podemos decir que sólo los complejos formados con 10% H/S sin la aplicación de ultrasonido fueron aquellos que protegieron a los ácidos grasos de chía frente a la oxidación bajo las condiciones de medida empleadas en el TGA. Sin embargo, los resultados de este análisis acelerado deberían complementarse con otras metodologías que permitan medir la estabilidad de los complejos, para así poder dilucidar el mecanismo de protección de los mismos y evaluar su aplicación potencial como sistemas de vehiculización de ácidos grasos esenciales.

## 2.4. Conclusiones parciales

- La enzima de *Candida rugosa* presentó una mayor efectividad que la lipasa pancreática porcina durante la hidrólisis del aceite de chía. El hidrolizado extraído de la mezcla de reacción usando solvente presentó una composición ácida similar a aquel extraído por acidificación, por lo que ambos pudieron emplearse como un ligando rico en ácidos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 de chía durante el proceso de complejación.
- Se logró formar satisfactoriamente complejos de inclusión entre el almidón de maíz de alta amilosa con los ácidos grasos libres de chía a través del método alcalino con la aplicación de templado durante 2 y 6 h a 50, 70 y 90 °C. Estos complejos presentaron un patrón típico de V-amilosa, un alto contenido de ácidos  $\alpha$ -linolénico + linoleico y una elevada estabilidad térmica ( $T_p \geq 85$  °C).
- La temperatura de templado fue el parámetro que tuvo mayor efecto sobre las propiedades fisicoquímicas de los CI, especialmente sobre la temperatura de disociación, observándose un incremento en dicho parámetro con el aumento de la temperatura. Por el contrario, el aumento del tiempo de templado desde 2 hasta 6 h no tuvo efecto sobre las propiedades fisicoquímicas de los complejos estudiadas.
- Todos los complejos de inclusión formados con una relación hidrolizado/almidón de 10% y templados durante 2 h a 50, 70 y 90 °C protegieron a los ácidos grasos de chía frente al deterioro oxidativo acelerado, bajo las condiciones de medida empleadas en el análisis termogravimétrico.
- El templado durante 2 h a 90 °C fue el que promovió en menos tiempo la formación de CI estables frente al deterioro oxidativo y con mayor temperatura de disociación ( $T_p \sim 95$  °C).
- En los complejos templados durante 2 h a 90 °C, la variación de la relación hidrolizado/almidón inicial y la aplicación de ultrasonido no tuvieron efecto sobre sus propiedades morfológicas y térmicas.

- El aumento de la concentración inicial de ligando por encima de 10% promovió la formación de complejos con un mayor contenido de PUFAs de chía (principalmente ácido  $\alpha$ -linolénico) y, además, disminuyó el rendimiento másico del proceso de complejación.
- La aplicación de ultrasonido favoreció la complejación de los ácidos grasos de chía y promovió el atrapamiento de cristales de ácidos grasos saturados no complejados. En los complejos formados con 10% H/S, dicho tratamiento aumentó el contenido de C<sub>18:3</sub> a expensas de los ácidos saturados, mientras que en los CI formados con 20% H/S se observó el efecto opuesto. La sonicación no tuvo efecto sobre la composición acídica de los complejos formados con 30% H/S.
- Sólo el T-CI10 protegió a los ácidos grasos de chía contra la oxidación acelerada. Por lo tanto, el aumento de la relación H/S y la aplicación de ultrasonido podrían promover la presencia de una mayor cantidad de PUFAs atrapados en la matriz de almidón y no incluidos molecularmente, quedando así más fácilmente accesibles al oxígeno y disminuyendo la capacidad de los CI de proteger a los ácidos grasos de chía frente a la oxidación lipídica.
- El efecto de cavitación del ultrasonido también pudo haber favorecido la oxidación de los PUFAs de chía. Además, la incorporación de dicho tratamiento debe ser evaluada en mayor profundidad, ya que esta técnica es un paso adicional, que representa un mayor consumo de tiempo y energía en el proceso de complejación.

### 2.5. Difusión de resultados

#### Publicaciones en Revistas Científicas

- Di Marco, Andrea E.; Ixtaina, Vanesa Y.; Tomás, Mabel C. (2020). Inclusion complexes of high amylose corn starch with essential fatty acids from chia seed oil as potential delivery systems in food. *Food Hydrocolloids*, 108, 106030.

- Di Marco, A. E., Ixtaina, V. Y., & Tomás, M. C. (2022). Analytical and technological aspects of amylose inclusion complexes for potential applications in functional foods. *Food Bioscience*, 101625.
- Di Marco, A. E., Ixtaina, V. Y., & Tomás, M. C. (2022). Molecular Encapsulation of Hydrolyzed Chia Seed Oil by Ultrasonically Treated Amylose Inclusion Complexes. *Biology and Life Sciences Forum*. 17(1), p. 24. MDPI.
- Di Marco, A. E., Ixtaina, V. Y., & Tomás, M. C. (2023). Effect of ligand concentration and ultrasonic treatment on inclusion complexes of high amylose corn starch with chia seed oil fatty acids. *Food Hydrocolloids*, 136, 108222.

### Presentaciones en Congresos y reuniones científicas

- Di Marco Andrea, Ixtaina Vanesa, Tomás Mabel. Microencapsulación de ácidos grasos esenciales del aceite de chía mediante complejación por inclusión. CyTAL®-ALACCTA 2019: XXI Congreso Latinoamericano y del Caribe de Ciencia y Tecnología de Alimentos. XVII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Lugar: Buenos Aires; Año: 2019.
- Di Marco, Andrea E.; Ixtaina, Vanesa Y.; Tomás, Mabel C. (2020). Oxidative stability of chia seed oil essential fatty acids encapsulated by amylose-inclusion complexation. Virtual 2020 AOCS Annual Meeting & Expo. Lugar: Montreal. Año: 2020.
- Di Marco, Andrea E.; Ixtaina, Vanesa Y.; Tomás, Mabel C. Molecular Encapsulation of Hydrolyzed Chia Seed Oil by Ultrasonically Treated Amylose Inclusion Complexes. IV Conference Ia ValSe-Food CYTED and VII Symposium Chia-Link. Lugar: La Plata-San Salvador de Jujuy; Año: 2022.
- Di Marco, Andrea E.; Ixtaina Vanesa Y.; Tomás, Mabel C. Complejos de inclusión con amilosa como vehículos de ácidos grasos omega-3 de chía: efecto de la concentración de ligando. XVIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CyTAL® 2023). Lugar: Buenos Aires – Argentina. 4-6 de octubre de 2023.

## CAPITULO 3

# **Complejos de inclusión amilosa-ácidos grasos de aceite de chía formados sin templado**

---

**Capítulo 3. Complejos de inclusión amilosa-ácidos grasos de aceite de chía formados sin templado****3.1. Introducción**

El desarrollo de alimentos funcionales a través de la incorporación de compuestos bioactivos ha promovido la investigación relacionada con los sistemas de vehiculización. Sin embargo, el estudio de dichos sistemas requiere la evaluación de distintas propiedades funcionales, incluyendo la compatibilidad con la matriz alimentaria a ser incorporados, la estabilidad, la resistencia a las condiciones estomacales y la liberación dirigida y controlada del compuesto bioactivo en el intestino (McClements et al., 2008, 2009). Dichas propiedades funcionales, a su vez, están estrechamente relacionadas con la estructura de los sistemas de vehiculización (Lesmes y McClements, 2009). En el caso de los complejos de inclusión con amilosa, sus propiedades estructurales dependen de diversos factores que se pueden clasificar en dos grupos principales (Rostamabadi et al., 2019a): las características de los materiales empleados en la complejación (almidón y ligando) y las condiciones de reacción (pH, T, t, método de obtención, aplicación de métodos físicos, etc.). En este sentido, con el objetivo de conocer el efecto de las condiciones de reacción sobre las propiedades fisicoquímicas de los complejos de inclusión amilosa-ácidos grasos de chía, en el Capítulo 2, Parte I se estudió el efecto del tiempo (2 y 6 h) y de la temperatura (50, 70 y 90 °C) de templado. Los resultados encontrados mostraron que todos los complejos templados durante 2 h bajo las distintas temperaturas presentaron estabilidad oxidativa en el análisis termogravimétrico. Asimismo, el tratamiento durante 2 h a 90 °C fue aquel que promovió la formación de complejos con mayor temperatura de disociación (95 °C), lo que sugirió que dichos complejos serían los que presentan mayor estabilidad térmica. A partir de estos resultados, se seleccionó la etapa de templado de 2 h-90 °C para la formación de los CI en el Capítulo 2, Parte II, en el cual se analizó el efecto de la relación másica hidrolizado/almidón (H/S) inicial y de la aplicación del tratamiento de ultrasonido sobre las propiedades de los CI amilosa-ácidos grasos de chía. En dicho Capítulo, se había encontrado que el aumento en la relación H/S desde 10 hasta 30% generó una disminución en el rendimiento másico del proceso de complejación debido a la adición de ligando en exceso. Adicionalmente, el agregado de cantidades crecientes de ligando y la incorporación del tratamiento de ultrasonido aumentaron el contenido de ácidos grasos

poliinsaturados (principalmente ácido  $\alpha$ -linolénico) en los complejos. Sin embargo, esto fue acompañado por una disminución en la estabilidad oxidativa en el análisis termogravimétrico, siendo sólo el CI formado con 10% H/S sin la aplicación de ultrasonido aquel que mostró resistencia a la oxidación. Este comportamiento se había atribuido al aumento en la concentración de PUFAs en los CI, el cual pudo haber estado acompañado por una mayor proporción de PUFAs retenidos en los espacios inter-hélice y no incluidos molecularmente, interactuando más débilmente con la amilosa, facilitando así la accesibilidad del oxígeno.

Otro factor que también pudo haber influido en la estabilidad de los CI en estudio es el método de obtención empleado. Si bien el método alcalino ha sido ampliamente utilizado para la complejación de ácidos grasos a escala laboratorio (Lalush et al., 2005; Marinopoulou et al., 2016a, 2016b), el mismo incluye el empleo de altas temperaturas y largos períodos de tiempo (Guo et al., 2021), los cuales podrían provocar el deterioro del ligando. En este sentido, ha habido diversas investigaciones orientadas al desarrollo de técnicas de complejación de compuestos bioactivos susceptibles. Entre ellas, podemos mencionar el uso de la homogeneización a altas presiones, el método de amilosa-V preformada y las altas presiones hidrostáticas para la complejación de ácidos grasos poliinsaturados (Guo et al., 2021), de ascorbil palmitato y mentol (Guo y Kong, 2022; Kong y Ziegler, 2014; Shi et al., 2019) y de ácidos linoleico y  $\alpha$ -linolénico (Le-Bail et al., 2015), respectivamente. El rasgo distintivo de estos métodos reside en que no requieren el empleo tratamiento térmico, por lo que se minimiza la degradación de compuestos termolábiles (Guo et al., 2018; Kong y Ziegler, 2014). En el caso del ligando empleado en el presente trabajo de Tesis (aceite de chía hidrolizado), el mismo está formado mayoritariamente por ácidos grasos poliinsaturados (>80%), principalmente ácido  $\alpha$ -linolénico (~65%) y linoleico (~20%). Su alto grado de insaturación los hace altamente susceptibles a condiciones tales como altas temperaturas, luz y oxígeno. En este contexto, resulta oportuno el estudio de la complejación del aceite de chía hidrolizado empleando condiciones más suaves de reacción a través de la omisión de la etapa de templado a altas temperaturas, con el fin de proteger aquellos ácidos grasos de mayor interés por sus propiedades beneficiosas en la salud ( $\alpha$ -linolénico y linoleico).

Un aspecto relevante a profundizar se relaciona con el estudio de la estabilidad oxidativa de los complejos de inclusión. La oxidación es uno de los principales procesos que afecta la calidad de las grasas y aceites comestibles, en especial aquellos ricos en PUFAs. Así, el estudio de dicho proceso resulta fundamental para poder optimizar las

condiciones de procesamiento y almacenamiento (Bañares et al., 2019), pero también para poder evaluar la eficacia de los sistemas de vehiculización como métodos de protección de compuestos bioactivos, como los ácidos grasos esenciales poliinsaturados provenientes de la hidrólisis del aceite de chía. Sin embargo, el abordaje de la oxidación y estabilidad requiere el empleo de distintas técnicas analíticas complementarias (Frankel, 2005). Existen diversas metodologías estandarizadas desarrolladas para la medición de la calidad y estabilidad oxidativa de las grasas y aceites a granel, como las especificadas en las normas oficiales de la AOCS (AOCS, 2024). En el caso de los CI, por el contrario, el estudio de su estabilidad se ha abordado empleando diversas técnicas analíticas no unificadas (Di Marco et al., 2022). Esto dificulta la comparación de resultados y la capacidad para comprender el mecanismo mediante el cual los CI podrían proteger al ligando frente al deterioro oxidativo. Por lo tanto, aún es necesario investigar la aplicación de técnicas que permitan profundizar los conocimientos relacionados con la estabilidad de los complejos de inclusión.

La estabilidad oxidativa puede evaluarse a través de un ensayo bajo condiciones aceleradas utilizando un equipo Rancimat. En el mismo, la muestra se expone una corriente de aire y temperatura constantes (entre 50 y 220 °C) para promover la oxidación de la muestra. Los productos de oxidación secundarios volátiles (ácido fórmico, acético, propiónico, entre otros) son transportados a través del aire y colectados en un vaso de medición, en donde se disuelven en la solución de medida (agua Milli-Q). Se registra la conductividad de dicha solución en función del tiempo, la cual aumenta debido a la presencia de los compuestos volátiles disueltos. El tiempo transcurrido hasta la aparición de estos productos de reacción secundarios se conoce como *tiempo de inducción*, el cual es un indicador de la estabilidad a la oxidación. Bajo las mismas condiciones de medida, cuanto mayor sea el tiempo de inducción, más estable es el aceite (Li et al., 2019).

El Rancimat se ha utilizado ampliamente para estudiar la estabilidad oxidativa de grasas y aceites a granel (Márquez-Ruiz et al., 2008). Además, su uso se ha extendido hacia sistemas de aceites encapsulados, en los cuales existen otras variables que adicionan complejidad a la evaluación y control de la estabilidad oxidativa (Velasco et al., 2000). El estado heterofásico de dichos sistemas hace que la oxidación en los mismos ocurra de modo heterogéneo, dependiendo de la distribución del aceite en la matriz (encapsulado/libre) (Velasco et al., 2006). Estos factores, sumados al estado en polvo y a la porosidad de las microcápsulas, hacen que la accesibilidad del aire y la transferencia de calor durante la medición en el equipo Rancimat sean diferentes en comparación con

los aceites a granel (sistema monofásico). Sin embargo, hasta el momento, este método no se ha aplicado en complejos de inclusión amilosa-ácidos grasos.

En este sentido, en el presente Capítulo se investiga la formación de complejos entre almidón de maíz de alta amilosa con ácidos grasos de chía (10 y 20 % H/S) empleando el método alcalino sin la etapa de templado, evaluando el impacto de dichas condiciones sobre las propiedades fisicoquímicas y la estabilidad de los CI. Así, en el presente Capítulo se profundiza el estudio de la estabilidad de los CI usando métodos que emplean condiciones de deterioro aceleradas, incluyendo el análisis termogravimétrico y la medición de la retención de ácidos  $\alpha$ -linolénico y linoleico durante el almacenamiento de los complejos a 90 °C por 6 h. Adicionalmente, también se analiza la aplicación del método Rancimat en la evaluación de la estabilidad de los CI.

### 3.2. Materiales y métodos

#### 3.2.1. Materiales

El almidón de maíz de alta amilosa (HYLON VII, >70% amilosa) fue donado por Ingredion Inc. (Westchester, Illinois, EE. UU.). El aceite de chía fue adquirido en Solazteca SDA S.A. (Buenos Aires, Argentina) y la lipasa de *Candida rugosa* tipo VII (EC 3.1.1.3), en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.), actividad enzimática  $\geq 700$  U/mg (1 unidad hidroliza 1 microequivalente de ácido graso a partir de un triacilglicérido en 1 h a pH 7.2 y 37 °C usando aceite de oliva). Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

#### 3.2.2. Caracterización inicial del aceite de chía

##### 3.2.2.1. Ácidos grasos libres (FFA)

El contenido de ácidos grasos libres (FFA, % como ácido oleico) del aceite de chía se determinó de acuerdo al método de la AOCS (AOCS, 1997a), tal como se describió en la Sección 2.2.3.1.

### 3.2.2.2. Índice de peróxidos (PV)

La determinación del índice de peróxidos en el aceite de chía se realizó de acuerdo a la norma AOCS (AOCS, 1997b), la cual se detalla en la Sección 2.2.3.2.

### 3.2.2.3. Composición de ácidos grasos por cromatografía gaseosa (CG)

Para la cuantificación de los ácidos grasos del aceite de chía se usó un cromatógrafo gaseoso Agilent Technologies 7890 A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SA). Las condiciones de derivatización del aceite, de separación de los ésteres metílicos y posterior cuantificación de los ácidos grasos fueron las descritas en la Sección 2.2.3.3.

### 3.2.3. Hidrólisis enzimática del aceite de chía

La hidrólisis enzimática del aceite de chía con la lipasa de *Candida rugosa* y la posterior extracción ácida de la fracción lipídica conteniendo los ácidos grasos liberados (hidrolizado) se llevaron a cabo de acuerdo a los protocolos descritos en las Secciones 2.2.4 y 2.2.5.2, respectivamente.

### 3.2.4. Formación de complejos de inclusión sin templado

Para la formación de los complejos de inclusión se utilizó el protocolo descrito en la Sección 2.2.6.1, sin la etapa de templado (2 h a 90 °C). Para ello, se disolvió el almidón de alta amilosa (1,5% p/v) en KOH 0,1 M a 100 °C durante 20 min con agitación constante. Luego, se enfrió hasta 50 °C y se mezcló con el hidrolizado de aceite de chía (10 o 20% p/p hidrolizado/almidón), el cual se encontraba previamente disuelto en KOH 0,1 M (0,1% p/v). La mezcla se agitó durante 2 min. Posteriormente, se enfrió hasta temperatura ambiente, se ajustó el pH hasta ~4,6 con HCl concentrado y los complejos se separaron por centrifugación (4000xg, 20 min) usando una centrífuga Beckman Coulter J-25 (Beckman Coulter, CA, EE. UU.). El precipitado obtenido se lavó dos veces con etanol/agua 50/50 v/v, centrifugando entre lavados. Los complejos se secaron por liofilización durante 48 h usando un liofilizador L-A-B4-C (Rificor, Buenos Aires, Argentina), se molieron con un mortero y se tamizaron utilizando un tamiz N° 35 (<500 µm). El rendimiento másico del proceso de complejación se calculó de acuerdo a la Ecuación 2.6 de la Sección 2.2.7.1. Los complejos formados sin templado con una

relación hidrolizado/almidón de 10 y 20% se identificaron como CI10 y CI20, respectivamente.

Con el fin de evaluar el efecto de la omisión de la etapa de templado sobre la estabilidad de los complejos, en los ensayos de estabilidad acelerada (Secciones 3.2.6.2 y 3.2.6.3), se incluyeron a modo comparativo complejos de inclusión formados con templado (2 h-90 °C) con 10 y 20% H/S (T-CI10 y T-CI20), obtenidos de acuerdo al protocolo descrito en la Sección 2.2.6.2.

### 3.2.5. Caracterización fisicoquímica de los complejos de inclusión amilosa-ácidos grasos de chía

#### 3.2.5.1. Contenido de C<sub>18:3</sub> y C<sub>18:2</sub> por cromatografía gaseosa (CG)

El contenido de ácidos  $\alpha$ -linolénico y linoleico en los complejos se determinó por cromatografía gaseosa, siguiendo el protocolo descrito en la Sección 2.2.7.2.

#### 3.2.5.2. Difracción de rayos X (DRX)

Para la determinación de los espectros de difracción de rayos X de los complejos de inclusión se utilizó un difractómetro Bruker D2 Phaser (Bruker Corporation, Billerica, MA, EE. UU.), con radiación de CuK $\alpha$  ( $\lambda=0,154$  nm). Se utilizaron 40 kV y una corriente de 40 mA. Las muestras en polvo se escanearon en un rango comprendido entre 3 y 35° (2 $\theta$ ), en pasos de 0,04° por 2,5 s. Los difractogramas obtenidos se analizaron usando el software PeakFit v4.12 (SeaSolve Software Inc., EE. UU.). El *grado de cristalinidad (%)* se calculó a partir de las áreas de los picos cristalinos y amorfo, usando la Ecuación 2.7 detallada en la Sección 2.2.7.3.

#### 3.2.5.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Las propiedades térmicas de los complejos se analizaron utilizando un calorímetro MDSC Q-200 (TA Instruments, New Castle, DE, EE. UU.). Tanto la preparación de las muestras como su posterior medición se realizaron siguiendo el protocolo descrito en la Sección 2.2.7.4.

#### 3.2.5.4. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)

Para el estudio de los complejos de inclusión por ATR-FTIR se colocaron ~5 mg de CI en polvo directamente sobre el portamuestras de un espectrómetro de ATR-FTIR Thermo Nicolet iS10 (Thermo Scientific, MA, EE. UU.). Los espectros se registraron en un rango de  $4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$ , promediando 32 espectros con una resolución de  $4 \text{ cm}^{-1}$ , usando el software OMNIC (versión 8.3, Thermo Scientific, MA, EE. UU.).

#### 3.2.5.5. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología de los CI se estudió utilizando un microscopio electrónico de barrido modelo MA10 (Carl Zeiss SMT Ltd., Cambridge, Reino Unido), siguiendo el procedimiento detallado en la Sección 2.2.7.6, empleando un voltaje de aceleración de 10-20 kV.

#### 3.2.6. Estabilidad oxidativa de los complejos de inclusión bajo condiciones aceleradas de reacción

A continuación, se describen tres métodos que fueron empleados para abordar el estudio de la estabilidad de los complejos de inclusión: análisis termogravimétrico, Rancimat y retención de ácidos  $\alpha$ -linolénico y linoleico durante el almacenamiento a  $90 \text{ }^\circ\text{C}$ . En dichos ensayos, se utilizó como control una mezcla física (MF) almidón/hidrolizado de aceite de chía (sin complejar), la cual se preparó mezclando el almidón de maíz de alta amilosa nativo con el hidrolizado previamente disuelto en etanol absoluto (99% pureza), en una proporción tal que permitió alcanzar en la mezcla final un contenido de  $\text{C}_{18:3}$  similar al de los CI. Posteriormente, se evaporó el etanol con corriente de nitrógeno gaseoso, obteniéndose la MF en polvo. En el caso de los ensayos de Rancimat y de retención de  $\text{C}_{18:3}$  y  $\text{C}_{18:2}$  a  $90 \text{ }^\circ\text{C}$ , además de los CI sin templado (CI10 y CI20) y de la MF, también se incluyeron complejos formados con templado (2 h- $90 \text{ }^\circ\text{C}$ ) con 10 y 20% H/S (T-CI10 y T-CI20). El análisis termogravimétrico de estos últimos fue abordado anteriormente en la Sección 2.3.15.

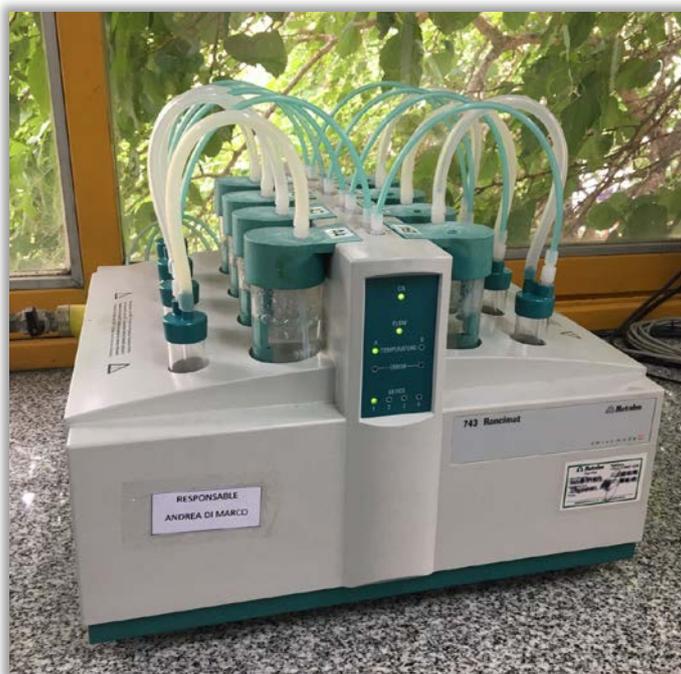
### 3.2.6.1. Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico de los CI sin templado (CI10 y CI20) y de la mezcla física hidrolizado/almidón se realizó usando una termobalanza Shimadzu TA-50 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón), de acuerdo al protocolo descrito en la Sección 2.2.7.7.

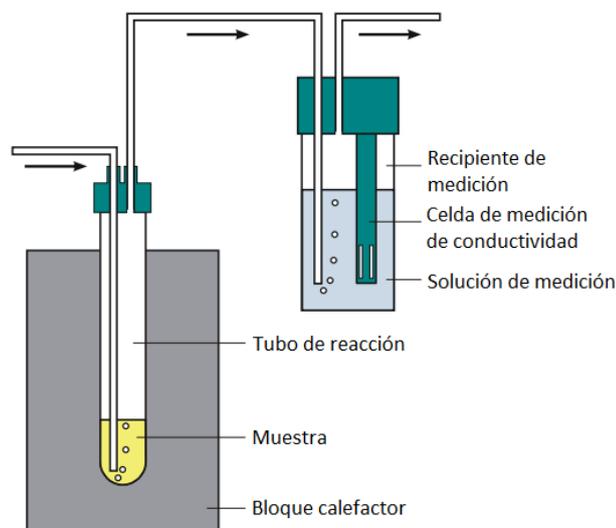
### 3.2.6.2. Estabilidad oxidativa acelerada por Rancimat

#### *Determinación del tiempo de inducción a distintas temperaturas (70-98 °C)*

La estabilidad oxidativa acelerada de los complejos de inclusión formados con templado (T-CI10 y T-CI20) y sin templado (CI10 y CI20) y de la mezcla física (MF) se evaluó utilizando un equipo Rancimat 743 (Metrohm AG, Herisau, Suiza) (**Figura 3.1**). Las muestras en polvo (0,5 g) se colocaron en los tubos de reacción (**Figura 3.2**) y se calentaron a 70, 80, 90 y 98 °C bajo una corriente de aire constante (20 L/h). Los productos de oxidación volátiles se colectaron en los recipientes de medición conteniendo 60 mL de agua ultrapura de baja conductividad (Milli-Q), registrándose los cambios en este parámetro en función del tiempo.

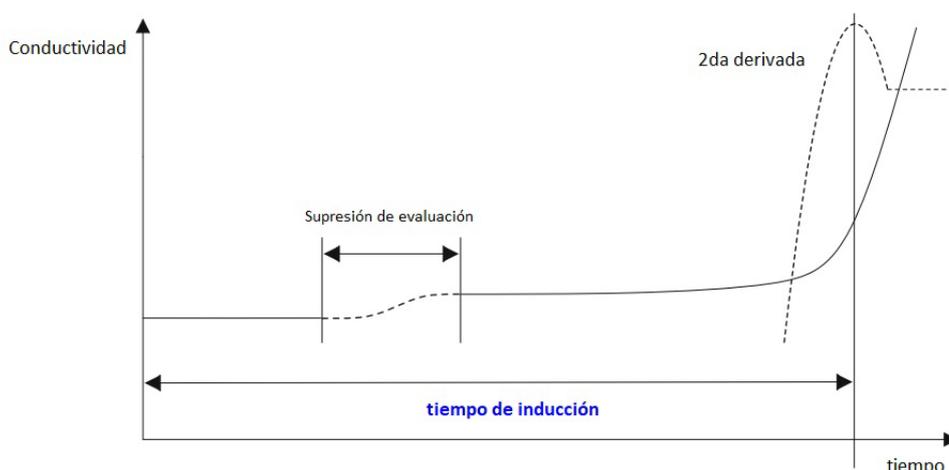


**Figura 3.1.** Equipo Rancimat modelo 743 (Metrohm AG, Herisau, Suiza) utilizado en la medición de la estabilidad oxidativa bajo condiciones aceleradas



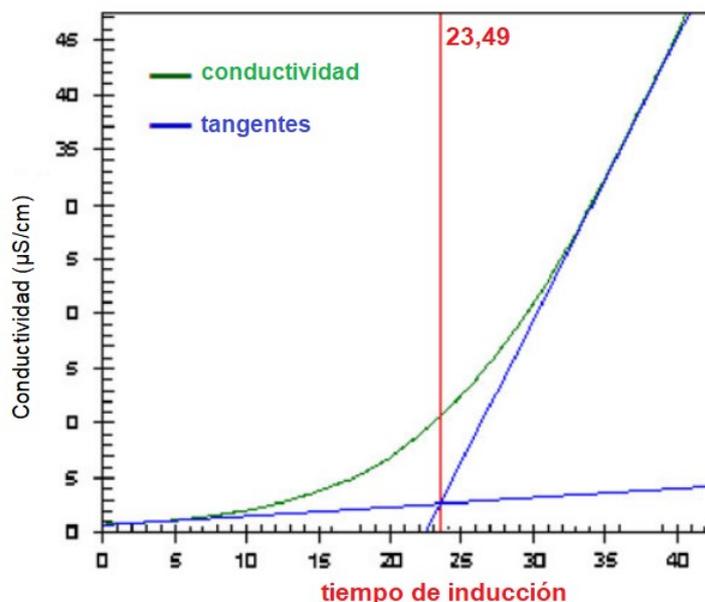
**Figura 3.2.** Disposición de los componentes de medición en el equipo Rancimat (representación esquemática). Fuente: 743 Rancimat Manual (Metrohm AG, Herisau, Suiza)

El Rancimat se usó en el modo de evaluación del *tiempo de inducción* ( $t_{ind}$ ), definido como el intervalo requerido hasta alcanzar el punto de inflexión de la curva de conductividad vs tiempo. Para ello, se utilizó el software 743 Rancimat v1.1 (Metrohm AG, Herisau, Suiza), el cual detecta automáticamente el  $t_{ind}$  en aquel punto donde la segunda derivada de la curva conductividad vs tiempo alcanza un valor máximo, tal como se ilustra en la **Figura 3.3**.



**Figura 3.3.** Detección del tiempo de inducción ( $t_{ind}$ ) a partir de un gráfico de conductividad vs. tiempo obtenido en Rancimat. Fuente: 743 Rancimat Manual (Metrohm AG, Herisau, Suiza)

En aquellos casos en los que el equipo no detectó automáticamente el  $t_{ind}$  debido al alto y ancho de la curva, el mismo se determinó manualmente como el punto de intersección entre las dos rectas tangentes a la curva de conductividad vs. tiempo, tal como se ilustra en la **Figura 3.4**.



**Figura 3.4.** Medición del tiempo de inducción a partir de la intersección de las rectas tangentes a la curva de conductividad vs. tiempo obtenida en Rancimat (Jain y Sharma, 2011)

*Extrapolación del tiempo de inducción a 25 °C*

A partir de los  $t_{ind}$  obtenidos a las distintas temperaturas (70-98 °C), se calculó el  $t_{ind}$  a 25 °C mediante una extrapolación de los resultados. Esta herramienta que ofrece el software del equipo Rancimat, empleando un modelo matemático exponencial basado en la ecuación de Arrhenius, tiene en cuenta la dependencia de la constante de velocidad de reacción con la temperatura:

$$t_{ind} = A \times e^{(B \times T)} \tag{Ecuación 3.1}$$

Donde A y B son los coeficientes de la fórmula exponencial y T es la temperatura (°C).

### 3.2.6.3. Estabilidad de C<sub>18:3</sub> y C<sub>18:2</sub> a 90 °C

La estabilidad térmica de los ácidos  $\alpha$ -linolénico y linoleico en los CI formados con y sin templado y en la MF se estudió siguiendo el método de Zhou et al. (2021), con algunas modificaciones. Para ello, los CI y la MF se pesaron en frascos de vidrio tapados con papel aluminio para evitar la exposición a la luz y posteriormente se almacenaron en una estufa Thermo Scientific Heratherm (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) a 90 °C durante 6 h. Se midió el contenido de C<sub>18:3</sub> y C<sub>18:2</sub> por cromatografía gaseosa a 0, 2 y 6 h de incubación, de acuerdo al método descrito en la Sección 2.2.3.3. Se calculó la *retención (%)* de ambos ácidos grasos a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Retención (\%)} = \frac{C_t}{C_i} \times 100 \quad \text{Ecuación 3.2}$$

Donde, C<sub>i</sub> y C<sub>t</sub> corresponden al contenido de C<sub>18:3</sub> o C<sub>18:2</sub> (g/100g de complejo o mezcla física) medidos al inicio (t=0) y al tiempo t del almacenamiento a 90 °C, respectivamente.

### 3.2.7. Análisis estadístico

Los resultados experimentales se analizaron según lo descrito en la Sección 2.2.8. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) unifactorial o multifactorial según corresponda y las comparaciones múltiples entre medias se realizaron mediante la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), usando el software Statgraphics Centurion XV.II (StatPoint Technologies, Warrenton, VA, EE. UU.).

## 3.3. Resultados y discusión

### 3.3.1. Caracterización inicial del aceite de chía y del hidrolizado

Al igual que en los capítulos anteriores, se midió el contenido de ácidos grasos libres (FFA), el índice de peróxidos (PV) y la composición de ácidos grasos del aceite de

chía inicial, con el fin de verificar la calidad previo a realizar la hidrólisis enzimática y posterior complejación. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 3.1**.

**Tabla 3.1.** Ácidos grasos libres, índice de peróxidos y composición de ácidos grasos del aceite de chía

Caracterización del aceite de chía	
Ácidos grasos libres (% como ácido oleico)	0,61 ± 0,05
Índice de peróxidos (mEqO <sub>2</sub> /kg)	1,3 ± 0,1
<b>Ácido graso</b>	<b>(% del total de ácidos grasos)</b>
Palmítico (C <sub>16:0</sub> )	7,6 ± 0,5
Estearico (C <sub>18:0</sub> )	2,8 ± 1,1
Oleico (C <sub>18:1</sub> )	4,3 ± 0,1
Linoleico (C <sub>18:2</sub> )	18,3 ± 0,5
α-Linolénico (C <sub>18:3</sub> )	67,0 ± 1,3
C <sub>18:2</sub> / C <sub>18:3</sub>	0,27 ± 0,01
SFAs	10,3 ± 0,7
MUFAs	4,3 ± 0,1
PUFAs	85,4 ± 0,8

Valores medios ± desviación estándar (n=2). MUFAs: ácidos grasos monoinsaturados; PUFAs: ácidos grasos poliinsaturados; SFAs: ácidos grasos saturados

Como puede observarse, los valores de FFA y PV se encontraron por debajo de 1,0% y 10,0 mEqO<sub>2</sub>/kg, respectivamente, resultando así ambos valores inferiores al límite máximo establecido en el Art. 527 bis del Capítulo VII del Código Alimentario Argentino para aceite de chía de uso industrial (Código Alimentario Argentino, 2023a).

El perfil de ácidos grasos presentado en la **Tabla 3.1** coincide con un perfil típico de aceite de chía (Ayerza, 1995; Ixtaina et al., 2011), siendo los ácidos esenciales α-linolénico (67,0%) y linoleico (18,3%) los que se encontraron en mayor proporción. La fracción lipídica obtenida luego de la hidrólisis enzimática del aceite de chía (hidrolizado) mostró la siguiente composición: C<sub>18:3</sub> (66,7%), C<sub>18:2</sub> (20,2%), C<sub>18:1</sub> (4,8%), C<sub>18:0</sub> (1,8%) y C<sub>16:0</sub> (6,5%). Por lo tanto, la reacción de hidrólisis y posterior extracción ácida del hidrolizado no modificó el perfil ácido respecto del aceite inicial, obteniéndose así una

fracción lipídica adecuada para ser usada como un ligando rico en ácidos  $\alpha$ -linolénico y linoleico durante la etapa de complejación posterior.

### 3.3.2. Rendimiento másico y contenido de C<sub>18:3</sub> y C<sub>18:2</sub>

En la **Tabla 3.2** se presentan los valores de rendimiento másico de los complejos de inclusión en polvo obtenidos luego de la liofilización. Como puede apreciarse, el proceso de complejación sin templado presentó un alto rendimiento másico, el cual estuvo comprendido entre 65 y 74%. El aumento de la relación H/S inicial generó una disminución significativa en dicho parámetro ( $p \leq 0,05$ ) (**Tabla 3.2**). Tal como se discutió en el caso de los complejos obtenidos mediante el proceso con templado (Sección 2.3.10), dado que el almidón usado para la formación de los CI presenta un 77% de amilosa (Sección 2.3.1), las relaciones hidrolizado/almidón de 10 y 20% evaluadas equivalen a una relación de 13 y 26% p/p hidrolizado/amilosa, respectivamente. Teniendo en cuenta que la concentración de saturación de amilosa con ácidos grasos es de ~10% (Karkalas y Raphaelides, 1986; Tang y Copeland, 2007), las concentraciones de hidrolizado estudiadas son superiores a dicho valor. Por lo tanto, el incremento en la relación H/S podría resultar en una pérdida de ligando no complejado por agregado en exceso (por encima de la concentración de saturación de amilosa), con la consecuente reducción en el rendimiento másico (calculado de acuerdo a la Ecuación 2.6 de la Sección 2.2.7.1).

**Tabla 3.2.** Rendimiento másico, contenido de C<sub>18:2</sub> + C<sub>18:3</sub> y relación C<sub>18:2</sub>/C<sub>18:3</sub> en complejos de inclusión formados sin templado con 10 y 20% (p/p) hidrolizado/almidón

Relación H/S (%)	Rendimiento másico % (g CI/g almidón + g hidrolizado)	C <sub>18:2</sub> + C <sub>18:3</sub> (g/100 g CI)	C <sub>18:2</sub> / C <sub>18:3</sub>
10	74,2 ± 0,7 <sup>a</sup>	6,0 ± 1,2 <sup>a</sup>	0,36 ± 0,01 <sup>b</sup>
20	65,4 ± 0,5 <sup>b</sup>	3,9 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,01 <sup>a</sup>

Valores con distinto superíndice en cada columna difieren significativamente ( $p \leq 0,05$ ) de acuerdo al test de Tukey. H: hidrolizado, S: almidón

En la **Tabla 3.2** puede apreciarse que los CI retuvieron un porcentaje de ácidos grasos esenciales linoleico +  $\alpha$ -linolénico de chía comprendido entre 3,9-6,0%. Dicho valor obtenido era esperado, teniendo en cuenta que la concentración de saturación de amilosa es de ~10% (tal como se mencionó en el párrafo anterior) y que el ligando

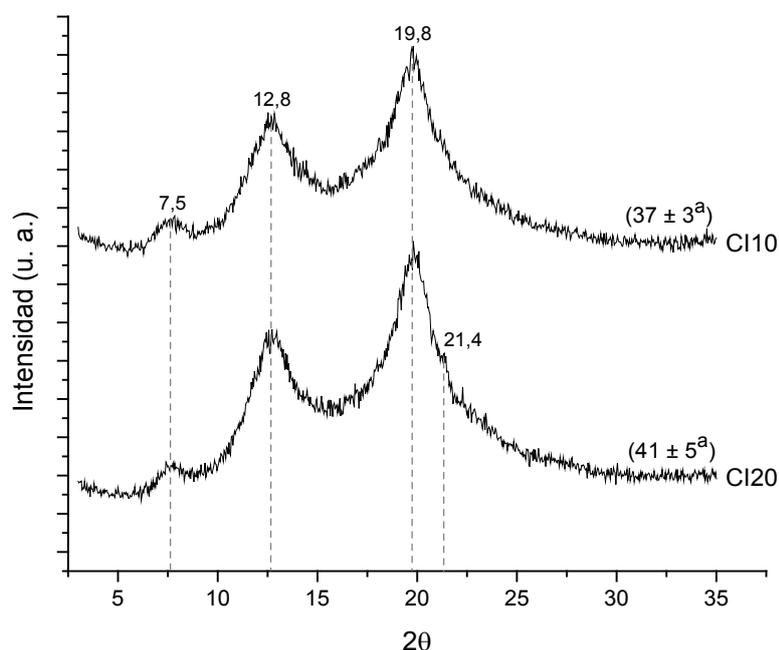
empleado está formado por otros ácidos grasos además del C<sub>18:3</sub> y C<sub>18:2</sub>. A partir de estos resultados, podemos decir que el contenido de C<sub>18:2</sub> + C<sub>18:3</sub> de los complejos no templados formados con 10% H/S (6,0%) (**Tabla 3.2**) fue dos veces superior al de aquellos CI templados formados con la misma proporción de ligando (Sección 2.3.4). Asimismo, tras la omisión del tratamiento de templado en los CI formados con 10% H/S, se observó una disminución en el valor de C<sub>18:2</sub> / C<sub>18:3</sub> desde 0,42 (Sección 2.3.4) hasta 0,36 (**Tabla 3.2**). Por lo tanto, las condiciones más suaves de reacción usadas durante la complejación debido a la eliminación del tratamiento a 90 °C durante 2 h, pudieron haber prevenido la degradación de los PUFAs, promoviendo así la obtención de CI con un mayor contenido de ácidos grasos esenciales de chía y una mayor proporción de ácido  $\alpha$ -linolénico en relación al linoleico, cuando se empleó una relación H/S inicial de 10%.

El aumento de la relación H/S no tuvo efecto significativo en el valor de C<sub>18:2</sub> + C<sub>18:3</sub> ( $p > 0,05$ ) (**Tabla 3.2**). Sin embargo, se observó un aumento significativo en el valor de C<sub>18:2</sub> / C<sub>18:3</sub> (**Tabla 3.2**), indicando que el incremento de la concentración de hidrolizado desde 10 hasta 20% en los complejos no templados provocó un descenso en la concentración de ácido  $\alpha$ -linolénico respecto de la de linoleico. Este comportamiento difiere del que se había encontrado previamente en los complejos templados, en los que cantidades crecientes de H/S habían resultado en un aumento significativo tanto en el contenido de C<sub>18:2</sub> + C<sub>18:3</sub>, así como en el porcentaje relativo de C<sub>18:3</sub> (Sección 2.3.10). Esto se había atribuido, por un lado, a que el incremento en la relación H/S desde 10 hasta 20 o 30% pudo haber compensado la pérdida de PUFAs ocurrida durante el templado a 90 °C, y, por otro lado, a la posible autoagregación de ácidos grasos saturados y monoinsaturados cuando se usaron altas concentraciones de hidrolizado (Sección 2.3.10). Dado que en los CI no templados el contenido de C<sub>18:3</sub> fue elevado, incluso a la menor relación H/S evaluada (10%), el incremento de la relación H/S hasta 20% podría haber favorecido la autoagregación de dicho ácido graso, promoviendo la formación de complejos con una menor proporción de C<sub>18:3</sub> respecto de C<sub>18:2</sub>.

### 3.3.3. Difracción de rayos X (DRX)

En la **Figura 3.5** se muestran los espectros de difracción de rayos-X correspondientes a los CI formados con 10 y 20% H/S sin templado (CI10 y CI20). Como puede apreciarse, ambos CI exhibieron dos reflexiones máximas a  $\sim 12,8$  y  $19,8^\circ$  ( $2\theta$ ) y una menor a  $7,5^\circ$ , consistente con un patrón de V-amilosa hidratada ( $V_h$ ), conteniendo

seis unidades de glucosa por giro (Kong et al., 2019; Zobel, 1988b). Este resultado sugiere que cuando se omite la etapa de templado durante la formación de los CI, también ocurre una efectiva complejación de los ácidos grasos del aceite de chía. Esto coincide con trabajos previos, en los que se demostró que complejos formados con ácidos grasos comerciales puros (complejos monoácidos) empleando el método alcalino a temperaturas tan bajas como 30 °C y sin etapa de templado, adquirieron efectivamente una estructura semicristalina tipo V (Marinopoulou et al., 2016b; Marinopoulou, Papastergiadis, y Raphaelides, 2016).



**Figura 3.5.** Patrones de difracción de rayos-X de complejos de inclusión formados sin templado con una relación hidrolizado/almidón de 10 (CI10) y 20% (CI20) p/p. Los valores entre paréntesis indican el grado de cristalinidad (%). Las mismas letras superíndices indican que no hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), de acuerdo al test de Tukey

Los resultados encontrados representan ciertas ventajas. Por un lado, confirma la efectiva formación de complejos tipo V con una mezcla de ácidos grasos provenientes de una fuente vegetal natural (aceite de chía) bajo condiciones que minimizan la degradación de los ácidos grasos esenciales poliinsaturados contenidos en ella, tal como se demostró a partir de los resultados de cromatografía gaseosa (Sección 3.3.2). Por otro lado, a través de la omisión del templado durante 2 h, se logra acortar el tiempo necesario para la

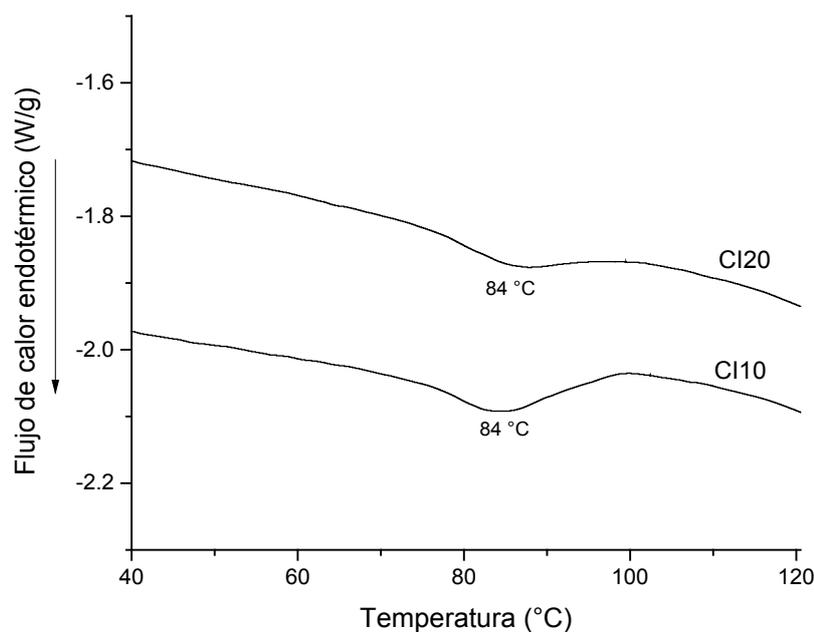
obtención de los complejos de inclusión, lo cual representa una limitación del método alcalino (Guo et al., 2021).

En la **Figura 3.5** también puede observarse que ambos CI exhibieron un patrón semicristalino, con un grado de cristalinidad comprendido entre 37 y 41%. Asimismo, no se encontraron diferencias significativas entre el CI10 y el CI20 ( $p > 0,05$ ), indicando que la concentración de ligando inicial no tuvo efecto en la estructura cristalina de los complejos. Adicionalmente, en los espectros puede apreciarse la presencia de un hombro a  $21,4^\circ$ , principalmente en el CI formado con 20% H/S (**Figura 3.5**). Tal como se discutió en la Sección 2.3.11, dicha reflexión podría atribuirse a cristales de ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico) provenientes del ligando (hidrolizado), que estarían atrapados en los espacios inter-hélice y pudieron no haber sido disueltos y removidos completamente durante el lavado con etanol/agua (Cao et al., 2015; Di Marco et al., 2023; Zhou et al., 2022). A pesar de la alta relación H/S usada para formar el CI20, la baja intensidad del pico a  $21,4^\circ$  sugiere la presencia de una pequeña cantidad de cristales de ácidos grasos saturados, lo que podría relacionarse con el bajo porcentaje de ácidos esteárico y palmítico presentes en el hidrolizado (Sección 3.3.1). En el CI10, el pico a  $21,4^\circ$  es prácticamente indetectable (**Figura 3.5**), por lo que el contenido de hidrolizado inicial pudo no haber sido lo suficientemente alto como para promover la recristalización de los ácidos grasos saturados. Adicionalmente, no pudo detectarse por DRX la presencia de ácidos grasos insaturados no complejados recristalizados (oleico, linoleico,  $\alpha$ -linolenico) provenientes del aceite de chía hidrolizado, ya que los mismos se encuentran en estado líquido a temperatura ambiente.

#### 3.3.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En la **Figura 3.6** se muestran las transiciones térmicas del CI10 y CI20 obtenidas por DSC. Como puede apreciarse, ambas muestras presentaron una única endoterma amplia, con una temperatura de pico ( $T_p$ ) de  $84^\circ\text{C}$  y una entalpía ( $\Delta H$ ) de  $10\text{ J/g}$  (b. s.). Dicha transición podría atribuirse a la disociación del complejo amilosa-lípido (Karkalas et al., 1995; Zhou et al., 2022), lo que confirmaría la efectiva formación de CI amilosa-ácidos grasos de chía, aun cuando no se incluye la etapa de templado durante el proceso de formación, en concordancia con los resultados de difracción de rayos-X (Sección 3.3.3). Dado que el ligando utilizado en el presente trabajo está formado por una mezcla de ácidos grasos (Sección 3.3.1), la endoterma amplia observada en los CI10 y CI20

puede ser el resultado de la superposición de varias endotermas individuales originadas por la disociación de complejos formados entre la amilosa y los distintos ácidos grasos que componen el hidrolizado de aceite de chía, tal como se discutió anteriormente en las Secciones 2.3.6 y 2.3.12.



**Figura 3.6.** Termogramas de DSC de complejos de inclusión formados sin templado con una relación hidrolizado/almidón de 10 (CI10) y 20% (CI20) p/p

La  $T_p$  de las muestras en estudio fue menor a 100 °C, sugiriendo que las condiciones de complejación empleadas promovieron la formación de la forma polimórfica I (Zhou et al., 2022). A su vez, no se registraron diferencias significativas en la  $T_p$  ni en el  $\Delta H$  de los CI formados con 10 y 20% H/S ( $p > 0,05$ ), indicando que la relación hidrolizado/almidón inicial no tuvo efecto sobre las propiedades térmicas de los complejos no templados. Este resultado coincide con el encontrado anteriormente en los CI templados formados con relaciones crecientes de H/S (10-30% p/p) (Sección 2.3.12).

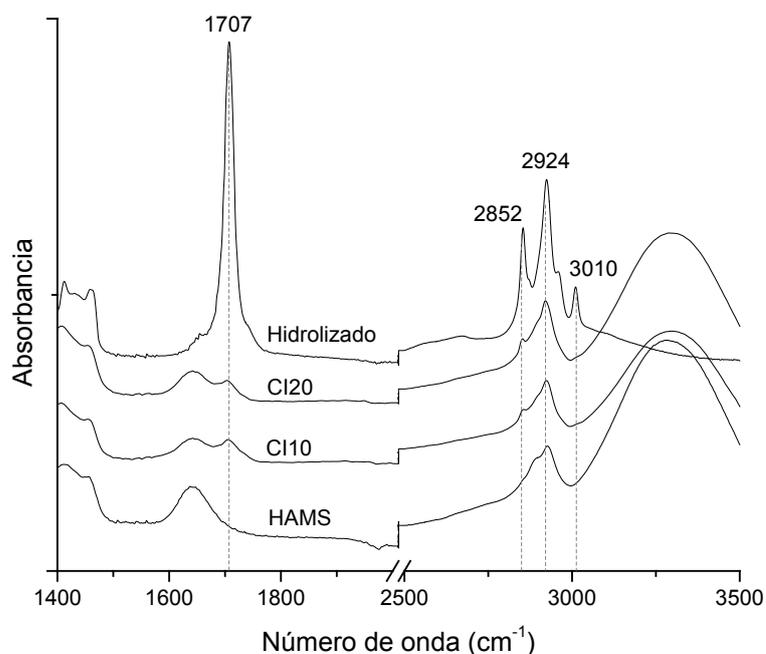
Otro aspecto importante a resaltar es que la  $T_p$  de los CI no templados (84 °C) fue menor que la de los CI templados ( $T_p \sim 94$  °C) (Sección 2.3.12). La  $T_p$  de las endotermas originadas por la disociación amilosa-ligando durante el calentamiento generalmente se encuentra comprendida entre 80 y 120 °C, y depende principalmente de la estructura del CI. Dicha estructura, a su vez, está influenciada por las condiciones de obtención y por el tipo de ligando (Kong et al., 2019; Rostamabadi et al., 2019a; Seo et al., 2015). En cuanto al primer aspecto relacionado con el efecto de las condiciones de obtención, podemos

decir que la disminución en la  $T_p$  observada como resultado de la eliminación del calentamiento durante 2 h a 90 °C coincide con otros trabajos previos, en los que el empleo de temperaturas más bajas durante la formación de CI amilosa-ácidos grasos resultó en la disminución de la  $T_p$  de los complejos obtenidos (Kong et al., 2019; Marinopoulou et al., 2016b). El segundo aspecto a analizar está relacionado con el efecto del tipo de ligando sobre las propiedades térmicas de los complejos. La  $T_p$  varía según el espesor lamelar del CI, lo que a su vez depende del segmento lineal de ligando disponible para ser envuelto por la amilosa (Kong et al., 2019; Shi et al., 2019; Zhou et al., 2022). En el caso de los complejos monoácidos amilosa-ácidos grasos, se ha demostrado que la estabilidad térmica ( $T_p$ ) de los mismos disminuye a medida que aumenta el grado de insaturación (Tufvesson et al., 2003a), dado que los dobles enlaces *cis* disminuyen el segmento lineal disponible, distorsionando la hélice de amilosa y formando CI en los que existen menos interacciones hidrofóbicas amilosa-ligando, caracterizados por una menor  $T_p$  (Karkalas et al., 1995; Kong et al., 2019; Sun et al., 2021; Zhou et al., 2022). En este sentido, Tufvesson et al. (2003b) han demostrado que la  $T_p$  de los complejos monoácidos no sometidos a tratamiento térmico formados con C<sub>18:3</sub>, C<sub>18:2</sub>, C<sub>16:0</sub>, C<sub>18:1</sub> y C<sub>18:0</sub> (aquellos ácidos grasos que componen el hidrolizado) fue de 85,7<93,6<96,8<102,8<109,1 °C, respectivamente, correspondientes al polimorfo tipo I. Adicionalmente, la incorporación de un tratamiento térmico a 100 °C durante 24 h favoreció la formación de polimorfos tipo II. Si bien el ligando usado en los complejos con y sin templado fue siempre el mismo (aceite de chía hidrolizado), éste consiste en una mezcla de ácidos grasos, los cuales difieren principalmente en el grado de insaturación. De acuerdo a esto, la  $T_p$  encontrada en los complejos no templados (84 °C) es similar a la del complejo monoácido amilosa-C<sub>18:3</sub>, el cual es el ácido mayoritario en el hidrolizado, mientras que la disociación de los complejos obtenidos mediante el proceso con templado ocurre a una temperatura superior (94 °C), la cual es similar a la  $T_p$  del complejo amilosa-C<sub>18:2</sub> y amilosa-C<sub>16:0</sub>. Por lo tanto, la omisión del calentamiento a 90 °C pudo haber favorecido la interacción entre la amilosa con el ácido  $\alpha$ -linolénico que compone el hidrolizado, formando así CI con una menor  $T_p$ . Contrariamente, la incorporación de un tratamiento a 90 °C durante 2 h (templado) pudo haber promovido la interacción de la amilosa con aquellos ácidos grasos de chía con menor grado de insaturación (especialmente C<sub>18:2</sub> y C<sub>16:0</sub>), dando origen a complejos caracterizados por una mayor  $T_p$ , en los que el C<sub>18:3</sub> podría estar interactuando más débilmente con la amilosa.

Si bien en los difractogramas de rayos-X se había detectado la presencia de cristales de ácidos grasos saturados no complejados, principalmente en el CI20 (Sección 3.3.3), en los termogramas mostrados en la **Figura 3.5** no se encontraron endotermas originadas por la fusión de ácidos grasos saturados C<sub>16:0</sub> y C<sub>18:0</sub>, cuya T<sub>p</sub> se encontraría a aproximadamente 61 y 68 °C, respectivamente (Sun et al., 2021). Esto podría deberse a que los mismos se encuentran en una baja proporción en el hidrolizado original, por lo que la cantidad de cristales formados podría resultar indetectable por DSC. Adicionalmente, en los termogramas no pudo detectarse la presencia de PUFAs no complejados, ya que los mismos se encuentran en estado líquido en el rango de temperatura de medida (Sun et al., 2021).

### 3.3.5. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)

En la **Figura 3.7** se muestran los espectros de ATR-FTIR. Como puede apreciarse, los complejos formados sin templado con 10 y 20% H/S presentaron bandas a 2852 y 2924 cm<sup>-1</sup>, originadas por las vibraciones simétricas y asimétricas de los enlaces -C-H de los grupos CH<sub>2</sub> de las cadenas alquílicas de los ácidos grasos, respectivamente (Guillen y Cabo, 1997).



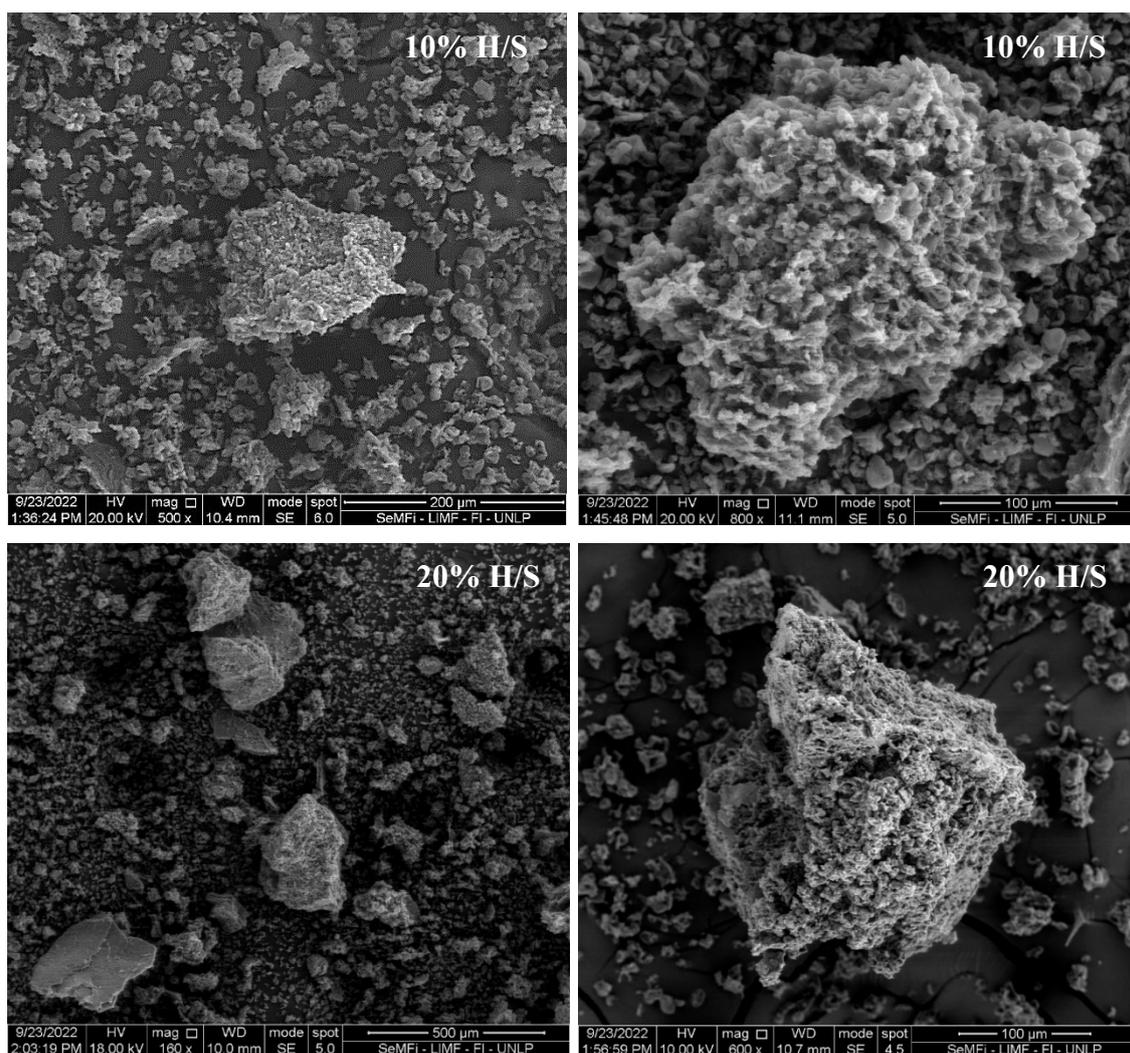
**Figura 3.7.** Espectros de ATR-FTIR del hidrolizado de aceite de chía, de los complejos de inclusión formados sin templado con una relación hidrolizado/almidón de 10% (CI10) y 20% (CI20) p/p y del almidón de maíz de alta amilosa nativo (HAMS)

Adicionalmente, también se observó la presencia de una banda a  $\sim 1707\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a la vibración de estiramiento del carbonilo ( $-\text{C}=\text{O}$ ) del grupo ácido de los ácidos grasos (Guillen y Cabo, 1997). La aparición de estas bandas típicas de ácidos grasos en los espectros de los CI confirman la efectiva retención de ácidos grasos de chía en ambos complejos (Cao et al., 2015), los cuales podrían estar presentes tanto en la cavidad interna de la hélice de amilosa y/o atrapados físicamente en los espacios intersticiales de hélices adyacentes (Guo et al., 2018).

En los complejos templados, se había encontrado que un incremento en la relación H/S por encima de 10% generaba un aumento significativo en el contenido de  $\text{C}_{18:2} + \text{C}_{18:3}$  (Sección 2.3.10), con la consecuente aparición de una banda a  $3010\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a la vibración del  $=\text{C}-\text{H}$  del doble enlace *cis* de los ácidos grasos insaturados (Sección 2.3.13). En los espectros de IR de los CI no templados (CI10 y CI20), por el contrario, no se detectó la presencia de dicha banda (**Figura 3.7**), lo que concuerda con los resultados de contenido de  $\text{C}_{18:2} + \text{C}_{18:3}$  mostrados previamente (ver Sección 3.3.2), en los que un aumento de la relación H/S desde 10 hasta 20% no generó un incremento significativo del contenido de PUFAs en los complejos. Si bien el aceite de chía hidrolizado usado como ligando posee un alto contenido de PUFAs y, tal como se verificó por cromatografía gaseosa, los complejos de inclusión retuvieron un alto contenido de éstos, la ausencia de la banda a  $3010\text{ cm}^{-1}$  podría también atribuirse al atrapamiento de dichos ácidos grasos en la estructura de almidón, lo que podría enmascarar la absorción en IR (Guo et al., 2021).

### 3.3.6. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En la **Figura 3.8** se muestran las micrografías electrónicas de barrido de los CI en estudio. En todos los casos, se observó la presencia de partículas con formas irregulares y una superficie porosa, en concordancia con micrografías típicas de complejos de inclusión amilosa-ácidos grasos formados por el método alcalino y secados por liofilización (Zabar et al., 2010).



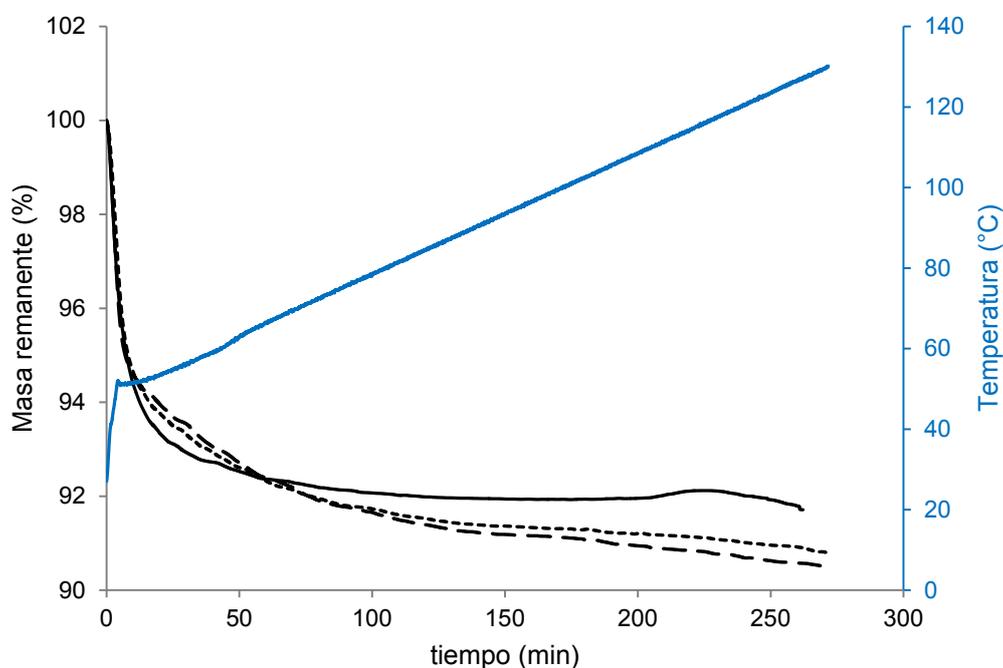
**Figura 3.8.** Micrografías electrónicas de barrido de complejos de inclusión formados sin templado con una relación inicial de 10 y 20% p/p hidrolizado/almidón (H/S)

Como se mencionó en la Sección 3.2.4, los CI se molieron con un mortero y se tamizaron luego de la liofilización. Por este motivo, las imágenes de SEM revelaron que los mismos están formados por partículas sólidas de tamaños variables ( $<500 \mu\text{m}$ ). Las imágenes obtenidas son similares a las de los CI formados con templado (Sección 2.3.14) y no se observaron diferencias morfológicas entre los complejos no templados formados con 10 y 20% de hidrolizado. Esto indica que tanto la omisión de la etapa de templado, así como el aumento de la relación H/S no modificaron las propiedades morfológicas de los CI a nivel microscópico.

3.3.7. Estabilidad oxidativa de los complejos de inclusión bajo condiciones aceleradas de reacción

3.3.7.1. Análisis termogravimétrico (TGA)

La estabilidad oxidativa acelerada de los complejos no templados se estudió por análisis termogravimétrico, tal como se realizó previamente en el caso de los complejos formados con templado (Sección 2.3.15). En la **Figura 3.9** se muestran los resultados correspondientes a los CI en estudio (CI10 y CI20) y a la mezcla física hidrolizado/almidón.



**Figura 3.9.** Curvas del análisis termogravimétrico de la mezcla física hidrolizado/almidón (—) y de complejos de inclusión formados sin templado con una relación hidrolizado/almidón de 10% (— —) y 20% (- - -) p/p

En todas las muestras puede observarse una pérdida de masa (~8%) al inicio del calentamiento, debido a la evaporación de humedad residual (Bottom, 2008; Marinopoulou et al., 2016a). En el caso de la mezcla física, se encontró una región de ganancia de masa ( $0,15\% \pm 0,06$ ) en el rango de temperatura comprendido entre ~115 y 120 °C (**Figura 3.9**). Dicho comportamiento, puede atribuirse a la captación de oxígeno que ocurre durante la reacción de oxidación (Bottom, 2008), dando origen a la formación

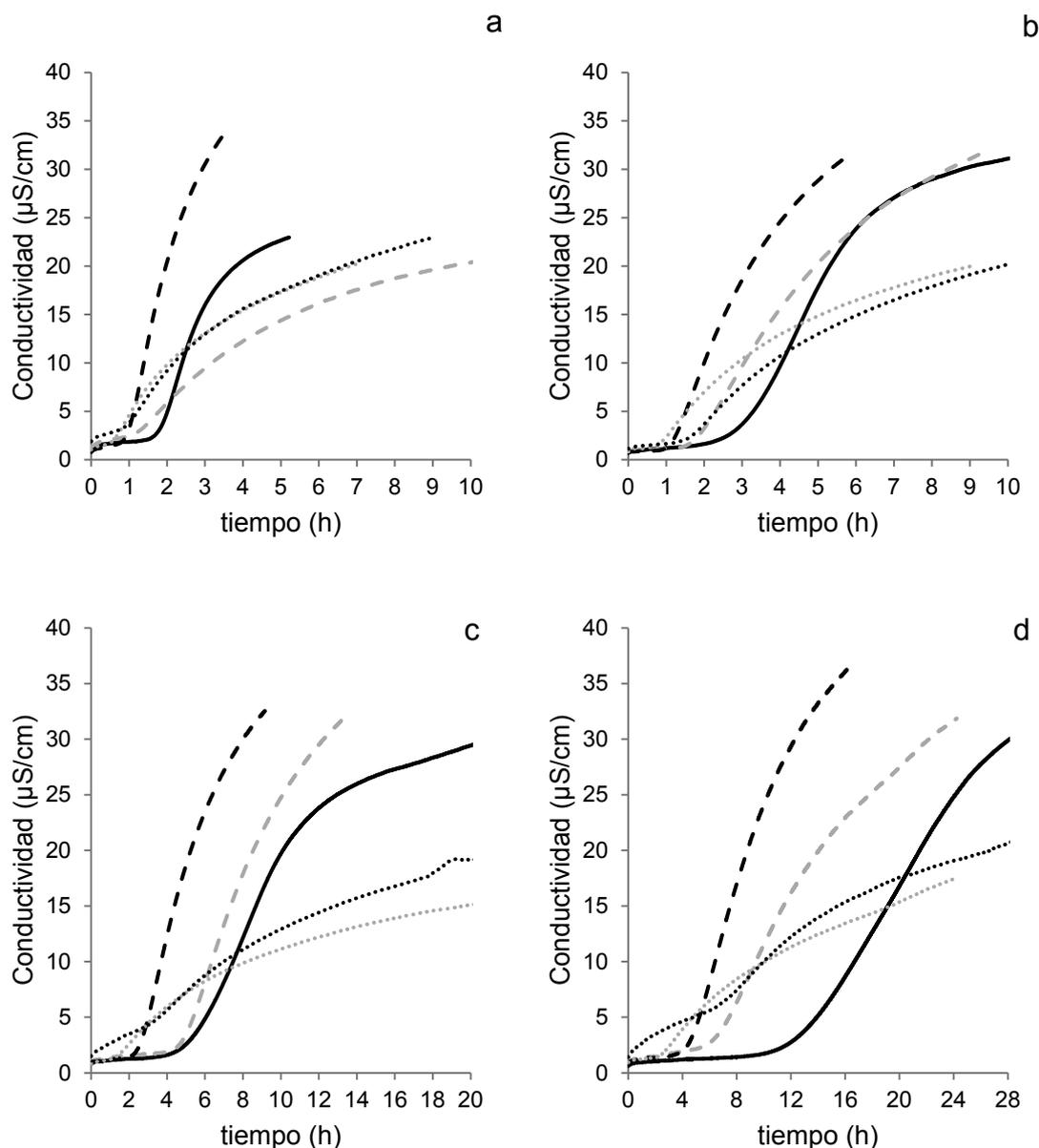
de hidroperóxidos. Como se mencionó anteriormente, el hidrolizado que compone la MF presenta un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (Sección 3.3.1), cuyos dobles enlaces son altamente susceptibles a la oxidación lipídica. De acuerdo a este resultado, la MF no protegió al hidrolizado contra la oxidación, lo cual era esperado, ya que en la misma el ligando se encuentra libre, no retenido dentro de la matriz del complejo, quedando fácilmente accesible al oxígeno. Este comportamiento observado en la mezcla física hidrolizado/almidón es similar al que se había encontrado previamente en el hidrolizado libre (sin complejar) (Sección 2.3.15), el cual había mostrado una etapa de ganancia de masa aproximadamente en el mismo rango de temperatura que la MF.

En contraste, las curvas de TGA de los complejos de inclusión (CI10 y CI20) no mostraron una zona de ganancia de masa (**Figura 3.9**). Este resultado sugiere que los CI formados sin templado tanto con 10 como con 20% H/S protegerían a los PUFAs del aceite de chía frente a la oxidación lipídica bajo las condiciones de medida empleadas. La interacción amilosa-ácido graso podría prevenir la oxidación del ligando a través de la limitación de la accesibilidad del oxígeno (Yang et al., 2009). En el Capítulo anterior, se había encontrado que, en el caso de los complejos templados, sólo aquellos formados con 10% H/S sin sonicación (T-CI10) eran los que presentaban estabilidad oxidativa en TGA, mientras que aquellos formados con una relación H/S mayor a 10% y todos los CI tratados con ultrasonido se oxidaron durante el análisis termogravimétrico (Sección 2.3.15). En el caso de los CI no templados estudiados en el presente Capítulo, por el contrario, si bien se había encontrado que éstos presentaron un alto contenido de PUFAs (incluso aquel formado con una relación H/S de 10%) (Sección 3.3.2), a partir de los resultados de DSC y FTIR se había encontrado que la omisión del calentamiento durante 2 h a 90 °C pudo haber favorecido la interacción entre la amilosa con el ácido  $\alpha$ -linolénico que compone el hidrolizado (Secciones 3.3.4 y 3.3.5). Además, las condiciones más suaves de formación debido a la eliminación del templado (2 h-90 °C), pudieron haber protegido a los PUFAs de chía durante la complejación. Por lo tanto, estos dos factores pudieron haber resultado en la formación de CI capaces de otorgar una mayor protección a los ácidos grasos esenciales de chía contra la oxidación. Asimismo, a pesar de que el aumento de la relación H/S de los complejos no templados desde 10 hasta 20% generó un incremento en la relación  $C_{18:2} / C_{18:3}$  (Sección 3.3.2), no se detectaron diferencias en el comportamiento de éstos en el análisis termogravimétrico, siendo ambos estables bajo las condiciones de medida empleadas.

3.3.7.2. Estabilidad oxidativa por Rancimat

3.3.7.2.1. Estabilidad oxidativa acelerada determinada mediante Rancimat

En la **Figura 3.10** se muestran las curvas de Rancimat correspondientes a la mezcla física y a los complejos de inclusión formados con y sin templado con una relación hidrolizado/almidón inicial de 10 y 20% p/p. En la **Tabla 3.3** se presentan los valores de tiempos de inducción ( $t_{ind}$ ) de los CI y de la MF a las distintas temperaturas (70-98 °C).



**Figura 3.10.** Curvas de Rancimat a (a) 98, (b) 90, (c) 80 y (d) 70 °C de la mezcla física hidrolizado/almidón (—), de los complejos de inclusión no templados formados con una relación hidrolizado/almidón de 10% (···) y 20% (···) p/p y los complejos templados formados con una relación hidrolizado/almidón de 10% (---) y 20% (---) p/p

Como puede apreciarse, todas las curvas de Rancimat obtenidas a las temperaturas más altas (90 y 98 °C) mostraron un aumento de la conductividad lo suficientemente pronunciado que permitieron al equipo la detección automática de tiempos de inducción bien definidos, a partir del punto de inflexión de las mismas (**Figura 3.10a, b**). A la temperatura más baja ensayada (70 °C), en cambio, el T-CI10 y los complejos no templados (CI10 y CI20) mostraron un aumento gradual de la conductividad, lo que impidió la detección automática del  $t_{ind}$  por parte del equipo (**Figura 3.10d y Tabla 3.3**). Este comportamiento también se observó en el CI20 a 80 °C (**Figura 3.10c y Tabla 3.3**). En estos casos, el  $t_{ind}$  se midió como el punto de intersección de las rectas tangentes a la curva (Sección 3.2.6.2) (**Tabla 3.3**). Estos resultados coinciden con un estudio previo, en el que se aplicó el método Rancimat para la evaluación de la estabilidad de aceite de girasol y pescado encapsulados a 80 y 100 °C. En dicho estudio, se seleccionó una temperatura de 100 °C como la más adecuada para las determinaciones dado que, a 80 °C, las corridas fueron largas y las variaciones en la conductividad no fueron lo suficientemente rápidas como para permitir la evaluación automática del  $t_{ind}$  por parte del equipo (Velasco et al., 2000). En el caso de los complejos amilosa-ácidos grasos de chía, 70 y 80 °C podrían no ser temperaturas de medida lo suficientemente altas como para generar un aumento pronunciado en la conductividad en todas las muestras en estudio. Llamativamente, las muestras en las que se pudo detectar automáticamente el  $t_{ind}$  a 70 °C (MF y T-CI20) coinciden con aquellas que previamente habían mostrado una ganancia de masa por oxidación en el análisis termogravimétrico, mientras que aquellas que presentaron curvas más aplanadas a dicha temperatura (T-CI10, CI10 y CI20), son las mismas que fueron estables en el TGA (Secciones 2.3.15 y 3.3.7.1).

La variación en la conductividad en Rancimat está influenciada, entre varios factores, por la temperatura de medida. Además, en el caso de sistemas de aceites encapsulados, la oxidación de la fracción de aceite no encapsulada (libre) ha mostrado ser la responsable de la respuesta en Rancimat, ya que la misma no está protegida por la matriz sólida y, por lo tanto, se encuentra más accesible al aire (Velasco et al., 2000, 2009). Según estos autores, las microcápsulas a las que se les removió previamente el aceite libre, presentaron un aumento gradual de la conductividad en función del tiempo (Velasco et al., 2000, 2009). Este comportamiento concuerda con la hipótesis planteada anteriormente, que sostiene que en aquellos complejos en los que podría haber un mayor contenido de PUFAs retenidos en los espacios inter-hélice (en este caso, el T-CI20) (Sección 2.3.15), el ligando estaría más accesible al oxígeno, lo que podría causar un

aumento más pronunciado de la conductividad, incluso a 70 °C (**Figura 3.10d**). Un comportamiento similar ocurriría con la MF, en la que el hidrolizado se encuentra libre, no retenido en la matriz de almidón, presentando así una evolución de la conductividad en función del tiempo en Rancimat similar a la de aceites a granel.

Si bien esta diferenciación entre muestras que permitieron o no una detección automática del  $t_{ind}$  ocurrió sólo a 70 y 80 °C, también puede apreciarse que el aumento de la conductividad de los CI no templados fue gradual a todas las temperaturas evaluadas, mostrando curvas de Rancimat más aplanadas en comparación con el resto de las muestras (**Figura 3.10a-d**). Adicionalmente, en dichos CI, la conductividad empieza a aumentar lentamente desde el inicio del ensayo (principalmente a 70 y 80 °C), pero este aumento es tan gradual, que la curva atraviesa en la mayoría de los casos la curva correspondiente a la MF y a los CI templados. Este comportamiento observado en los complejos no templados podría atribuirse, tal como se discutió anteriormente, a la menor cantidad de ácidos grasos que podrían estar retenidos en los espacios inter-hélice. Además, la omisión de la etapa de templado a 90 °C pudo haber protegido al ligando durante la complejación y favorecido la interacción amilosa-ácido  $\alpha$ -linolénico (Sección 3.3.4), dando origen a CI que generan un aumento más progresivo de la conductividad en comparación con aquellos templados. Este comportamiento es similar a aquel observado en los aceites encapsulados a los que se les removió el aceite libre (Velasco et al., 2000, 2009).

**Tabla 3.3.** Tiempos de inducción a distintas temperaturas de la mezcla física hidrolizado/almidón y de complejos de inclusión formados con y sin templado con una relación hidrolizado/almidón de 10% y 20% p/p

Muestra	tiempo de inducción (h)			
	98 °C	90 °C	80 °C	70 °C
Mezcla física	1,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	3,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	5,5 ± 0,6 <sup>a</sup>	13,1 ± 0,9 <sup>a</sup>
CI 10% H/S con templado	1,5 ± 0,4 <sup>ab</sup>	2,0 ± 0,4 <sup>b</sup>	4,4 ± 0,6 <sup>ab</sup>	7,5 ± 1,4 <sup>b*</sup>
CI 20% H/S con templado	1,0 ± 0,1 <sup>bc</sup>	1,2 ± 0,1 <sup>bc</sup>	2,5 ± 0,1 <sup>cd</sup>	4,4 ± 0,2 <sup>cd</sup>
CI 10% H/S sin templado	0,5 ± 0,1 <sup>c</sup>	0,7 ± 0,1 <sup>c</sup>	1,5 ± 0,2 <sup>d</sup>	2,3 ± 0,4 <sup>d*</sup>
CI 20% H/S sin templado	0,9 ± 0,0 <sup>bc</sup>	1,6 ± 0,0 <sup>bc</sup>	3,3 ± 0,0 <sup>bc*</sup>	7,0 ± 0,0 <sup>bc*</sup>

Valores con distinto superíndice en cada columna difieren significativamente ( $p \leq 0,05$ ) de acuerdo al test de Tukey. H: hidrolizado, S: almidón

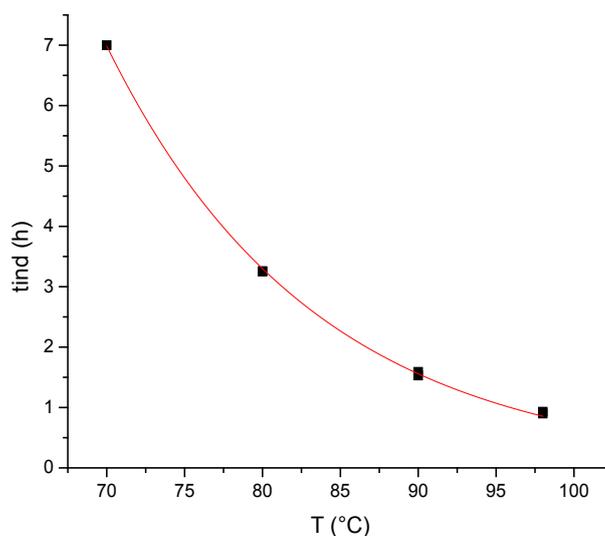
\* Tiempo de inducción calculado a partir de la intersección de las rectas tangentes a la curva conductividad vs tiempo

Otro aspecto importante a resaltar es que cuando se aplicó el método Rancimat en los complejos de inclusión, los valores de  $t_{ind}$  obtenidos mostraron una buena reproducibilidad bajo las condiciones de medida empleadas (**Tabla 3.3**). Como puede observarse, todas las muestras presentaron un aumento en el  $t_{ind}$  a medida que disminuía la temperatura de análisis, tal como ocurre en aceites a granel (Li et al., 2019). En general, la MF mostró un  $t_{ind}$  significativamente mayor que los CI ( $p \leq 0,05$ ), con excepción del CI templado formado con 10% H/S (T-CI10), el cual presentó un  $t_{ind}$  a 98 y 80 °C similar al de la MF. Sin embargo, este comportamiento no era el esperado, ya que en la MF el ligando no está complejoado y se encontraría más expuesto al aire y, por lo tanto, se esperaría que la oxidación ocurra en un tiempo menor en comparación con los CI. Además, este comportamiento no concuerda con los resultados de TGA, los cuales mostraron que la MF se oxidaba, mientras que el CI10, CI20 y el T-CI10 eran estables (Secciones 3.3.7.1 y 2.3.15). Este resultado sugiere la posibilidad de que existan otros factores involucrados, como condiciones experimentales específicas, que podrían haber afectado el comportamiento observado. Por lo tanto, aún es necesario profundizar la investigación para determinar las causas de esta discrepancia.

En el caso de los CI obtenidos mediante el proceso con templado, el aumento de la relación H/S desde 10 hasta 20% no tuvo efecto significativo en el  $t_{ind}$  medido a 98 y 90 °C ( $p > 0,05$ ), mientras que a 80 y 70 °C dicho aumento resultó en una disminución significativa del  $t_{ind}$  ( $p \leq 0,05$ ) (**Tabla 3.3**). Esta última observación podría atribuirse a la posible existencia de una interacción más débil amilosa-PUFAs en el T-CI20, que podría disminuir su capacidad de proteger dichos ácidos grasos contra la degradación (Sección 2.3.15). En los CI no templados, el aumento en la relación H/S tampoco tuvo efecto en el  $t_{ind}$  medido a 98 y 90 °C ( $p > 0,05$ ), mientras que a 80 y 70 °C se observó un aumento significativo en el  $t_{ind}$  ( $p \leq 0,05$ ) cuando la relación H/S se incrementó desde 10 hasta 20% p/p (**Tabla 3.3**). Cuando se analizó el efecto del templado en la estabilidad de los complejos, se encontró que el  $t_{ind}$  del T-CI10 fue significativamente mayor ( $p \leq 0,05$ ) que el del CI10 bajo todas las temperaturas, lo cual no era esperado, ya que los segundos fueron obtenidos bajo condiciones más suaves de reacción. Asimismo, en el caso de los complejos formados con una relación H/S de 20%, si bien por TGA se había encontrado que el complejo templado (T-CI20) se oxidaba, mientras que el no templado (CI20) era estable, no se encontraron diferencias significativas en el  $t_{ind}$  del T-CI20 y CI20 a las distintas temperaturas evaluadas.

3.3.7.2.2. Extrapolación del tiempo de inducción a 25 °C

Los valores de  $t_{ind}$  a distintas temperaturas (70-98 °C) se ajustaron a un modelo matemático exponencial (Ecuación 3.1), para luego calcular el tiempo de inducción a 25 °C ( $t_{25}$ ) por extrapolación. En la **Figura 3.11** se muestra como ejemplo el gráfico obtenido a partir del ajuste matemático, correspondiente al CI20. Asimismo, en la **Tabla 3.4** se presentan los valores de los parámetros A y B del ajuste matemático, así como los  $t_{25}$  obtenidos para cada una de las muestras en estudio.



**Figura 3.11.** Ajuste del tiempo de inducción vs temperatura al modelo exponencial (Ecuación 3.1) para el complejo de inclusión formado sin templado con una relación hidrolizado/almidón inicial de 20% p/p

**Tabla 3.4.** Parámetros A y B obtenidos a partir del modelado exponencial del tiempo de inducción vs temperatura y tiempo de inducción extrapolado a 25 °C ( $t_{25}$ ) de la mezcla física hidrolizado/almidón y de complejos de inclusión formados con y sin templado con una relación hidrolizado/almidón de 10% y 20% p/p

Muestra	A	B	r <sup>2</sup>	t <sub>25</sub> (h)
Mezcla física	2518,31	-0,0753	0,983	383
CI 10% H/S con templado	517,39	-0,0604	0,928	114
CI 20% H/S con templado	266,89	-0,0587	0,984	62
CI 10% H/S sin templado	82,09	-0,0512	0,934	23
CI 20% H/S sin templado	1332,56	-0,0750	0,999	204

Como puede apreciarse en la **Tabla 3.4**, el  $t_{25}$  de la mezcla física fue mayor en comparación con los CI, al igual que la tendencia observada a mayores temperaturas (70-98 °C) (Sección 3.3.7.2.1). Tal como se discutió anteriormente, este comportamiento no era el esperado, ya que en la MF el ligando se encontraría más expuesto al aire y, por lo tanto, se esperaría que la oxidación ocurra más rápidamente en comparación con los CI. En los CI templados, se observó una disminución en el  $t_{25}$  con el aumento en la relación H/S desde 10 hasta 20%, sugiriendo una disminución en la estabilidad de los mismos a medida que se aumenta el contenido de hidrolizado inicial. Este comportamiento, es similar a aquel observado en el análisis termogravimétrico (Sección 2.3.15) y en el análisis de Rancimat a 70 y 80 °C (**Tabla 3.3**), y concuerda con la hipótesis planteada previamente, acerca de la posible existencia en el T-CI20 de un mayor contenido de PUFAs no complejados, atrapados físicamente en los espacios inter-hélice y no incluidos molecularmente, lo que daría como resultado una interacción más débil con la amilosa, facilitando así la accesibilidad del oxígeno y disminuyendo la capacidad de los complejos de protección contra el deterioro oxidativo (Sección 2.3.15). El efecto opuesto se encontró en el caso de los CI no templados, en los que el aumento en la relación H/S desde 10 hasta 20% generó un incremento en el  $t_{25}$  desde 23 hasta 204 h (**Tabla 3.4**). La mayor estabilidad oxidativa del CI20 en comparación al CI10 se podría atribuir a las diferencias encontradas en la composición ácida de éstos. El análisis de cromatografía gaseosa había revelado que la relación  $C_{18:2} / C_{18:3}$  del CI20 era mayor que la del CI10 (Sección 3.3.2). Por lo tanto, la menor estabilidad oxidativa del CI10 podría deberse a la mayor proporción de ácidos grasos con un mayor grado de insaturación en el CI10, en comparación con el CI20. En resumen, entre todos los CI en estudio, el CI20 fue aquel que presentó el mayor  $t_{25}$ , lo que sugiere que la formación de los complejos sin la etapa de templado y empleando una relación hidrolizado/almidón inicial de 20% p/p es aquella que favorecería la obtención de complejos con mayor capacidad para proteger a los ácidos grasos esenciales de chía contra la oxidación. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el tiempo de inducción a 25 °C es un valor teórico, que sirve sólo como una estimación rápida de la estabilidad oxidativa.

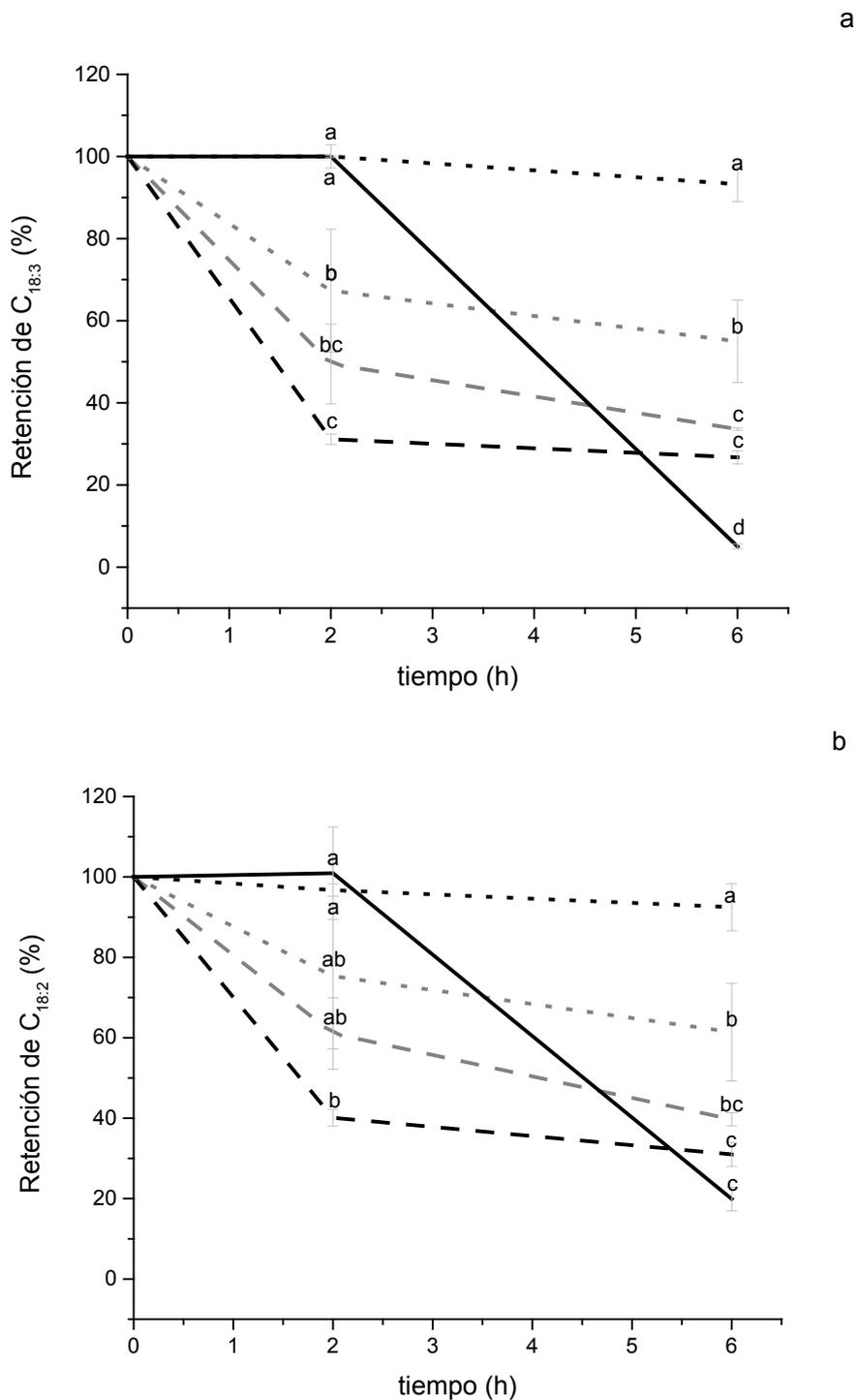
El  $t_{ind}$  obtenido por Rancimat ha mostrado, en algunos casos, una buena correlación con otros parámetros de oxidación de aceites, tales como compuestos polares totales, acidez, índice de peróxidos (Li et al., 2019), y con el tiempo de inducción medido por DSC (Bañares et al., 2019). Contrariamente, en otro trabajo se encontró que el aceite de pescado encapsulado presentaba mayor  $t_{ind}$  que el aceite a granel, pero cuando se

comparó la estabilidad midiendo la evolución de polímeros durante el almacenamiento a 30 °C, se encontró que la oxidación fue más gradual en el aceite no encapsulado que en el encapsulado (Velasco et al., 2000). En este sentido, a partir de lo expuesto en esta Sección, podríamos decir que la aplicación del método Rancimat en los CI arrojó resultados con buena reproducibilidad. Cuando se analizó el comportamiento de los CI en función del tiempo de inducción, la tendencia encontrada mostró una dependencia con la temperatura de medida y, además, dicha tendencia no en todos los casos coincidió con aquella encontrada previamente en el análisis termogravimétrico y con lo que se esperaría de acuerdo a las condiciones de formación y a las características fisicoquímicas de cada muestra en estudio. Sin embargo, cuando el comportamiento de los CI en Rancimat fue analizado en términos de la velocidad de aumento de la conductividad y del estrechamiento/aplanamiento de las curvas, se observó una mayor concordancia, considerando la cantidad de hidrolizado que podría estar retenido en los espacios inter-hélice, el tipo de interacción amilosa-PUFAs y las condiciones usadas durante la complejación.

### 3.3.7.3. Estabilidad de C<sub>18:3</sub> y C<sub>18:2</sub> a 90 °C

La medición de la retención de compuestos bioactivos se ha utilizado para evaluar su degradación bajo distintas condiciones de deterioro (T, luz, pH, O<sub>2</sub>). La misma, se ha empleado durante los últimos años para conocer la estabilidad de distintos ligandos en complejos de inclusión con amilosa (Di Marco et al., 2022), incluyendo ascorbil palmitato (Zhou et al., 2020, 2021), ácido  $\alpha$ -lipoico (Li et al., 2018), vitamina D (Liu et al., 2023), entre otros. En el presente Capítulo, se estudió la variación del contenido de los ácidos  $\alpha$ -linolénico y linoleico de chía en los CI y en la MF durante el almacenamiento a altas temperaturas (90 °C). El objetivo fue realizar un ensayo a corto plazo, sometiendo las muestras a condiciones de deterioro que aceleran la degradación de los ácidos  $\alpha$ -linolénico y linoleico, con el fin de comparar la capacidad de los diferentes sistemas para proteger estas moléculas bioactivas contra el efecto adverso de la alta temperatura. Al igual que en el ensayo de Rancimat, además de los CI sin templado (CI10 y CI20), también se incluyeron en este estudio aquellos formados con templado con 10 y 20% H/S (T-CI10 y T-CI20), para así poder conocer el efecto de la incorporación u omisión de la etapa de templado (2 h-90 °C) durante la complejación sobre la capacidad de los CI de

proteger a los ácidos grasos esenciales de chía frente al deterioro térmico. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 3.12**.



**Figura 3.12.** Retención de (a)  $C_{18:3}$  y (b)  $C_{18:2}$  durante el almacenamiento a  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  de la mezcla física hidrolizado/almidón (—) y de los complejos de inclusión no templados formados con una relación hidrolizado/almidón de 10% (···) y 20% (···) p/p y los complejos templados formados con una relación hidrolizado/almidón de 10% (- - -) y 20% (- - -) p/p. Las distintas letras indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre sistemas a cada tiempo de acuerdo al test de Tukey

En la MF, la retención de  $C_{18:3}$  y  $C_{18:2}$  se mantuvo constante al inicio del almacenamiento (**Figura 3.12 a, b**). Sin embargo, ésta disminuyó rápidamente luego de 2 h a 90 °C, alcanzando a las 6 h de tratamiento una retención de  $C_{18:3}$  y  $C_{18:2}$  de 5% y 20%, respectivamente (**Figura 3.12.a, b**). Este comportamiento es similar al que se había observado previamente en la curva de Rancimat de la MF a 90 °C (**Figura 3.10b**), en donde la conductividad se mantuvo constante al principio del calentamiento, pero luego se incrementó rápidamente a partir de las 3 h, mostrando un  $t_{ind}=3,3$  h (**Tabla 3.3**). En los CI templados y en el no templado con 10% p/p H/S, en cambio, la retención de  $C_{18:3}$  y  $C_{18:2}$  disminuyó rápidamente desde el inicio del almacenamiento, seguido de una disminución más gradual a partir de 2 h a 90 °C.

A las 2 h de almacenamiento a 90 °C, la MF exhibió una retención de  $C_{18:3}$  significativamente mayor en comparación con la mayoría de los complejos de inclusión (excepto el CI20) ( $p \leq 0,05$ ) (**Figura 3.12a**). Sin embargo, todos los CI mostraron una retención de  $C_{18:3}$  significativamente mayor a la de la mezcla física a las 6 h de almacenamiento ( $p \leq 0,05$ ). Cabe destacar que en el CI20, los niveles de  $C_{18:3}$  y  $C_{18:2}$  permanecieron prácticamente constantes durante todo el tratamiento, reteniendo más del 90% de ambos ácidos grasos esenciales después de 6 h a 90 °C (**Figura 3.12a, b**). La estabilidad de ambos ácidos grasos al final del almacenamiento fue significativamente mayor en el CI20, en comparación con los otros sistemas examinados. De acuerdo a estos resultados, el CI20 fue aquel complejo que presentó la mayor capacidad de proteger a los ácidos grasos esenciales de chía durante períodos prolongados a 90 °C. Teniendo en cuenta que los complejos no templados poseen las mismas propiedades estructurales, térmicas y morfológicas, la mayor estabilidad del CI20 en comparación con el CI10 podría atribuirse, tal como se discutió anteriormente, a su composición ácida, ya que el primero fue aquel que presentó una relación  $C_{18:2} / C_{18:3}$  mayor (Sección 3.3.2). Asimismo, es importante resaltar el comportamiento de esta muestra en particular, que también mostró un aumento progresivo de la conductividad en Rancimat a todas las temperaturas evaluadas y no sufrió oxidación en el TGA. Como se discutió en las secciones anteriores, esta mayor estabilidad podría atribuirse a las condiciones más suaves de reacción por omisión del templado durante 2 h a 90 °C, que pudieron haber protegido al hidrolizado durante la complejación y favorecido la interacción entre la amilosa con el ácido  $\alpha$ -linolénico, promoviendo así la formación de CI capaces de otorgar mayor protección a los PUFAs de chía.

### 3.4. Conclusiones parciales

- A través de la aplicación del método alcalino sin la etapa de templado se logró una efectiva formación de complejos amilosa-ácidos grasos de chía con una estructura tipo V. La omisión del templado permitió no sólo acortar el tiempo de obtención de los complejos, sino también minimizar la degradación de los ácidos grasos esenciales de chía, favoreciendo la formación de complejos con un alto contenido de ácidos grasos esenciales, incluso cuando se empleó una relación hidrolizado/almidón inicial de 10% p/p.
- El aumento de la relación H/S inicial desde 10 hasta 20% no modificó las propiedades estructurales, térmicas ni morfológicas de los complejos.
- Los resultados del TGA y del almacenamiento a 90 °C, permitieron evidenciar que el método de formación sin templado promovió la obtención de complejos con una mayor estabilidad.
- El CI20 fue el complejo que mostró mayor estabilidad, dado que no evidenció oxidación lipídica en el TGA, retuvo más del 90% de C<sub>18:3</sub> y C<sub>18:2</sub> luego del almacenamiento a 90 °C durante 6 h y las curvas de Rancimat mostraron una tendencia hacia el aplanamiento que coincidió con el comportamiento observado en los otros métodos acelerados. Por lo tanto, el CI20 fue aquel que exhibió el mejor comportamiento preliminar como sistema de vehiculización de ácidos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 de chía.
- La estabilidad de los CI determinada a través del  $t_{ind}$  medido por Rancimat, mostró resultados variables dependiendo de la temperatura de medida, los cuales no en todos los casos coincidió con los esperados. Sin embargo, cuando el comportamiento de los CI en Rancimat fue analizado en términos de la velocidad de aumento de la conductividad y del estrechamiento/aplanamiento de las curvas, se observó una mayor concordancia. Por lo tanto, aún se necesitan más investigaciones, tales como la aplicación de Rancimat en sistemas más simples de complejos monoácidos, a fin de evaluar su aplicación como método rápido para predecir la estabilidad de los complejos de inclusión.

### 3.5. Difusión de resultados

#### Publicaciones en Revistas Científicas

- Di Marco, A. E., Tomás, M. C., & Ixtaina, V. Y. (2024). Improved accelerated stability of starch-chia oil fatty acid inclusion complexes formed under mild reaction conditions. *Carbohydrate Polymers*, 121887.
- Di Marco, A. E.; Ixtaina, V. Y.; & Tomás, M. C. (2023). An oxidative stability study of amylose-hydrolyzed chia oil inclusion complexes using the Rancimat method. *Biology and Life Sciences Forum*. 25(11). MDPI

#### Presentaciones en Congresos y reuniones científicas

- Di Marco, Andrea E.; Ixtaina, Vanesa Y.; Tomas, Mabel C. An oxidative stability study of amylose-hydrolyzed chia oil inclusion complexes using the Rancimat method. V International Conference la ValSe-Food and VIII Symposium Chia-Link. Lugar: Valencia, España. 4-6 de octubre de 2023.

## CAPITULO 4

### **Aplicación de complejos de inclusión amilosa-ácidos grasos de aceite de chía en sopas instantáneas deshidratadas**

---

## Capítulo 4. Aplicación de complejos de inclusión amilosa-ácidos grasos de aceite de chía en sopas instantáneas deshidratadas

### 4.1. Introducción

El estilo de vida en los últimos años ha propiciado un aumento sustancial en la cantidad y variedad de alimentos instantáneos y listos para consumir (Hanan et al., 2020). Los alimentos instantáneos son productos que requieren muy poco esfuerzo para reconstituirlos o cocinarlos antes de su consumo (Shittu y Lawal, 2007). Entre ellos, son muy comunes los alimentos en polvo, tales como la leche, el café y cacao instantáneos, las mezclas para sopas, entre otros, los cuales representan un gran porcentaje de los alimentos de consumo masivo.

De acuerdo al Artículo 442 del Capítulo VI del Código Alimentario Argentino, con el nombre de *sopa*, se designa a “*la conserva alimenticia elaborada a base de caldos con agregado de pastas frescas o secas, sémola, féculas, grasas alimenticias, extractos de carne, hidrolizados de proteínas, harinas, almidones, extractos de levadura desamargada, carne y sus derivados, chacinados, hongos, trufas, leche y sus derivados, granos de cereales, legumbres y hortalizas, extractos vegetales, huevos, edulcorantes nutritivos, sal, especias y/o sus extractos y destilados, condimentos, y/o por la reconstitución de la mezcla equivalente de dichas materias primas deshidratadas, conforme a su modo de empleo y en los niveles requeridos según las prácticas de una buena fabricación, salvo los casos en que los límites se fijen específicamente*”. Por otra parte, se designa como *sopa deshidratada* a “*el producto preparado por deshidratación de sopas o el elaborado por mezclas de componentes deshidratados mencionados precedentemente, para ser consumido hidratado de acuerdo al modo de empleo indicado en su rotulación y responda en composición y caracteres organolépticos a las exigencias del presente Código*” (Código Alimentario Argentino, 2024a).

Desde el punto de vista tecnológico, en los alimentos instantáneos son relevantes las propiedades que presentan tanto en su estado en polvo, así como su comportamiento durante el proceso de reconstitución para su posterior consumo. Las propiedades de flujo de los polvos determinan cómo se comportará el alimento durante el transporte por tuberías en el procesamiento y también durante el almacenamiento, mientras que las propiedades instantáneas influyen en la percepción sensorial y aceptabilidad del producto.

#### 4.1.1. Propiedades de los alimentos en polvo

El conocimiento de las propiedades de los productos en polvo es relevante tanto para la industria alimentaria como para la farmacéutica. Una propiedad importante de los polvos es su *fluidéz*, que consiste en superar las interacciones superficiales entre las partículas en contacto, permitiendo que éstas se deslicen unas sobre otras (Bhandari et al., 2013). En términos generales, el flujo de un polvo se refiere al movimiento relativo de una masa de partículas, ya sea entre partículas vecinas o a lo largo de la superficie de la pared del contenedor (Peleg, 1977). Las fuerzas involucradas son gravitacionales, de fricción, de cohesión (atracción interparticular) y de adhesión (atracción partícula-pared). La fluidéz de los polvos es más compleja que la de los líquidos, ya que comúnmente es impredecible e inconsistente (Buanz, 2021). Las propiedades superficiales de las partículas influyen en las características de flujo, debido a los efectos de adhesión y cohesión. Estos efectos describen la tendencia de las partículas a adherirse a otras superficies debido a la presencia de fuerzas moleculares en la superficie (Buanz, 2021). Cuando dos superficies son similares, como en el caso de partículas del mismo polvo, el fenómeno se denomina *cohesión*, mientras que si las partículas de polvo se adhieren a distintos materiales, tales como las paredes del recipiente, se conoce como *adhesión*. En los polvos secos, las fuerzas cohesivas se pueden clasificar en fuerzas de Van der Waals, electrostáticas y magnéticas, siendo las primeras las más importantes (Bhandari et al., 2013). Cuanto menor sea el tamaño de partícula, mayor es el área superficial de contacto por unidad de masa de polvo y, por lo tanto, mayor serán las atracciones de Van der Waals entre las partículas. Otro aspecto importante de estas fuerzas atractivas es que aumentan a medida que disminuye la distancia entre partículas; así, a medida que las partículas se compactan, la atracción de Van der Waals será mucho mayor, lo que puede dar lugar a la formación de un objeto compacto, como una tableta (Bhandari et al., 2013). Otra contribución importante a la cohesión es la presencia de líquido, generalmente agua o aceites. El líquido en la superficie de las partículas aumenta el área de contacto entre ellas. Por encima de cierto contenido líquido, se formarán puentes en los puntos de contacto interparticular lo que producirá fuerzas capilares debido a la tensión superficial, resultando en la unión entre partículas. Si bien la interacción de Van der Waals se reducirá considerablemente por la presencia del líquido, las fuerzas capilares suelen ser mucho más fuertes que las fuerzas de Van der Waals (Bhandari et al., 2013).

Existen distintos parámetros que se utilizan para cuantificar la fluidez de los polvos. El *ángulo de reposo* es utilizado como un indicador de la fluidez de sólidos a granel, tales como polvos o material granulado. Es una característica relacionada con la fricción interparticular o la resistencia al movimiento entre partículas. Si bien los resultados del ángulo de reposo son muy dependientes del método aplicado para su evaluación, éste continúa siendo un parámetro ampliamente utilizado en la industria. El mismo, se basa en el principio de que una partícula comenzará a moverse (fluir) en una dirección cuando el ángulo de inclinación sea lo suficientemente grande como para superar las fuerzas de fricción (fuerzas de adhesión y/o cohesión). El objeto dejará de deslizarse cuando el ángulo de inclinación sea inferior al necesario para superar dichas fuerzas. Para los polvos, el ángulo de reposo es una indicación de la cohesión (o fuerzas internas) de las partículas (Buanz, 2021).

Las partículas sólidas pueden tener huecos o poros, y el volumen dentro de estos poros se denomina volumen intra-partícula, mientras que el volumen de los huecos entre diferentes partículas se llama volumen inter-partícula (Buanz, 2021). Cuando un material en polvo es vertido libremente en un cilindro sin la aplicación de compactación, presentará una densidad determinada. La *densidad aireada* ( $\delta_a$ ), también conocida como densidad aparente o volumétrica, se define como la masa de un volumen determinado de partículas dividida por dicho volumen, el cual incluye el volumen de la fracción sólida de las partículas más los volúmenes intra e inter-particulares. Si se aplica una vibración sobre el cilindro que contiene el polvo, las partículas tenderán a compactarse, ocupando un volumen menor que el inicial, incrementándose la densidad. La *densidad compactada* ( $\delta_c$ ) se obtiene a partir del cociente entre la masa inicial de partículas y el volumen del polvo compactado. Estos dos parámetros de  $\delta_a$  y  $\delta_c$  se relacionan a través del *índice de Carr* o índice de compresibilidad (IC) y del *índice o relación de Hausner* (IH), los cuales se definen de acuerdo a las ecuaciones 4.1 y 4.2:

$$IC = \frac{(\delta_c - \delta_a)}{\delta_c} \times 100 \quad \text{Ecuación 4.1}$$

$$IH = \frac{\delta_c}{\delta_a} \quad \text{Ecuación 4.2}$$

Al igual que el ángulo de reposo, el IC y el IH proporcionan una medida del carácter de flujo de los polvos (**Tabla 4.1**):

**Tabla 4.1.** Comportamiento de flujo de los polvos según los valores de ángulo de reposo e índices de Hausner y de Carr (US Pharmacopeia, 2024)

Comportamiento de flujo	Ángulo de reposo (°)	Índice de Hausner	Índice de Carr (%)
Excelente	25-30	1,00-1,11	≤10
Bueno	31-35	1,12-1,18	11-15
Aceptable	36-40	1,19-1,25	16-20
Regular	41-45	1,26-1,34	21-25
Pobre	46-55	1,35-1,45	26-31
Muy pobre	56-65	1,46-1,59	32-37
Extremadamente pobre	>66	>1,60	>38

Los polvos más cohesivos tienen mayores fuerzas de atracción superficial que les permiten superar la gravedad y hacer que las partículas se mantengan juntas alrededor de los espacios vacíos. Esto crea mayores huecos dentro del producto a granel al ser vertido por primera vez, lo que produce un mayor volumen (o una menor densidad aireada) (Bhandari et al., 2013). Cuando el polvo es golpeado, se aplica una fuerza adicional que supera estas atracciones cohesivas y provoca que las partículas caigan en los espacios vacíos, reduciendo así el volumen del polvo y aumentando su densidad aparente.

#### 4.1.2. Propiedades instantáneas de los alimentos en polvo

La preparación de los alimentos en polvo comúnmente se realiza a través de la rehidratación con agua o leche, y su reconstitución debe ser rápida y completa. El proceso de reconstitución consiste en cuatro pasos: humectación, hundimiento, dispersión y disolución (Bhandari et al., 2013). La secuencia seguida en la reconstitución del alimento en polvo depende también de la naturaleza y del uso final deseado del producto (Shittu y Lawal, 2007). Idealmente, el polvo se humecta rápida y completamente, se hunde en lugar de flotar, se dispersa rápidamente y se disuelve en un corto período de tiempo, sin la formación de grumos. Si esto ocurre, el alimento instantáneo posee la calidad deseada

(Oostveen et al., 2015). Estas etapas a menudo se superponen en el tiempo, haciendo que la observación de cada fase de forma independiente sea muy dificultosa (Bhandari et al., 2013). Ciertos atributos, tales como humectabilidad, dispersabilidad y solubilidad han sido usados frecuentemente para caracterizar los alimentos en polvo instantáneos (Shittu y Lawal, 2007).

La humectación de un polvo es el proceso en el que la fase gaseosa en la superficie de un sólido es reemplazada por la fase líquida y está determinada por la tensión interfacial entre la superficie y el líquido. La *humectabilidad* se define como la capacidad de las partículas de polvo para superar la tensión superficial en la interfaz entre el sólido y el líquido a una temperatura específica, y comúnmente se mide como el tiempo necesario para que el polvo se humedezca completamente (Bhandari et al., 2013). La humectabilidad depende principalmente del tamaño de partícula, del ángulo de contacto, de la porosidad del polvo y del tipo de solvente.

La *hundibilidad* se define como la capacidad de las partículas de hundirse debajo de la superficie del líquido, lo cual depende del tamaño y de la densidad de las partículas (Bhandari et al., 2013). Dado que generalmente se considera que un polvo está humedecido desde el momento en que comienza a hundirse en la solución, los términos hundibilidad y humectabilidad son a menudo intercambiables (Bhandari et al., 2013).

Cuando las partículas aglomeradas se hunden en la solución, éstas se rompen gradualmente y comienzan a dispersarse en el medio líquido como partículas individuales (Bhandari et al., 2013). La *dispersabilidad* es la facilidad con la que los polvos se distribuyen como partículas individuales en el medio líquido (Shittu y Lawal, 2007). La velocidad de dispersión indica si un alimento en polvo puede ser categorizado como instantáneo, presentando una buena dispersabilidad y humectabilidad. (Bhandari et al., 2013). Una mala dispersabilidad, por el contrario, puede observarse a través de la formación de grumos visiblemente grandes, que luego podrían depositarse en el fondo del recipiente (Bhandari et al., 2013).

La *solubilidad* es considerada como una propiedad clave de la calidad de la reconstitución en el proceso de disolución del polvo. La mayoría de las funcionalidades físicas de los alimentos en polvo se basan en si pueden disolverse completamente para formar una solución homogénea, ya que cualquier componente no disuelto podría provocar pérdidas de sólidos y problemas en el procesamiento posterior (Bhandari et al., 2013).

#### 4.1.3. Propiedades reológicas

Las propiedades reológicas de un alimento son un aspecto relevante, ya que nos permiten conocer su comportamiento cuando el mismo es sometido a distintos esfuerzos, lo cual influye en sus propiedades sensoriales y funcionales. Cuando un líquido se encuentra entre dos placas separadas por una distancia ( $d$ ), estando la placa inferior inmóvil y la superior se desliza aplicando un *esfuerzo de corte* (*shear stress*,  $\sigma$ ) a una determinada velocidad, el líquido comenzará a fluir, formándose un *gradiente de velocidad* (*shear rate*,  $\dot{\gamma}$ ). La relación entre  $\sigma$  y  $\dot{\gamma}$ , permite clasificar a los fluidos en Newtonianos o no Newtonianos. En el primer caso,  $\sigma$  y  $\dot{\gamma}$  se relacionan de manera lineal, y la pendiente de la recta (*viscosidad*,  $\eta$ ) es constante e independiente del gradiente de velocidad. En el caso de los fluidos no newtonianos, dicha relación no es lineal. En estos casos, se habla de viscosidad aparente ( $\eta_{app}$ ), ya que la misma varía con  $\dot{\gamma}$ . Si la  $\eta_{app}$  disminuye a medida que aumenta  $\dot{\gamma}$ , se habla de un comportamiento pseudoplástico, mientras que, si se observa un aumento, se trata de un comportamiento dilatante. La relación entre  $\sigma$  y  $\dot{\gamma}$  se describe matemáticamente a través de la ley de potencia o de Ostwald (**Ecuación 4.3**):

$$\sigma = k \times \dot{\gamma}^n$$

**Ecuación 4.3**

Donde,  $k$  es el índice de consistencia y  $n$  es el índice de comportamiento de flujo.

Para los fluidos Newtonianos,  $k = \eta$  y  $n = 1$ ; en un sistema pseudoplástico,  $0 < n < 1$ ; mientras que en un sistema dilatante,  $n > 1$ .

#### 4.1.4. Incorporación de complejos de inclusión en sopas instantáneas

En el Artículo 1363 del Capítulo XVII del Código Alimentario Argentino se designa como *alimentos fortificados* a “*aquellos alimentos en los cuales la proporción de proteínas y/o aminoácidos y/o vitaminas y/o sustancias minerales y/o ácidos grasos esenciales es superior a la del contenido natural medio del alimento corriente, por haber sido suplementado significativamente. La porción del alimento fortificado deberá aportar entre un 20% y 50% para vitaminas liposolubles y minerales y entre un 20% y 100% para vitaminas hidrosolubles de los Requerimientos Diarios Recomendados*” (Código Alimentario Argentino, 2024b). Debido al consumo masivo de sopas

instantáneas y su fácil preparación, resulta de interés la mejora de sus propiedades nutricionales mediante la incorporación de ácidos grasos esenciales  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6. Teniendo en cuenta que el almidón es uno de los ingredientes mayoritarios comúnmente utilizados en la formulación de este tipo de alimentos, se considera que los complejos de inclusión desarrollados en el presente trabajo podrían ser adicionados como ingrediente funcional, actuando como vehículos de ácidos grasos de chía, dada su naturaleza a base de almidón. Sin embargo, es necesario conocer cómo interactúan estos complejos con la matriz del alimento y el efecto de su incorporación sobre las propiedades funcionales, reológicas y sensoriales del producto final, a fin de desarrollar alimentos que presenten las propiedades deseadas y buena aceptabilidad por parte del consumidor.

En los Capítulos anteriores, se estudió el efecto de distintas variables (tiempo y temperatura de templado, relación másica ligando/almidón, aplicación de tratamiento de ultrasonido y omisión de la etapa de templado) sobre las propiedades de complejos amilosa-ácidos grasos de chía. Los resultados obtenidos mostraron que el complejo formado sin la aplicación de templado y con una relación hidrolizado/almidón inicial de 20% p/p (CI20) fue aquel que exhibió el mejor comportamiento preliminar como sistema de vehiculización de ácidos grasos de chía. Por este motivo, el CI20 fue seleccionado para evaluar su incorporación en una matriz alimentaria.

El objetivo del presente Capítulo es fortificar una sopa instantánea comercial con ácidos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 a través de la adición de complejos de inclusión amilosa-ácidos grasos de chía, evaluando las propiedades fisicoquímicas y de flujo de los polvos, su comportamiento durante la reconstitución, las propiedades reológicas, sensoriales y digestibilidad *in vitro*.

## 4.2. Materiales y métodos

### 4.2.1. Materiales

Los materiales utilizados para la formación de los complejos fueron los descritos en la Sección 3.2.1. Las enzimas  $\alpha$ -amilasa salival humana (A1031, Tipo XIII-A, 941 U/mg de proteína), pepsina gástrica porcina (P7012, 2702 U/mg de proteína) y pancreatina porcina (P7545, 6 unidades de tripsina/mg) y las sales biliares bovinas (0,67 mmol de sales biliares/g de bilis) fueron adquiridas en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

En el presente Capítulo, se utilizó una sopa instantánea deshidratada comercial Knorr Quick Light Zapallo (Unilever de Argentina S.A., Buenos Aires, Argentina), compuesta por los siguientes ingredientes: almidón de papa, vegetales (zapallo, cebolla), sal, jarabe de glucosa, azúcar, aceites vegetales, maltodextrina, pimienta negra, caseinato de sodio, resaltadores del sabor (glutamato monosódico, inosinato disódico, guanilato disódico), aromatizantes naturales, espesante (goma xántica), colorante (annato).

### 4.2.2. Preparación de las premezclas en polvo

A partir de los resultados obtenidos en el Capítulo 3, se seleccionaron aquellos complejos formados con una relación hidrolizado/almidón inicial de 20% p/p, sin la aplicación de tratamiento térmico (CI20). Dichos complejos, se obtuvieron de acuerdo al protocolo descrito en la Sección 3.2.4. Las premezclas de sopa en polvo (sin reconstituir), se prepararon mezclando en seco la sopa deshidratada comercial con los complejos de inclusión en las proporciones 15 y 30% p/p (g CI/100 g premezcla). Adicionalmente, para la evaluación de la variación de color de las premezclas en polvo durante el almacenamiento a 40 °C, se incluyó como control una premezcla conteniendo una mezcla física hidrolizado/almidón (MF) (en lugar de complejo de inclusión). Esta premezcla se preparó mezclando en seco la sopa deshidratada comercial con la MF en una proporción 30% p/p (g MF/100 g premezcla). La mezcla física, se obtuvo de acuerdo al protocolo descrito en la Sección 3.2.6.

Las premezclas se rotularon como:

- S0: sopa instantánea deshidratada comercial
- S15: premezcla de sopa instantánea deshidratada comercial con 15% p/p de complejos de inclusión
- S30: premezcla de sopa instantánea deshidratada comercial con 30% p/p de complejos de inclusión
- S30MF: premezcla de sopa instantánea deshidratada comercial con 30% p/p de mezcla física hidrolizado/almidón

#### 4.2.3. Medición de la actividad acuosa ( $a_w$ )

Para la medición de la  $a_w$  de las premezclas en polvo se usó un equipo AquaLab Series 4 TEV (Decagon Devices Inc., WA, EE. UU.) (**Figura 4.1**) con sensor de capacitancia. Para ello, las muestras se colocaron en los portamuestras plásticos de manera uniforme, asegurando que cubran toda la base y se registró la actividad acuosa a 25 °C. Los resultados se expresaron como el promedio de al menos tres determinaciones.



**Figura 4.1.** Equipo AquaLab Series 4 TEV usado para la medición de la actividad acuosa de las premezclas en polvo

#### 4.2.4. Contenido de humedad

El contenido de humedad de las premezclas en polvo se determinó por gravimetría. Para ello, se registró el peso de placas de Petri vacías y sobre éstas se pesó aproximadamente 1 g ( $\pm 0.0001$  g) de muestra en polvo usando una balanza granataria Ohaus PA214 (Ohaus Corporation, NJ, EE. UU.). Las placas se cubrieron con papel aluminio perforado y se colocaron en una estufa a 70 °C bajo vacío (25 mmHg) hasta peso constante. Luego, se colocaron en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente y se registró el peso de las muestras secas. El contenido de humedad (%) se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{(m_i - m_s)}{(m_i - m_p)} \times 100 \quad \text{Ecuación 4.4}$$

Donde,  $m_i$  es la masa de la placa con la muestra inicial (g),  $m_s$  es la masa de la placa con la muestra luego del secado (g) y  $m_p$  es la masa de la placa vacía (g).

#### 4.2.5. Contenido de C<sub>18:3</sub> y C<sub>18:2</sub> de las premezclas de sopa

Se llevó a cabo la determinación del contenido de ácidos  $\alpha$ -linolénico y linoleico en las premezclas de sopa (S0, S15 y S30), con el objetivo de confirmar la presencia de ácidos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 de chía en las sopas luego de la adición de los complejos. Para ello, se pesaron ~0,07-0,14 g de cada muestra en un tubo con tapa a rosca y se adicionaron 4 mL de HCl:metanol (10% v/v). El tubo se selló y se calentó durante 20 min a 100 °C. Luego, se agregaron 2 mL de agua Milli-Q y 1 mL de hexano grado HPLC y se centrifugó durante 15 min a 1610xg usando una centrifuga Rolco CM 2036 (Rolco SRL, Buenos Aires, Argentina). La fracción de hexano superior se filtró (nylon, 25 mm x 0,22  $\mu$ m) y se cuantificaron los FAMES presentes en dicha fracción usando un cromatógrafo gaseoso Agilent Technologies 7890 A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.), empleando las mismas condiciones de separación descriptas en la Sección 2.2.3.3. El contenido de C<sub>18:3</sub> y C<sub>18:2</sub> (expresado como g de C<sub>18:3</sub> o C<sub>18:2</sub> /100 g de premezcla) se midió a partir de las áreas de pico de C<sub>18:3</sub> y C<sub>18:2</sub>, respectivamente, empleando curvas de calibración hechas con estándares externos de ésteres metílicos de ácidos  $\alpha$ -linolénico y linoleico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) disueltos en hexano grado HPLC.

#### 4.2.6. Color

El color de las premezclas en polvo se determinó mediante el sistema CIELab. Para ello, las muestras se colocaron en un recipiente circular de aproximadamente 4 cm de diámetro y se registraron los valores de L\*, a\* y b\* con un colorímetro Konica Minolta CR-400 (Konica Minolta Inc., Japón). La coordenada L\* representa la luminosidad y varía desde 0 (negro) hasta 100 (blanco). El parámetro a\* indica las tonalidades que van desde el verde (valores negativos) hasta el rojo (positivos), mientras que b\* representa los tonos azules (valores negativos) y amarillos (valores positivos). Los resultados se expresaron como el promedio de al menos cuatro determinaciones.

Adicionalmente, las premezclas en polvo (S0, S15, S30 y S30MF) se colocaron en frascos de vidrio color caramelo tapados y sellados con parafilm y se almacenaron en una cámara a 40 $\pm$ 2 °C. Se midió el color luego de 90 días de almacenamiento y se calculó la variación de color ( $\Delta E$ ) de las premezclas al inicio y al final del ensayo de almacenamiento a 40 $\pm$ 2 °C, usando la siguiente ecuación:

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2}$$

**Ecuación 4.5**

Donde,  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  son los parámetros de color al final del almacenamiento, mientras que  $L_0^*$ ,  $a_0^*$  y  $b_0^*$  corresponden a los valores de estos parámetros al tiempo inicial.

#### 4.2.7. Densidad aireada y densidad compactada

Para determinar la densidad aireada ( $\delta_a$ ), se transfirieron 5 g de premezcla en polvo a una probeta graduada de 25 mL y se midió el volumen ocupado (Marinopoulou et al., 2020). Para la medición de la densidad compactada ( $\delta_c$ ), el polvo fue comprimido mediante 30 golpes uniformes sobre una superficie plana, registrando el volumen correspondiente (Marinopoulou et al., 2020). Las medidas se hicieron por triplicado, y la densidad aireada ( $\delta_a$ ) y compactada ( $\delta_c$ ) (g/mL) se calcularon usando las siguientes ecuaciones:

$$\delta_a = \frac{m}{v_a}$$

**Ecuación 4.6**

$$\delta_c = \frac{m}{v_c}$$

**Ecuación 4.7**

Donde,  $m$  es la masa de premezcla (g), mientras que  $v_a$  y  $v_c$  corresponden al volumen de premezcla aireada y compactada (mL), respectivamente.

A su vez, los valores de  $\delta_c$  y  $\delta_a$  se utilizaron para cuantificar la compresibilidad y cohesividad de las premezclas a partir del *Índice de Carr* (IC) y del *Índice de Hausner* (IH), respectivamente, usando las Ecuaciones 4.1 y 4.2.

#### 4.2.8. Ángulo de reposo

El ángulo de reposo de las premezclas en polvo se midió de acuerdo al protocolo descrito por Deladino et al. (2013). Para ello, se utilizó un dispositivo que consta de un cilindro giratorio de acrílico transparente graduado (**Figura 4.2**). En el mismo, se vertió

la muestra libremente (sin compactar) hasta llenar la mitad del cilindro, y luego se niveló la superficie. Posteriormente, se giró el dispositivo hasta que las partículas comenzaron a deslizarse, momento en el que se tomó una lectura. Luego, se giró la cámara en dirección opuesta hasta que las partículas se deslizaron y se realizó una segunda lectura. El valor medio de ambas lecturas correspondió al ángulo de reposo de la muestra. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.



**Figura 4.2.** Dispositivo utilizado para la medición del ángulo de reposo en polvos

#### 4.2.9. Dispersabilidad

La dispersabilidad de las premezclas en polvo se midió de acuerdo al protocolo de Klinkesorn et al. (2005), con algunas modificaciones. Para ello, se adicionaron  $\sim 0,3$  mg de polvo/mL de agua destilada a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  dentro de la cámara de agitación de un instrumento de difracción láser Malvern Mastersizer Hydro 2000G (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido), con agitación a 2000 rpm durante 300 s. La dispersabilidad se evaluó registrando el cambio en el oscurecimiento (% fracción de luz bloqueada o dispersada por las partículas cuando se introdujo la muestra) en función del tiempo de agitación. Se calculó el promedio del oscurecimiento durante los últimos 100 s de agitación a fin de obtener el valor de oscurecimiento final alcanzado. Se calculó el tiempo de dispersión como aquel necesario para alcanzar el 90% de dicho valor promedio. Los resultados se expresaron como el promedio de al menos dos determinaciones.

#### 4.2.10. Distribución de tamaño de partículas y diámetros medios de las premezclas reconstituidas

La distribución de tamaño de partícula y el diámetro  $D$  [4, 3] (De Broucker) de las distintas premezclas reconstituidas se determinaron mediante la técnica de dispersión estática de la luz. Se utilizó un instrumento de difracción láser Malvern Mastersizer Hydro 2000G (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Para ello, se colocaron ~0,3 mg de premezcla en polvo/mL de agua destilada a 40 °C en la cámara y se agitó a 2000 rpm. Luego de 300 s de agitación, se registró la distribución de tamaño de partícula (% en volumen) y el diámetro medio de partícula ( $D$  [4, 3]). Las mediciones se realizaron por duplicado.

#### 4.2.11. Solubilidad

Para la medición de la solubilidad de las sopas, se incorporaron 10 mL de agua a 100 °C a ~0,465 g de premezcla y se agitó durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 1610xg durante 10 min usando una centrífuga Rolco CM 2036 (Rolco SRL, Buenos Aires, Argentina). El sobrenadante se transfirió a una placa de Petri previamente tarada y se secó en estufa a 70 °C bajo vacío (25 mmHg) hasta peso constante. La masa de sólido seco obtenida se utilizó para calcular la solubilidad, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Solubilidad (\%)} = \frac{m_s}{m_i} \times 100 \quad \text{Ecuación 4.8}$$

Donde,  $m_s$  es la masa seca de sobrenadante (g) y  $m_i$  es la masa de muestra inicial (g).

#### 4.2.12. Propiedades reológicas

Las mediciones reológicas de las sopas reconstituidas se llevaron a cabo utilizando un reómetro Discovery HR20 (TA Instruments, New Castle, DE, EE. UU.), equipado con un sistema de platos paralelos de superficie lisa (40 mm de diámetro), con una distancia entre platos “*gap*” de 1,0 mm, a temperatura controlada mediante un baño termostático

externo. Las muestras se prepararon siguiendo las instrucciones indicadas en el envase. Para ello, se adicionaron 200 mL de agua a 100 °C a 9,3 g de premezcla en polvo y se mantuvieron en agitación durante 30 s. Para el ensayo rotacional, las muestras se colocaron en el espacio entre los platos y se dejaron reposar durante 1 min a la temperatura de medida (25 °C). Luego, se incrementó el gradiente de velocidad ( $\dot{\gamma}$ ) desde 0 hasta 500 s<sup>-1</sup> durante 120 s, se mantuvo a 500 s<sup>-1</sup> durante 1 min, seguido de un descenso hasta 0 s<sup>-1</sup> durante 120 s. Se registró el esfuerzo de corte ( $\sigma$ ) en función del gradiente de velocidad. Los resultados obtenidos se analizaron usando el software TRIOS (TA Instruments, New Castle, DE, EE. UU.). Se determinó la viscosidad aparente ( $\eta_{app}$ ) a un gradiente de velocidad de 500 s<sup>-1</sup>. Adicionalmente, las curvas de flujo de gradiente de velocidad ascendente se ajustaron a la ley de Ostwald (Ecuación 4.3) utilizando el software OriginPro 9.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EE. UU.).

#### 4.2.13. Evaluación sensorial

La evaluación sensorial de las sopas se realizó con 42 panelistas no entrenados. Se empleó una prueba de diferencia con un control, con el objetivo de determinar si existen diferencias entre las muestras S15 y S30 con respecto al control (S0) y estimar el tamaño de dichas diferencias. Las sopas se prepararon a partir de las distintas premezclas en polvo (S0, S15 y S30), siguiendo las instrucciones del envase (ver Sección 4.2.11) y se presentaron simultáneamente en vasos identificados con códigos aleatorios de tres dígitos, mientras que el control se identificó con la letra “K” (**Figura 4.3**).



**Figura 4.3.** Presentación de las muestras a los evaluadores durante el análisis sensorial

Se pidió a los panelistas que evaluaran la apariencia, el aroma y la consistencia de las muestras problema e indicaran la magnitud de la diferencia con respecto a la muestra control, utilizando una escala verbal estructurada (**Figura 4.4**). En las instrucciones se aclaró que el control podría estar incluido entre las muestras problema. Para el procesamiento de los datos, se asignó un valor de 0 a 6 a la escala verbal, donde 0 corresponde a ninguna diferencia y 6 a diferencias muy grandes. Seguidamente, se realizó un ensayo de ordenamiento (*ranking test*) según la preferencia. Para ello, se pidió a los panelistas que ordenen las muestras problema en forma decreciente de acuerdo a su preferencia, desde mayor a menor preferencia (**Figura 4.4**).

PRUEBA DE DIFERENCIA CON UN CONTROL

NOMBRE:

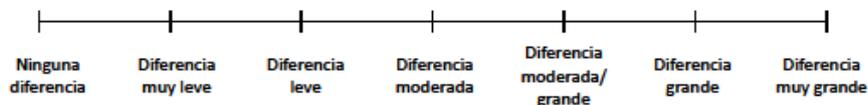
EVALUADOR N°:

FECHA:

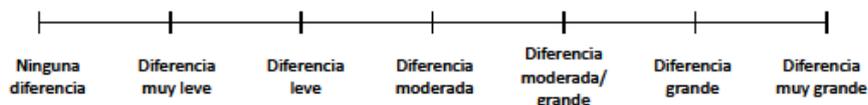
1. Usted ha recibido 4 muestras, una codificada con la letra K (control) y otras 3 rotuladas con tres dígitos.
  2. Deberá evaluar la apariencia, el aroma y la consistencia (solo visualmente, no ingerir) e indicar la magnitud de la diferencia con respecto al control, marcando con una X en la escala.
- Recuerde que puede haber una o más muestras iguales al control.

**APARIENCIA:**

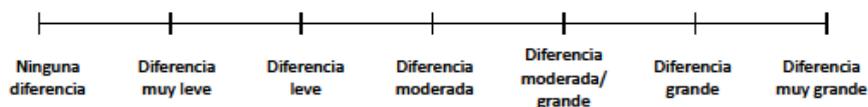
MUESTRA N° 482



MUESTRA N° 731

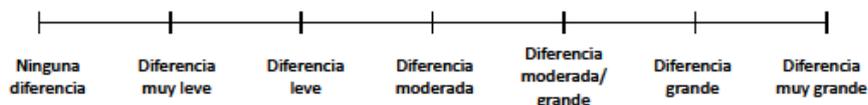


MUESTRA N° 589

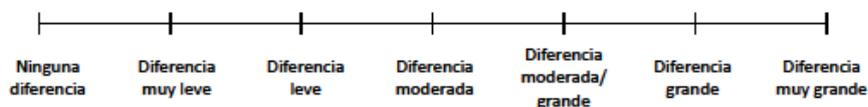


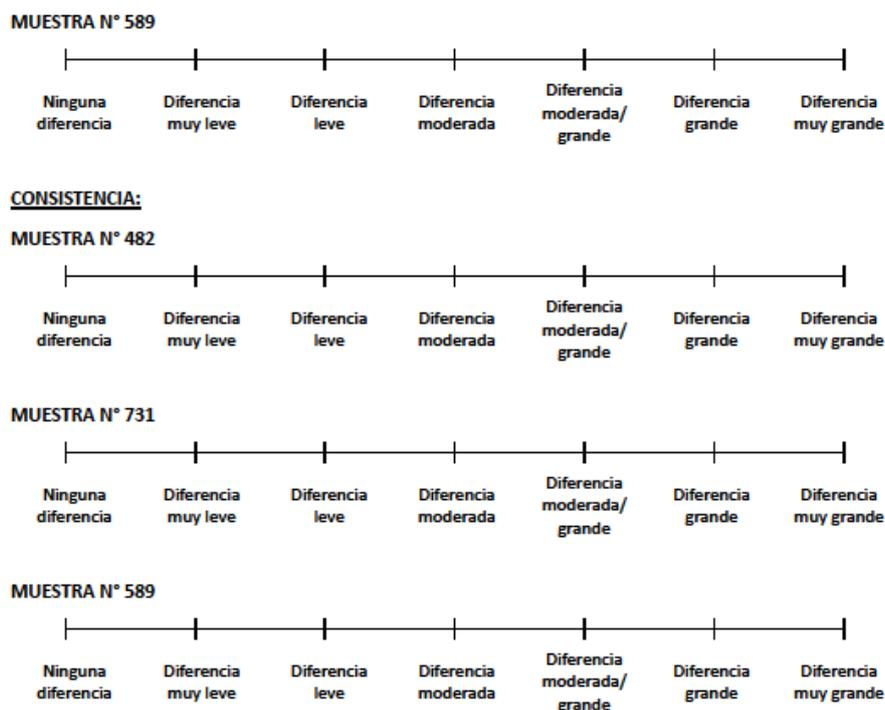
**AROMA:**

MUESTRA N° 482



MUESTRA N° 731





**PRUEBA DE PREFERENCIA**

Por favor, ordene las muestras en forma decreciente según su preferencia global **(No ingerir la muestra)**.

PREFERENCIA	Muestra N°
Mayor preferencia	
Menor preferencia	

Comentarios:.....  
 .....

**Figura 4.4.** Planilla utilizada por los evaluadores durante el análisis sensorial de las sopas

4.2.14. Ensayo de digestibilidad *in vitro*

El estudio de la digestibilidad *in vitro* se llevó a cabo con el objetivo de analizar tanto la liberación del ligando de mayor interés (ácido  $\alpha$ -linolénico), así como la degradación del material complejante (almidón).

4.2.14.1. Estudio de la liberación de ácido  $\alpha$ -linolénico durante la digestión *in vitro*

Este ensayo se llevó a cabo tanto con la premezcla de sopa que contenía un 30% p/p de complejo de inclusión (S30, 0,46 g) como con el complejo de inclusión por separado (CI20, 0,14 g). El objetivo fue evaluar el efecto de la matriz alimentaria sobre la digestibilidad de los complejos. Ambas muestras en polvo fueron resuspendidas en 10 mL de agua a 100 °C, agitando constantemente hasta alcanzar la temperatura ambiente.

La simulación de la digestión *in vitro* se llevó a cabo siguiendo el protocolo estandarizado INFOGEST 2.0 (Brodkorb et al., 2019), utilizando una alícuota de 4 mL de cada sistema estudiado. Los fluidos simulados oral, gástrico e intestinal (SSF, SGF y SIF, por sus siglas en inglés), se prepararon conforme a dicho protocolo, a partir de soluciones iniciales de electrolitos (solución stock). Estas soluciones se mezclaron en las proporciones adecuadas para alcanzar las concentraciones finales especificadas para cada fluido (**Tabla 4.2**).

**Tabla 4.2.** Concentraciones de electrolitos en las soluciones stock iniciales y en los fluidos salival (SSF), gástrico (SGF) e intestinal (SIF) simulados

Sal	Concentración de solución stock		SSF (pH 7)	SGF (pH 3)	SIF (pH 7)
	(g/L)	(M)	Concentración final (mM)	Concentración final (mM)	Concentración final (mM)
KCl	37,3	0,5	15,1	6,9	6,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68	0,5	3,7	0,9	0,8
NaHCO <sub>3</sub>	84	1,0	13,6	25	85
NaCl	117	2,0	-	47,2	38,4
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	30,5	0,15	0,15	0,12	0,33
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	48	0,5	0,06	0,5	-
HCl	-	6,0	1,1	15,6	8,4

Las muestras se sometieron a las fases oral, estomacal e intestinal, las cuales se detallan a continuación:

*Fase oral:* se mezclaron 4 mL de cada muestra con 3,2 mL de fluido simulado salival precalentado a 37 °C, 20  $\mu$ L de una solución de CaCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> y 400  $\mu$ L de una

solución de  $\alpha$ -amilasa salival humana hasta alcanzar una concentración final de 1,5 mM y 75 U/mL, respectivamente. Se adicionó agua destilada hasta alcanzar un volumen final de 8 mL. La mezcla se incubó durante 2 min a 37 °C con agitación constante a 70 rpm usando un agitador orbital 3D SK-D3309-Pro (DLAB Scientific, Johor, Malasia).

*Fase gástrica:* el bolo proveniente de la fase oral (8 mL) se mezcló con 6,4 mL de fluido gástrico simulado precalentado y se ajustó el pH hasta 3,0 con HCl 5 M. Luego, se adicionaron 2  $\mu$ L de una solución de  $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$  y 400  $\mu$ L de pepsina porcina hasta alcanzar una concentración final de 0,15 mM y 2000 U/mL, respectivamente. Se ajustó nuevamente el pH hasta 3,0 y se adicionó agua destilada hasta completar 16 mL. La mezcla se incubó durante 2 h a 37 °C con agitación constante a 70 rpm.

*Fase intestinal:* el quimo gástrico (16 mL) se mezcló con 6,8 mL de fluido simulado intestinal precalentado y se ajustó el pH hasta 7,0 con NaOH 5 M. Luego, se adicionaron 2,0 mL de sales biliares bovinas y 4,0 mL de una solución de pancreatina porcina (ambas soluciones preparadas en fluido simulado intestinal), hasta obtener una concentración final de 10 mM y 100 U/mL (actividad tripsina), respectivamente. Adicionalmente, se incorporaron 16  $\mu$ L de  $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$  hasta alcanzar una concentración final de 0,6 mM. Se ajustó el pH hasta 7,0 y se adicionó agua destilada hasta obtener un volumen final de 32 mL. La mezcla resultante se incubó durante 2 h a 37 °C con agitación constante a 70 rpm.

*Separación de la fase micelar:* el digesto obtenido luego de la fase intestinal se centrifugó a 4000xg durante 30 min a 25 °C usando una centrífuga Sigma 3-18 kg (Sigma Laborzentrifugen, Alemania) para separar el material soluble e insoluble. Luego, la fase micelar superior se separó, se fraccionó y almacenó a -20 °C hasta su análisis posterior.

*Control:* el control del ensayo de digestión *in vitro* se llevó a cabo empleando para cada muestra (S30 y CI20) el mismo protocolo descrito anteriormente, pero reemplazando las soluciones de enzimas por agua destilada.

*Extracción y cuantificación del ácido  $\alpha$ -linolénico liberado:* se midió la cantidad de ácido  $\alpha$ -linolénico liberado al finalizar la etapa intestinal. Para ello, se tomó una alícuota (10 mL) de la fase micelar, se adicionaron 5 mL de hexano y la mezcla se agitó durante 2 min usando un vortex. Luego, se centrifugó durante 10 min a 1610xg utilizando una centrífuga Rolco CM 2036 (Rolco SRL, Buenos Aires, Argentina). Posteriormente, se separó la fase orgánica superior, se colectó en un tubo con tapa a rosca y el solvente se evaporó con corriente de nitrógeno gaseoso. Luego, se adicionaron 4 mL de una mezcla HCl/metanol (10% v/v). El tubo se selló y se calentó a 100 °C durante 10 min. Una vez

enfriado, se adicionaron 2 mL de agua Milli-Q y 1 mL de hexano grado HPLC (95% de pureza) y se centrifugó durante 15 min a 1610xg usando una centrífuga Rolco CM 2036 (Rolco SRL, Buenos Aires, Argentina). Los FAMES presentes en la fracción de hexano se cuantificaron usando un cromatógrafo gaseoso Agilent Technologies 7890 A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.), empleando las condiciones de separación descritas en la Sección 2.2.3.3. El contenido de C<sub>18:3</sub> se determinó utilizando un estándar externo de éster metílico de ácido  $\alpha$ -linolénico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.).

#### 4.2.14.2. Degradación del almidón durante la digestión *in vitro*

En el ensayo de digestión del almidón, se analizaron tres muestras: el complejo de inclusión (CI20, 0,14 g), la premezcla de sopa con un 30% p/p de complejo de inclusión (S30, 0,46 g) y la sopa comercial sin complejo (S0, 0,46 g), dado que la misma contiene almidón en su formulación (ver Sección 4.2.1). Tanto la preparación de las muestras, así como las fases oral, gástrica e intestinal se realizaron de acuerdo al procedimiento detallado en la Sección anterior (4.2.14.1), pero omitiendo la enzima  $\alpha$ -amilasa salival en la fase oral, de acuerdo a la recomendación del protocolo INFOGEST 2.0 (Brodkorb et al., 2019). Durante las fases gástrica e intestinal, se tomaron alícuotas (2 mL) a distintos tiempos de reacción, las cuales se almacenaron a -20 °C hasta su análisis posterior.

*Evaluación de la degradación del almidón mediante el ensayo de ácido dinitrosalicílico (DNS):* los azúcares reductores liberados durante la digestión *in vitro* se determinaron utilizando el método DNS, recomendado en el método INFOGEST 2.0 (Brodkorb et al., 2019). En el presente trabajo, se empleó una adaptación del método DNS de Tarazi Riess et al. (2022). Las alícuotas extraídas a los distintos tiempos de digestión se centrifugaron a 10000xg durante 10 min. Luego, se mezclaron 120  $\mu$ L de cada sobrenadante con 120  $\mu$ L de reactivo DNS (que consiste en ácido 3,5-dinitrosalicílico al 1% p/v, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> al 0,05% p/v y NaOH al 1% p/v en agua destilada). La mezcla se agitó usando un vortex y se incubó a 90 °C durante 15 min para permitir el desarrollo del color marrón rojizo. Posteriormente, se adicionaron 30  $\mu$ L de sal de Rochelle (solución de tartrato de sodio y potasio al 40 % p/v) para estabilizar el color. Luego de enfriar hasta temperatura ambiente, se colocaron 100  $\mu$ L de cada muestra en una placa de 96 pocillos y se registró la absorbancia a 540 nm. A partir de los valores de absorbancia obtenidos, se calculó la concentración de maltosa usando una curva de calibración, realizada con soluciones de maltosa entre 0,05 y 0,80% p/v.

#### 4.2.15. Análisis estadístico

Los resultados experimentales se analizaron según lo descrito en la Sección 2.2.8. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) unifactorial o multifactorial según corresponda y las comparaciones múltiples entre medias se realizaron mediante el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Los resultados de la prueba de ordenamiento del análisis sensorial se analizaron con el test de Friedman. En todos los casos, se usó el software Statgraphics Centurion XV.II (StatPoint Technologies, Warrenton, VA, EE. UU.).

### 4.3. Resultados y discusión

#### 4.3.1. Actividad acuosa ( $a_w$ ) y contenido de humedad

En la **Tabla 4.3** se presentan los valores de actividad acuosa y humedad de las distintas premezclas en polvo y de los complejos de inclusión utilizados para formar las premezclas.

**Tabla 4.3.** Actividad acuosa ( $a_w$ ) a 25 °C y humedad (%) de las premezclas de sopa en polvo sin (S0) y con un 15% (S15) y 30% (S30) p/p de complejos de inclusión y del complejo de inclusión (CI20) usado en las premezclas

Muestra	$a_w$ (25 °C)	Humedad (%)
S0	$0,182 \pm 0,004^a$	$2,5 \pm 0,2^a$
S15	$0,157 \pm 0,002^b$	$1,3 \pm 0,2^b$
S30	$0,156 \pm 0,006^b$	$1,5 \pm 0,4^b$
CI20	$0,085 \pm 0,005^c$	$0,7 \pm 0,1^b$

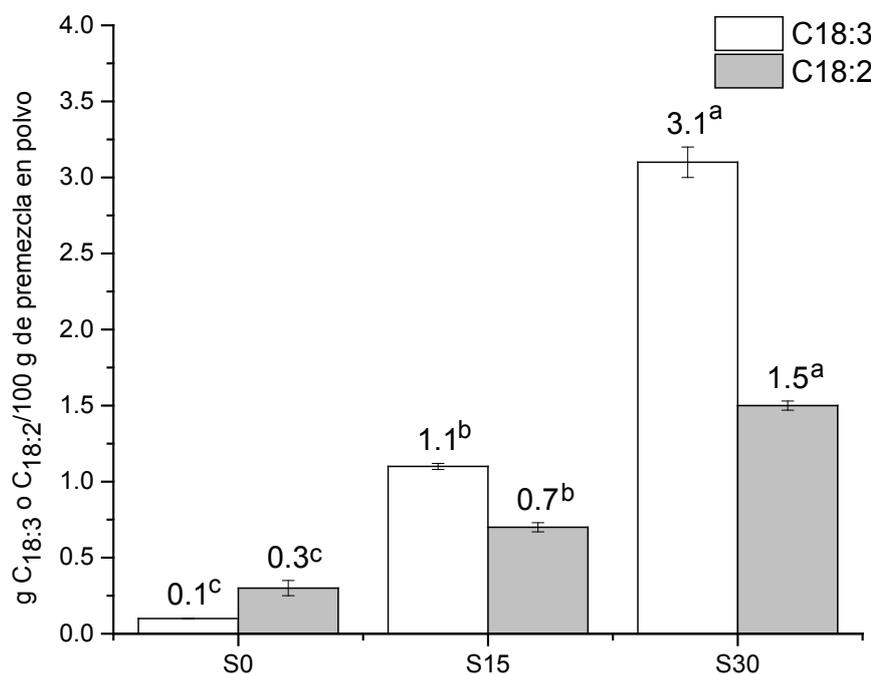
Valores medios  $\pm$  desviación estándar ( $n \geq 2$ ). Valores con distinto superíndice en la misma columna difieren significativamente ( $p \leq 0,05$ ) de acuerdo con el test de Tukey

Como puede observarse, la  $a_w$  de todas las muestras en estudio fue menor a 0,6, límite máximo establecido para asegurar la estabilidad microbiológica de un alimento (Tapia et al., 2020). Asimismo, la incorporación de 15 y 30% de complejo provocó un descenso significativo en el valor de  $a_w$  respecto de la sopa instantánea comercial (S0) ( $p \leq 0,05$ ), debido al bajo  $a_w$  del complejo (CI20) (**Tabla 4.3**).

Todas las premezclas presentaron un contenido de humedad comprendido entre 1,3-2,5%, por lo que las mismas cumplen con el Artículo 442 del Capítulo VI del Código Alimentario Argentino, el cual establece que las sopas deshidratadas de cualquier tipo no podrán presentar un contenido de humedad superior al 7% (Código Alimentario Argentino, 2024a). A su vez, se observó que los complejos de inclusión presentaron un contenido de humedad significativamente menor que el de la sopa comercial ( $p \leq 0,05$ ), por lo que la incorporación de los complejos a las sopas generó una disminución significativa en dicho parámetro respecto de la muestra S0 (Tabla 4.3), tal como se había observado en el caso de la  $a_w$ .

#### 4.3.2. Contenido de $C_{18:3}$ y $C_{18:2}$ de las premezclas de sopa

En la Figura 4.5 se muestran los resultados obtenidos a partir de la determinación del contenido de ácidos  $\alpha$ -linolénico y linoleico de las premezclas de sopa en polvo por cromatografía gaseosa.

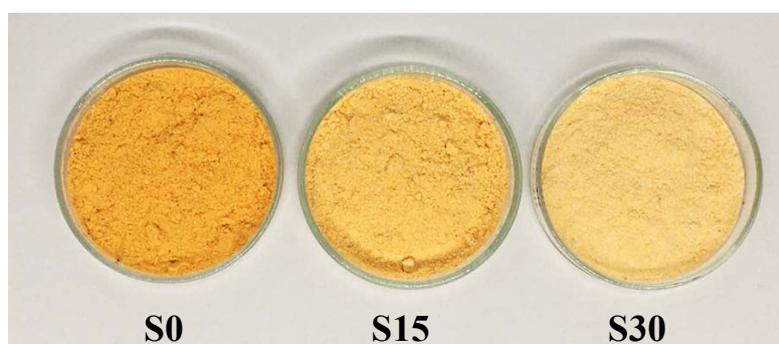


**Figura 4.5.** Contenido de ácidos  $\alpha$ -linolénico ( $C_{18:3}$ ) y linoleico ( $C_{18:2}$ ) de la sopa comercial (S0) y de las premezclas de sopa comercial con 15% (S15) y 30% (S30) p/p de complejos de inclusión. Los distintos superíndices indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en el contenido de  $C_{18:3}$  o  $C_{18:2}$  entre muestras, de acuerdo al test de Tukey

En el caso de la sopa comercial, si bien en el envase se declara la utilización de aceites vegetales en su formulación (Sección 4.2.1), no aclara el origen de dichos aceites, por lo que se desconoce la composición de ácidos grasos esperada en dicha muestra. Sin embargo, como puede apreciarse en la **Figura 4.5**, la sopa comercial presentó un contenido muy bajo de  $C_{18:3}$  y  $C_{18:2}$ . A su vez, las sopas a las que se le adicionó complejo de inclusión mostraron un contenido de ambos ácidos significativamente superior al de la muestra S0 ( $p \leq 0,05$ ). La adición de 15% de CI a la sopa comercial generó un aumento de 1000% y 133%, en el contenido de  $C_{18:3}$  y  $C_{18:2}$ , respectivamente. Asimismo, la muestra S30 presentó un contenido de  $C_{18:3}$  y  $C_{18:2}$  3000% y 400% superior respecto de S0, respectivamente. Estos resultados confirman la efectiva fortificación de la sopa con ácidos grasos esenciales  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 de chía empleando complejos de inclusión como sistemas de vehiculización, en concordancia con la definición de alimento fortificado del Código Alimentario Argentino (ver Sección 4.1.4).

#### 4.3.3. Color

El color es un atributo que juega un rol importante en la elección y consumo de los alimentos, ya que influye en la percepción visual, la preferencia y en el grado de aceptabilidad del consumidor. En la **Figura 4.6** se muestran las premezclas en polvo con los distintos agregados de complejos de inclusión, mientras que en la **Tabla 4.4**, se presentan los resultados de las mediciones de color al inicio y al final del almacenamiento a  $40 \pm 2$  °C durante 90 días. En la misma, se incluyó la premezcla hecha con una mezcla física hidrolizado/almidón (S30MF), con el objetivo de comparar la variación en el color durante el almacenamiento cuando los ácidos grasos de chía se incorporan a la formulación en su forma libre, no complejados.



**Figura 4.6.** Sopa deshidratada comercial (S0) y premezclas de sopa con la adición de 15% (S15) y 30% (S30) p/p de complejos de inclusión

**Tabla 4.4.** Parámetros de color correspondientes a la sopa comercial (S0) y a las premezclas de sopa en polvo con la adición de 15% (S15) y 30% (S30) p/p de complejos de inclusión y de 30% p/p de mezcla física (S30MF), al inicio (t = 0 días) y al final (t = 90 días) de almacenamiento a 40±2 °C

Muestra	t = 0 días			t = 90 días			ΔE
	L*	a*	b*	L*	a*	b*	
S0	74,2 ± 0,4 <sup>dA</sup>	18,5 ± 0,1 <sup>aA</sup>	44,4 ± 0,1 <sup>aA</sup>	70,2 ± 0,2 <sup>dB</sup>	14,6 ± 0,2 <sup>aB</sup>	30,0 ± 0,2 <sup>bB</sup>	15,4 ± 0,2 <sup>a</sup>
S15	80,7 ± 0,2 <sup>cA</sup>	12,6 ± 0,1 <sup>bA</sup>	34,2 ± 0,1 <sup>cA</sup>	77,9 ± 0,3 <sup>bB</sup>	8,8 ± 0,1 <sup>bB</sup>	27,1 ± 0,1 <sup>cB</sup>	8,6 ± 0,1 <sup>b</sup>
S30	85,0 ± 0,2 <sup>aA</sup>	9,0 ± 0,1 <sup>dA</sup>	27,8 ± 0,5 <sup>dA</sup>	81,9 ± 0,5 <sup>aB</sup>	5,3 ± 0,2 <sup>dB</sup>	25,0 ± 0,3 <sup>dB</sup>	5,6 ± 0,2 <sup>c</sup>
S30MF	81,3 ± 0,1 <sup>bA</sup>	12,2 ± 0,0 <sup>cA</sup>	35,9 ± 0,0 <sup>bA</sup>	75,8 ± 0,2 <sup>cB</sup>	7,7 ± 0,1 <sup>cB</sup>	30,5 ± 0,1 <sup>aB</sup>	8,9 ± 0,2 <sup>b</sup>

Valores medios ± desviación estándar (n=4). Valores con distinto superíndice en minúscula en cada columna indican diferencias significativas (p≤0,05) entre sistemas para cada parámetro de color en cada tiempo, de acuerdo con el test de Tukey. Valores con distinto superíndice en mayúscula en cada fila indican diferencias significativas (p≤0,05) entre tiempo inicial y final para cada parámetro de color de un mismo sistema, según el test de Tukey

Como puede observarse en la **Tabla 4.4**, la sopa comercial (S0) presentó valores de  $a^*$  y  $b^*$  positivos, lo cual indica una coloración tendiente hacia el rojo y amarillo, respectivamente. Además, el valor de  $L^*$  fue de 74,2, indicando una luminosidad elevada. Estos valores eran los esperados, dado que se trata de una premezcla de sopa de zapallo. Los carotenoides son los pigmentos naturales responsables del color amarillo, naranja y rojo de varias frutas y vegetales (incluyendo el zapallo), así como de los alimentos procesados que los contienen (Ninčević Grassino et al., 2023). Además, esta coloración también se relaciona con la presencia de colorante annato en la formulación de la sopa comercial (ver Sección 4.2.1). Las premezclas formadas con complejos de inclusión también mostraron valores positivos de  $a^*$  y  $b^*$ . Sin embargo, dichos parámetros disminuyeron progresivamente ( $p \leq 0,05$ ) a medida que se aumentó el porcentaje de complejo adicionado en la premezcla (**Tabla 4.4**). Además, el valor de  $L^*$  de las premezclas aumentó significativamente con el agregado de los complejos ( $p \leq 0,05$ ). Esto indica que la incorporación de los complejos de inclusión generó una disminución de los componentes rojo y amarillo y un aumento de la luminosidad de las premezclas (como se puede apreciar en la **Figura 4.6**). Esto puede atribuirse a que los complejos poseen una coloración blanca, presentando valores de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  iguales a  $95,0 \pm 0,2$ ;  $0,3 \pm 0,0$  y  $4,1 \pm 0,1$ , respectivamente.

Todas las muestras en estudio mostraron una disminución significativa en los valores de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  luego del almacenamiento durante 90 días a  $40 \pm 2$  °C (**Tabla 4.4**). Esto se cuantificó mediante el parámetro de variación de color ( $\Delta E$ ). Las diferencias en el color perceptible pueden clasificarse analíticamente como muy distintas ( $\Delta E > 3$ ), distintas ( $1,5 < \Delta E < 3$ ) y pequeñas ( $\Delta E < 1,5$ ), correspondiendo valores de  $\Delta E > 2$  a diferencias notables mediante la percepción visual de muchos productos (Adekunte et al., 2010). Dado que en todos los casos se obtuvo un  $\Delta E > 2$  (**Tabla 4.4**), las premezclas experimentaron una variación perceptible de color durante el almacenamiento a  $40 \pm 2$  °C. La mayor variación de color ocurrió en la sopa comercial (S0). Esta variación podría atribuirse a la degradación de los carotenoides presentes en el zapallo, cuyas insaturaciones los hace altamente susceptibles a reacciones tales como oxidación e isomerización (Ninčević Grassino et al., 2023). La premezcla formada con un 30% de complejo de inclusión (S30) fue aquella que exhibió el menor valor de  $\Delta E$ , el cual fue incluso significativamente menor al de la premezcla formada con un 30% de mezcla física hidrolizado/almidón (S30MF). Estos resultados sugieren que las premezclas formadas

con complejos de inclusión experimentaron una menor variación de color durante el almacenamiento en comparación con la sopa sin complejo, y que dicha variación fue aún menor cuando los ácidos grasos de chía se incorporan en la forma complejada que mezclados físicamente con el almidón (sin complejar).

#### 4.3.4. Ángulo de reposo, índices de Carr y de Hausner

Las propiedades de flujo de las sopas en polvo se caracterizaron a través de la medición de distintos parámetros, incluyendo el ángulo de reposo, las densidades aireada ( $\delta_a$ ) y compactada ( $\delta_c$ ) y los índices de Carr (IC) y de Hausner (IH). En la **Tabla 4.5** se presentan los resultados de dichas determinaciones, realizadas en los complejos de inclusión y en las premezclas de sopa sin y con la adición de complejos.

**Tabla 4.5.** Ángulo de reposo, densidad aireada, densidad compactada e índices de Carr y de Hausner de los complejos de inclusión (CI20) y de las premezclas de sopa en polvo conteniendo 0% (S0), 15% (S15) y 30% (S30) p/p de complejos de inclusión

Muestra	Ángulo de reposo (°)	$\delta_a$ (g/mL)	$\delta_c$ (g/mL)	IC (%)	IH (%)
S0	74,5 ± 2,3 <sup>a</sup>	0,44 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,71 ± 0,00 <sup>a</sup>	39 ± 4 <sup>a</sup>	1,64 ± 0,10 <sup>a</sup>
S15	66,5 ± 1,3 <sup>b</sup>	0,36 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,59 ± 0,00 <sup>b</sup>	38 ± 1 <sup>a</sup>	1,62 ± 0,04 <sup>a</sup>
S30	63,0 ± 0,9 <sup>b</sup>	0,32 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,55 ± 0,01 <sup>c</sup>	41 ± 1 <sup>a</sup>	1,70 ± 0,03 <sup>a</sup>
CI20	63,7 ± 2,3 <sup>b</sup>	0,19 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,29 ± 0,00 <sup>d</sup>	36 ± 1 <sup>a</sup>	1,57 ± 0,02 <sup>a</sup>

Valores medios ± desviación estándar ( $n \geq 2$ ). Valores con distinto superíndice en cada columna difieren significativamente ( $p \leq 0,05$ ) de acuerdo al test de Tukey.  $\delta_a$ : densidad aireada,  $\delta_c$ : densidad compactada, IC: índice de Carr, IH: índice de Hausner

Las propiedades de flujo de los polvos son relevantes, ya que influyen en el transporte de los mismos desde un lugar a otro durante el procesamiento y también son útiles como parámetro en el control de calidad. La medición del ángulo de reposo es un método rápido para estimar la fluidez de los polvos. Como puede verse en la **Tabla 4.5**, el ángulo de reposo de todas las muestras en estudio fue superior a 45°, estando comprendido entre 63,0 y 74,5°. A partir de estos valores, podemos decir que todas las premezclas presentaron una fluidez baja. La sopa comercial (S0) fue la muestra que exhibió el valor más alto, por lo que existe una mayor cohesividad entre las partículas que

la componen. Asimismo, dado que el ángulo de reposo del CI20 fue significativamente menor que el de la sopa comercial ( $p \leq 0,05$ ), la incorporación de los complejos a la sopa deshidratada generó una disminución significativa en dicho parámetro ( $p \leq 0,05$ ) (**Tabla 4.5**), provocando un aumento de la fluidez de las premezclas. En el mismo sentido, la sopa comercial presentó el valor más alto de densidad aireada, el cual fue significativamente mayor al del resto de las premezclas ( $p \leq 0,05$ ). Dicho parámetro disminuyó significativamente cuando se incorporaron los complejos a las sopas, debido a la menor  $\delta_a$  que presentan los CI (**Tabla 4.5**). A su vez, la densidad de las muestras aumentó luego de la compactación de las mismas, lo que se vio reflejado en una mayor densidad compactada (**Tabla 4.5**). Un aumento considerable en la densidad debido a la compactación generalmente se atribuye a la presencia de fuerzas interparticulares significativas, especialmente fuerzas de fricción (Peleg, 1977). Las densidades aireadas y compactadas se relacionaron a través de los índices de Carr y de Hausner (Ecuaciones 4.1 y 4.2). En un polvo que fluye libremente, las  $\delta_a$  y  $\delta_c$  presentan valores cercanos y, por lo tanto, el índice de Carr es bajo ( $< 15$ ). En un polvo con fluidez baja, por el contrario, se observan mayores diferencias entre ambas densidades, resultando en IC mayores ( $> 32$ ) (Buanz, 2021). A su vez, los polvos con flujo libre (con baja fricción interparticular) presentan índices de Hausner  $< 1,2$ , mientras que en aquellos con flujo menor, el IH es  $> 1,5$  (Buanz, 2021). En la **Tabla 4.5**, podemos observar que todas las muestras en estudio presentaron valores de IC e IH  $> 32$  y  $> 1,5$ , respectivamente. Por lo tanto, a partir de los resultados obtenidos de ángulo de reposo, IC e IH, podemos decir que todas las premezclas de sopa en polvo poseen una baja fluidez. Asimismo, a diferencia de la medición del ángulo de reposo, no fue posible detectar diferencias significativas en la fluidez de las muestras en estudio ( $p > 0,05$ ) a partir de los valores de IC e IH.

La fluidez de los polvos depende principalmente del tamaño de partícula y de su contenido de humedad (Bhandari et al., 2013; Marinopoulou et al., 2020, 2022). En general, aquellos polvos con mayor contenido de humedad y menor tamaño de partícula tienden a ser más cohesivos y presentan una menor fluidez (Marinopoulou et al., 2020, 2022). La mayor cohesividad de la sopa comercial en comparación con los complejos se podría atribuir a las diferencias encontradas en el contenido de humedad (Sección 4.3.1), dado que la muestra S0 presentó un contenido de humedad significativamente mayor que el CI20 y que las premezclas de sopa con complejo (S15 y S30). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las muestras CI20 y S0 presentan características y composición diferentes, dado que los primeros están compuestos principalmente por almidón, mientras

que la sopa comercial es una mezcla más compleja compuesta por vegetales deshidratados y aditivos, lo que dificulta la comparación de su fluidez. A pesar de esto, los resultados de ángulo de reposo indican que la incorporación de los complejos a la sopa generó una mejora en la fluidez de los polvos, reduciendo así la tendencia de las partículas a adherirse entre sí y formar aglomerados.

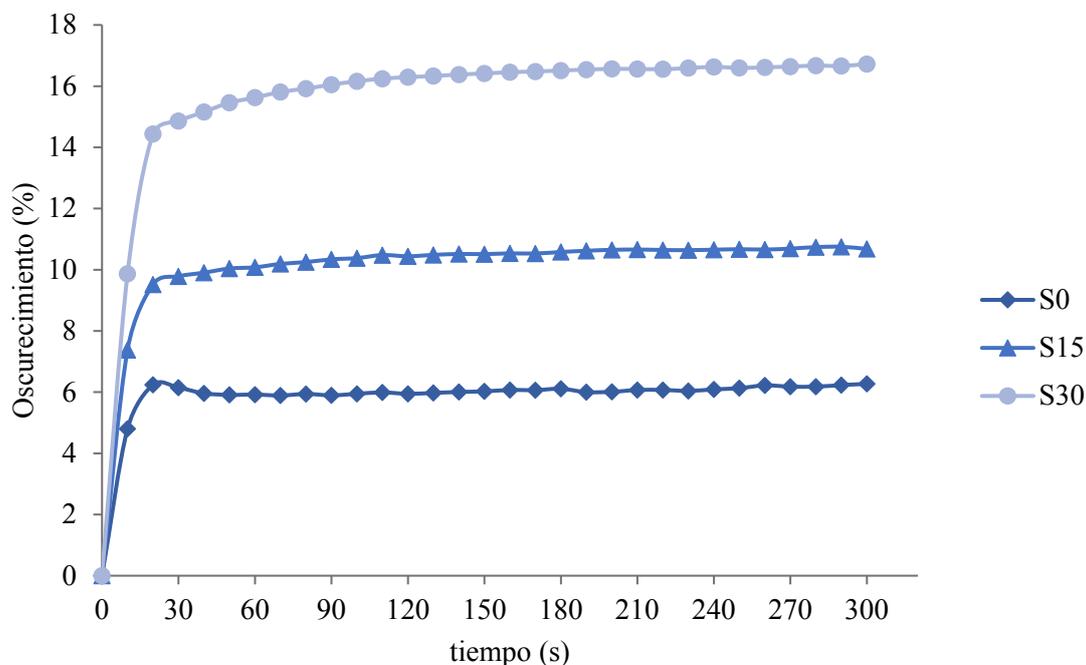
#### 4.3.5. Solubilidad

La solubilidad de las sopas se midió como la masa de sólidos obtenida luego de la disolución de las premezclas en agua, centrifugación y secado del sobrenadante. Las muestras S0, S15 y S30 presentaron una solubilidad de  $43\pm 0\%$ ,  $36\pm 3\%$  y  $29\pm 1\%$  (g de sólido seco/100 g de premezcla en polvo), respectivamente, observándose un descenso significativo en dicho parámetro a medida que se incrementó el porcentaje de CI adicionado en la premezcla ( $p\leq 0,05$ ). A partir de estos resultados, podemos decir que todas las muestras en estudio mostraron una baja solubilidad ( $<50\%$ ), incluso la sopa comercial. Sin embargo, debe considerarse que se trata de un parámetro experimental, cuyo valor varía según las condiciones empleadas para su medición (temperatura y tiempo de dispersión, condiciones de centrifugación). Asimismo, es importante resaltar que la dispersión de las partículas no equivale a la solubilización (Shittu y Lawal, 2007). En el caso de las bebidas a base de cacao en polvo, por ejemplo, el objetivo no es lograr una completa disolución, como ocurre con los polvos de bebidas de frutas, ya que el cacao en polvo contiene naturalmente sólidos insolubles. En este caso, lo más relevante es lograr una completa dispersión de estas partículas insolubles (Shittu y Lawal, 2007). Lo mismo ocurre en el caso de las sopas instantáneas, en cuya formulación también hay presentes compuestos insolubles, tales como partículas de vegetales o condimentos. En este tipo de productos, la dispersabilidad es un índice de calidad más importante que la solubilidad.

#### 4.3.6. Dispersabilidad, distribución de tamaño de partículas y diámetros medios

La velocidad y la eficiencia de dispersión es una propiedad importante de los ingredientes alimenticios en polvo (Klinkesorn et al., 2005). Dicha propiedad, influye en el comportamiento de las bebidas instantáneas durante la reconstitución. Asimismo, el tamaño de partícula afecta el área superficial de la partícula dentro de un polvo, lo cual es relevante, ya que determina el grado de interacción de las partículas entre sí y con el

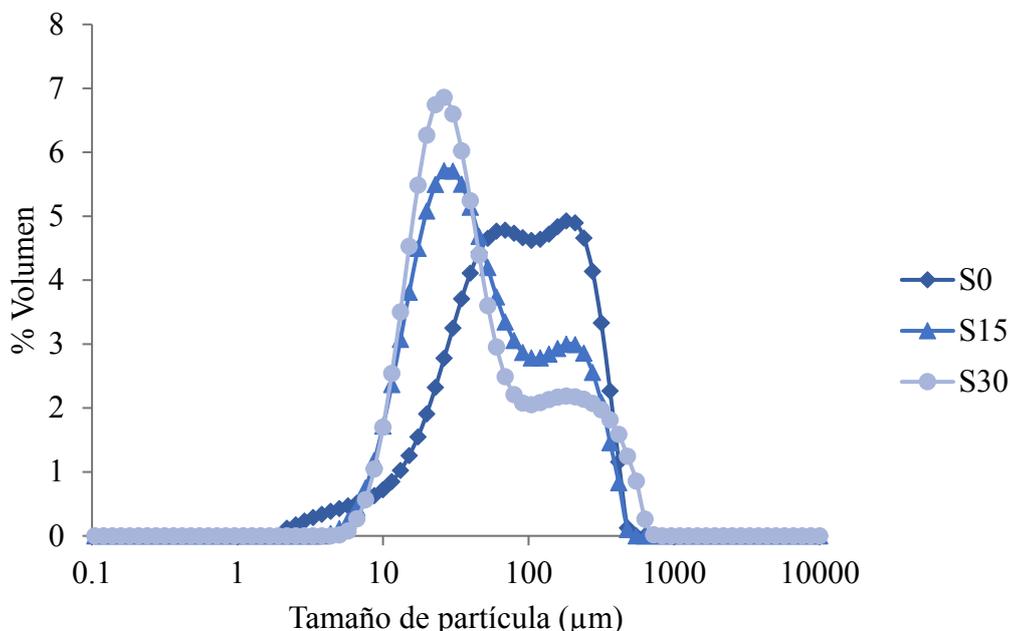
fluido circundante (Bhandari et al., 2013). La **Figura 4.7** muestra la evolución del oscurecimiento (%) medido mediante difracción láser en función del tiempo de agitación durante 300 s. Por su parte, las **Figuras 4.8 y 4.9** presentan, respectivamente, la distribución de tamaño de partículas y los diámetros medios  $D[4, 3]$  transcurridos los 300 s de agitación.



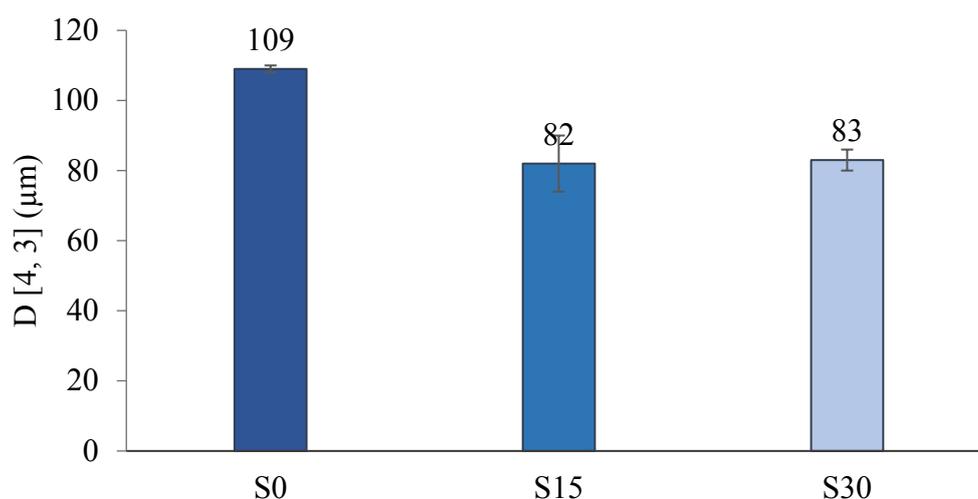
**Figura 4.7.** Oscurecimiento (%) en función del tiempo de dispersión de premezclas sin (S0) y con la adición de 15% (S15) y 30% (S30) p/p de complejos de inclusión

Como puede apreciarse, todas las premezclas mostraron un aumento rápido en el oscurecimiento en función del tiempo durante los primeros 20 s. Las muestras S0, S15 y S30 alcanzaron un valor máximo constante de oscurecimiento (%) de  $6,2\pm 0,0$ ;  $10,7\pm 1,0$  y  $16,6\pm 0,0$ , respectivamente (**Figura 4.7**), observándose un aumento significativo en dicho parámetro ( $p\leq 0,05$ ) a medida que se incrementó el porcentaje de complejos adicionados a la sopa. Además, el tiempo necesario hasta alcanzar el 90% del oscurecimiento máximo final estuvo comprendido entre 15 y 35 s, no habiéndose encontrado diferencias significativas en el tiempo de dispersión de las distintas muestras evaluadas ( $p> 0,05$ ). A partir de este resultado, podemos decir que el tiempo de dispersión de la sopa comercial no se modificó luego de la adición de los complejos. Sin embargo, es importante considerar que para la medición de dispersión de la luz se utilizan

soluciones muy diluidas (Bhandari et al., 2013). En la práctica, durante la preparación de las sopas se emplean concentraciones mayores, lo que puede generar una menor dispersabilidad. A pesar de esta limitación, todas las premezclas de sopa mostraron buenas propiedades instantáneas cuando se reconstituyeron siguiendo las instrucciones indicadas en el envase.



**Figura 4.8.** Distribución de tamaño de partícula de sopas sin (S0) y con la adición de 15% (S15) y 30% (S30) p/p de complejo de inclusión



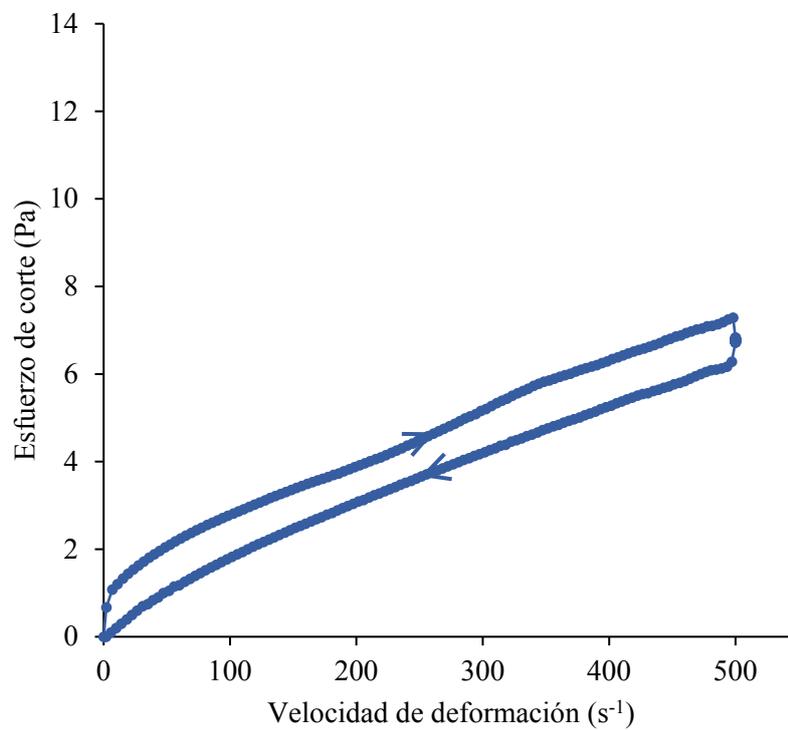
**Figura 4.9.** Diámetro medio de partícula de sopas sin (S0) y con 15% (S15) y 30% (S30) p/p de complejo de inclusión

Cuando se analizó la distribución de tamaño de partículas de las distintas premezclas en estudio, se encontró que la sopa comercial exhibió una distribución bimodal (**Figura 4.8**) con un diámetro medio de partícula de 109  $\mu\text{m}$  (**Figura 4.9**). Las premezclas conteniendo 15 y 30% de complejos de inclusión presentaron una distribución mayoritariamente monomodal, con un hombro ubicado en la zona de tamaños de partículas mayores (**Figura 4.8**). En dichas muestras (S15 y S30), puede apreciarse la presencia de una población de partículas de menor tamaño, comprendido entre 10 y 100  $\mu\text{m}$ , las cuales no están presentes en la muestra S0 (**Figura 4.8**). Este valor es similar al tamaño de partículas de complejos de inclusión formados por el método alcalino y secados por liofilización (Isaschar-Ovdat et al., 2021; Tarazi Riess et al., 2022). Por lo tanto, dicha población de partículas de menor tamaño podría corresponder a los complejos adicionados a las sopas, mientras que el hombro podría atribuirse a las partículas de sopa comercial que componen dichas premezclas. En consecuencia, aquellas premezclas formadas con complejos presentaron un  $D[4, 3]$  significativamente menor que el de la sopa comercial ( $p \leq 0,05$ ) (**Figura 4.9**). En general, se considera que los polvos con menor tamaño de partícula presentan una menor fluidez, dado que las partículas más pequeñas poseen una mayor superficie por unidad de masa, lo que incrementa la cohesión (Bhandari et al., 2013; Marinopoulou et al., 2020, 2022). Sin embargo, a pesar de que la sopa comercial presentó un mayor tamaño de partícula que las sopas con complejo, la primera había mostrado una menor fluidez, según los valores de ángulo de reposo (Sección 4.3.4). Por lo tanto, la mayor fluidez de las premezclas con complejo no se podría atribuir a diferencias en el tamaño de partícula, sino a diferencias en la composición de las sopas y los complejos y/o, tal como se discutió en la Sección 4.3.3, a diferencias en el contenido de humedad. Además, debe considerarse que la fluidez se midió en los polvos secos, mientras que el tamaño de partícula se determinó en los polvos reconstituidos, por lo que las diferencias encontradas entre ambos parámetros también pueden deberse a variaciones que ocurren en los polvos luego de la reconstitución.

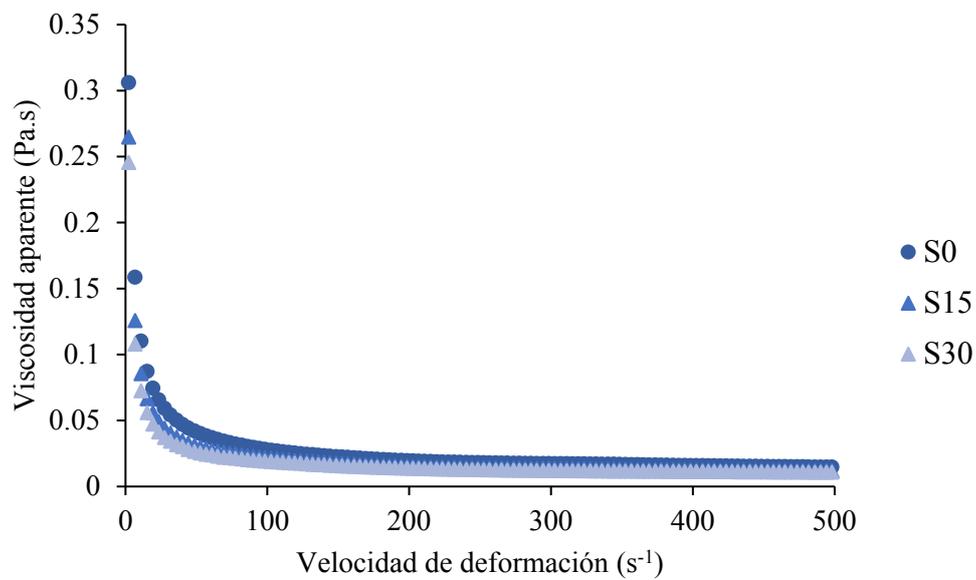
#### 4.3.7. Propiedades reológicas

El estudio del comportamiento reológico de las distintas premezclas de sopa reconstituidas se llevó a cabo a través de un ensayo rotacional. La curva de comportamiento de flujo y las curvas de viscosidad aparente se presentan en las **Figuras 4.10** y **4.11**, respectivamente. Asimismo, en la **Tabla 4.6** se muestran los parámetros

reológicos obtenidos a partir del ajuste a la ley de Ostwald y la viscosidad aparente a 500  $s^{-1}$  ( $\eta_{500}$ ).



**Figura 4.10.** Curva de comportamiento de flujo de la sopa instantánea comercial



**Figura 4.11.** Curvas de viscosidad correspondientes a las sopas sin (S0) y con la adición de 15% (S15) y 30% (S30) p/p de complejos de inclusión

**Tabla 4.6.** Parámetros reológicos (k, índice de consistencia y n, índice de comportamiento de flujo) obtenidos a partir del ajuste a la ley de Ostwald y viscosidad aparente a  $500 \text{ s}^{-1}$  ( $\eta_{500}$ ) a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  de las sopas sin (S0) y con la adición de 15% (S15) y 30% p/p (S30) de complejos de inclusión

Muestra	Parámetros del ajuste de Ostwald*			$\eta_{500}$ (Pa.s)
	k	n	$r^2$	
S0	$0,178 \pm 0,000^a$	$0,590 \pm 0,000^c$	0,99	$0,0136 \pm 0,0000^a$
S15	$0,115 \pm 0,004^b$	$0,630 \pm 0,006^b$	0,99	$0,0109 \pm 0,0000^b$
S30	$0,088 \pm 0,007^c$	$0,652 \pm 0,007^a$	0,99	$0,0094 \pm 0,0004^c$

Valores con distinto superíndice dentro de una misma columna difieren significativamente ( $p \leq 0,05$ ) de acuerdo al test de Tukey.

\*Los valores informados corresponden a la curva de gradiente de velocidad ascendente

Dado que todas las muestras en estudio presentaron un comportamiento similar, en la **Figura 4.10** se presenta la curva de comportamiento de flujo correspondiente a la sopa comercial. Todas las muestras en estudio mostraron una disminución de la viscosidad aparente a medida que se aumentó la velocidad de deformación (**Figuras 4.10 y 4.11**) y un índice de comportamiento de flujo ( $n$ )  $< 1$  (**Tabla 4.6**), siendo dichos resultados concordantes con un comportamiento no-newtoniano de tipo pseudoplástico y tixotrópico. Asimismo, la adición de los complejos no modificó el perfil reológico de las sopas. El modelo de Ostwald (**Ecuación 4.3**) ajustó satisfactoriamente las curvas de flujo obtenidas experimentalmente ( $r^2=0,99$ ) (**Tabla 4.6**). Adicionalmente, el valor de  $n$  aumentó significativamente ( $p \leq 0,05$ ) a medida que se incrementó el porcentaje de complejos de inclusión en las premezclas, indicando una disminución en la pseudoplasticidad de las sopas como resultado de la adición de los CI.

Las sopas reconstituidas presentaron una baja viscosidad aparente a  $500 \text{ s}^{-1}$  ( $\eta_{500}$ ), la cual estuvo comprendida entre  $0,0094$  y  $0,0136 \text{ Pa.s}$ , registrándose un descenso significativo en dicho parámetro ( $p \leq 0,05$ ) a medida que se aumentó el porcentaje de complejo en las premezclas (**Tabla 4.6**). Este resultado indica que la incorporación de los complejos generó un aumento en la fluidez de las sopas. Esto se podría atribuir a que la adición de complejos en las sopas va acompañada por una disminución en la concentración de otros ingredientes (almidón de papa, goma xántica), los cuales están presentes en la sopa comercial (ver Sección 4.2.1) y actúan como espesantes.

4.3.8. Evaluación sensorial

La evaluación sensorial de las sopas se llevó a cabo con el objetivo de determinar si se detectaron diferencias significativas en la apariencia, el aroma y la consistencia de las sopas con complejos de inclusión (S15 y S30) con respecto a la sopa control (S0). Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 4.7**.

**Tabla 4.7.** Promedios sensoriales correspondientes a los atributos de apariencia, aroma y consistencia de sopas instantáneas sin (S0, ciego) y con la adición de 15% (S15) y 30% (S30) p/p de complejos de inclusión

Muestra	Atributo		
	Apariencia	Aroma	Consistencia
S0 (ciego)	0,75 <sup>c</sup>	0,96 <sup>c</sup>	1,04 <sup>b</sup>
S15	2,60 <sup>b</sup>	2,23 <sup>b</sup>	1,82 <sup>a</sup>
S30	3,68 <sup>a</sup>	2,92 <sup>a</sup>	2,30 <sup>a</sup>

Escala sensorial de 0 (ninguna diferencia) a 6 (diferencia muy grande). Valores con distinto superíndice en la misma columna difieren significativamente ( $p \leq 0,05$ ) de acuerdo con el test de Tukey

Como puede observarse en la **Tabla 4.7**, los panelistas asignaron a los distintos atributos de la muestra S0 una puntuación comprendida entre 0 (ninguna diferencia) y 1 (diferencia muy leve) con respecto al control. Este resultado era esperable, dado que S0 es el testigo ciego, tratándose ambas muestras (S0 y control) de la sopa comercial. La apariencia, el aroma y la consistencia de las sopas a las que se les adicionó complejos de inclusión (S15 y S30), recibieron una puntuación significativamente mayor ( $p \leq 0,05$ ) respecto del testigo ciego (S0) (**Tabla 4.7**). Por lo tanto, los evaluadores detectaron diferencias significativas entre la sopa comercial y aquellas que contienen complejos. Asimismo, la diferencia encontrada en la apariencia y el aroma fue mayor a medida que el porcentaje de complejos adicionado se incrementó desde 15 hasta 30%. Contrariamente, no se observaron diferencias significativas en la consistencia de las muestras S15 y S30 ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, es importante resaltar que aquellas sopas que contienen complejos recibieron, en la mayoría de los casos, una puntuación comprendida entre 2 y 3, lo que indica que las diferencias percibidas en los atributos evaluados con respecto a la sopa comercial fueron entre leves y moderadas.

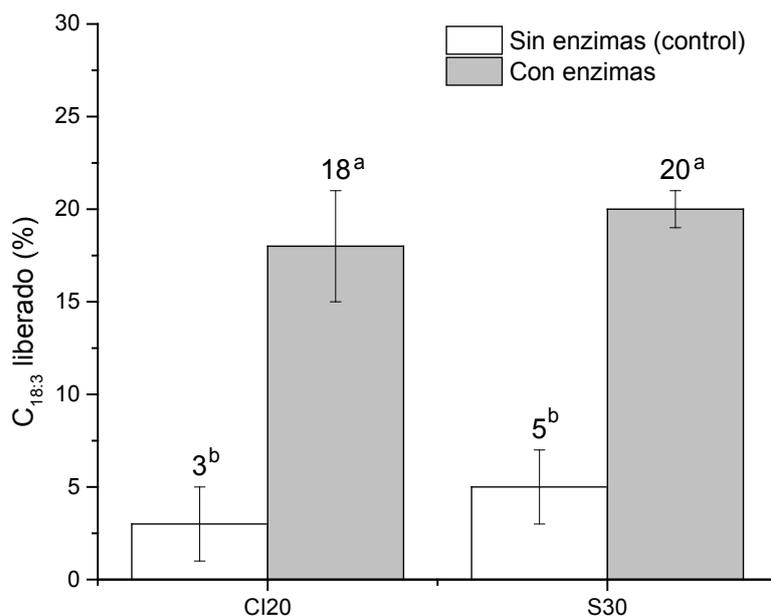
Los resultados del *ranking test* indicaron que hubo diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en la preferencia de las sopas evaluadas. El orden asignado por los evaluadores en forma decreciente fue  $S0 > S15 > S30$ . Por lo tanto, el aumento del porcentaje de los complejos adicionados fue acompañado por una disminución en la preferencia de las sopas. Sin embargo, los resultados deberían complementarse con otras pruebas sensoriales, tales como una prueba de aceptabilidad, para así conocer el grado de aceptabilidad de las sopas con complejos, a pesar de las diferencias encontradas.

#### 4.3.9. Ensayo de digestibilidad *in vitro*

Un aspecto relevante a tener en cuenta durante la evaluación de los complejos de inclusión como sistemas de vehiculización es su comportamiento en el tracto digestivo. En este sentido, se realizó el estudio de la digestibilidad *in vitro* de los complejos, en el que se abordó tanto la liberación del ligando de interés (ácido  $\alpha$ -linolénico), así como la degradación del material complejante (almidón).

En el primer caso, los resultados obtenidos mostraron que cuando los complejos se sometieron a las condiciones simuladas de digestión sin la adición de enzimas (control), el porcentaje de  $\omega$ -3 liberado al finalizar la etapa intestinal fue muy bajo (3-5%) (**Figura 4.12**). Asimismo, dicho valor se incrementó significativamente ( $p \leq 0,05$ ) cuando la digestión se llevó a cabo con las enzimas correspondientes, encontrándose un 18 y 20% de ácido  $\alpha$ -linolénico liberado a partir de los complejos libres (CI20) y de aquellos incorporados en la sopa (S30), respectivamente (**Figura 4.12**), no habiéndose encontrado diferencias significativas entre ambos valores ( $p > 0,05$ ).

La liberación del ligando desde los complejos podría atribuirse tanto a la degradación del almidón, como así también al hinchamiento de las partículas (Tarazi Riess et al., 2022). Los resultados encontrados sugieren que la liberación de  $\omega$ -3 desde los complejos ocurre como consecuencia de su degradación por acción de las enzimas digestivas. Adicionalmente, la presencia de la matriz alimentaria no tuvo efecto sobre el porcentaje de  $\omega$ -3 liberado desde los complejos.

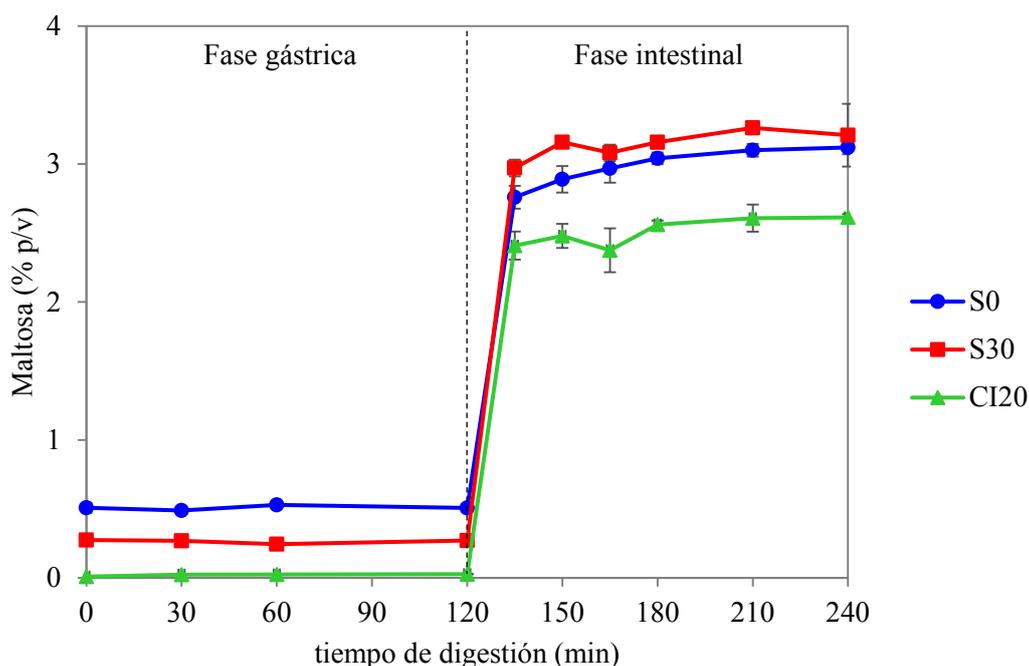


**Figura 4.12.** Porcentaje de ácido  $\alpha$ -linolénico liberado luego de la digestión *in vitro* de los complejos de inclusión (CI20) y de los complejos incorporados en la sopa en una proporción 30% p/p (S30). Valores con distinto superíndice difieren significativamente ( $p \leq 0,05$ ), de acuerdo al test de Tukey

Aún existe escasa información bibliográfica actual relacionada con la cuantificación de ligandos liberados durante la digestión de complejos de inclusión. Lesmes et al. (2009), demostraron que complejos formados con distintos ácidos grasos por el método alcalino, liberaron aproximadamente 15% de ácido esteárico y alrededor de 5% de ácido oleico y linoleico cuando se sometieron a una digestión con pancreatina durante 6 h. En otro trabajo, se formaron complejos entre almidón de maíz de alta amilosa con ácido esteárico a través del método alcalino acoplado a homogeneización a alta presión, encontrándose que éstos liberaron 10% de ligando luego de 24 h de digestión con pancreatina (Lesmes et al., 2008). A partir de estos valores, podemos decir que el porcentaje de ácido  $\alpha$ -linolénico liberado por los complejos libres y en la sopa fue adecuado, teniendo en cuenta que en los trabajos citados anteriormente se emplearon tiempos de digestión mucho mayores a los del protocolo utilizado en el presente Capítulo. Tarazi Riess et al. (2022), realizaron un ensayo de digestión *in vitro* semi-dinámico de complejos formados entre almidón de maíz de alta amilosa con capsaicina y curcumina, encontrando al final de la etapa intestinal un porcentaje de liberación de ligando de 36 y 33%, respectivamente. Sin embargo, el mayor porcentaje de liberación de estos compuestos fenólicos en comparación con el de  $\omega$ -3, podría deberse principalmente a

diferencias tanto en la estructura molecular del ligando empleado en cada caso, así como también en el protocolo de digestión, dado que en el trabajo citado se aplicó un protocolo semi-dinámico mientras que, en el presente Capítulo, se realizó una simulación estática.

La descomposición del almidón durante el ensayo de digestibilidad se realizó a través del monitoreo de la formación de maltosa en función del tiempo. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 4.13**.



**Figura 4.13.** Hidrólisis del almidón expresado como porcentaje de maltosa en función del tiempo de digestión de la sopa comercial sin (S0) y con la adición de 30% p/p de complejos de inclusión (S30) y del complejo de inclusión libre (CI20)

En todas las muestras en estudio, el porcentaje de maltosa se mantuvo constante durante la fase gástrica, seguido de un rápido incremento en dicho parámetro al inicio de la fase intestinal, alcanzándose un valor prácticamente constante luego de ~150 min de digestión (**Figura 4.13**). En el caso de la muestra de sopa comercial (S0), el contenido de maltosa promedio durante la fase gástrica fue de 0,51% p/v, lo que puede atribuirse a los azúcares reductores presentes en su formulación original (ver Sección 4.2.1) (**Figura 4.13**). Seguidamente, dicho parámetro aumentó rápidamente en la fase intestinal, alcanzándose un valor de 3,12% p/v al final de la digestión. Contrariamente, en la muestra de complejo de inclusión (CI20), el porcentaje de maltosa fue nulo durante toda la fase

gástrica, aumentando rápidamente durante la etapa intestinal, alcanzando un valor final de 2,61%. Este resultado indica que no hubo degradación del material complejante (almidón) en la etapa estomacal, sino que la misma ocurrió bajo las condiciones intestinales. La muestra de sopa con complejo (S30) presentó un contenido de maltosa menor al de la muestra S0 (0,27% p/v) durante la fase gástrica dado que, como se vio anteriormente, el complejo no aporta azúcares reductores (**Figura 4.13**). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en el porcentaje de maltosa alcanzado por S30 y S0 al final de la digestión. Por lo tanto, el comportamiento observado en los complejos (tanto en su forma libre como incorporados en la sopa) fue el esperado para un sistema de vehiculización, ya que sugiere que los mismos fueron estables bajo las condiciones estomacales, logrando una degradación selectiva en el intestino.

#### 4.4. Conclusiones parciales

- A través de la adición de complejos de inclusión, se logró fortificar una sopa instantánea comercial con ácidos grasos esenciales  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 de chía.
- Todas las premezclas de sopas en polvo obtenidas presentaron una baja actividad acuosa ( $< 0,6$ ) y un contenido de humedad inferior a 7%. La incorporación de los complejos de inclusión generó una disminución de los componentes rojo y amarillo y un aumento de la luminosidad de las premezclas en polvo. Asimismo, luego del almacenamiento durante 90 días a 40 °C, las premezclas que contienen complejos experimentaron una variación del color significativamente menor que la sopa comercial. Además, dicha variación fue aún menor cuando los ácidos grasos de chía se incorporaron en la forma complejada que mezclados físicamente con el almidón (sin complejar).
- Los valores de ángulo de reposo y los índices de Carr y Hausner revelaron que todas las premezclas de sopa en polvo poseen una baja fluidez. La incorporación de los complejos a la sopa deshidratada generó una disminución significativa en el ángulo de reposo, provocando un aumento de la fluidez de las premezclas y reduciendo así la tendencia de las partículas a adherirse entre sí y formar aglomerados.

- El tiempo de dispersabilidad de la sopa no se modificó luego de la incorporación de los complejos en su formulación. Asimismo, el agregado de los complejos generó una disminución en la pseudoplasticidad de las sopas y un descenso en la viscosidad aparente, resultando en un aumento de la fluidez de las sopas.
- Si bien se detectaron diferencias en la apariencia, el aroma y la consistencia de las sopas con complejos respecto de la sopa comercial, estas diferencias percibidas fueron leves a moderadas. Sería recomendable complementar estos resultados con otras pruebas sensoriales, tales como una prueba de aceptabilidad, a fin de conocer en qué medida las sopas con complejos son aceptadas por el consumidor a pesar de las diferencias encontradas.
- El estudio de digestibilidad *in vitro* reveló 18-20% de liberación de ácido  $\alpha$ -linolénico desde los complejos al finalizar la etapa intestinal, no mostrando variaciones al incorporar los complejos a la matriz alimentaria. Asimismo, el monitoreo de la liberación de maltosa durante la digestión indicó que no hubo degradación del material complejante (almidón) en la etapa estomacal, sino que la misma ocurrió bajo las condiciones intestinales. Por lo tanto, el comportamiento observado en los complejos (tanto en estado libre como incorporados en la sopa) coincidió con el esperado para un sistema de vehiculización, sugiriendo que los complejos fueron estables bajo las condiciones estomacales, logrando una degradación selectiva en el intestino.

### 4.5. Difusión de resultados

#### Presentaciones en Congresos y reuniones científicas

- Di Marco, Andrea E.; Ixtaina, Vanesa Y. Characterization of instant soup powders containing amylose-chia oil fatty acid inclusion complexes. VI International Conference Ia ValSe-Food. Lugar: Lima, Perú. 23-25 de septiembre de 2024.

## CONCLUSIONES GENERALES

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se abordó el estudio de la encapsulación molecular de compuestos bioactivos de chía (ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6) a través de la complejación por inclusión con amilosa, para su aplicación como sistemas de vehiculización en alimentos. A partir del mismo, se ha arribado a las conclusiones generales enumeradas a continuación:

- La lipasa de *Candida rugosa* mostró una elevada efectividad para hidrolizar el aceite de chía, permitiendo la obtención de una mezcla de ácidos grasos libres rica en  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6, que luego fue empleada como ligando durante la complejación.
- Los ácidos grasos libres obtenidos a partir de la hidrólisis enzimática del aceite de chía formaron satisfactoriamente complejos de inclusión con almidón de maíz de alta amilosa a través del método alcalino con y sin la aplicación de una etapa de templado, lo cual pudo corroborarse a partir de los resultados complementarios de DRX, DSC y ATR-FTIR.
- La temperatura de templado tuvo efecto principalmente sobre la temperatura de disociación de los complejos de inclusión. Un aumento de la temperatura desde 50 hasta 90 °C resultó en un aumento de la  $T_p$ . Por el contrario, no hubo diferencias en las propiedades fisicoquímicas de los complejos templados durante 2 y 6 h.
- En aquellos complejos templados durante 2 h a 90 °C, el aumento de la relación másica hidrolizado de aceite de chía/almidón generó una disminución en el rendimiento del proceso de complejación y promovió la formación de complejos con un mayor porcentaje de ácido  $\alpha$ -linolénico. Adicionalmente, la incorporación de una etapa de tratamiento con ultrasonido favoreció la complejación de los ácidos grasos de chía, cuya distribución porcentual en los complejos varió dependiendo de la relación hidrolizado/almidón inicial.

- En los complejos templados a 90 °C durante 2 h, tanto el aumento de la relación H/S por encima de 10% como la aplicación de ultrasonido provocaron una disminución en su capacidad de proteger a los ácidos grasos de chía frente al deterioro oxidativo.
- Los resultados obtenidos en los complejos formados sin la aplicación de la etapa de templado sugirieron que la omisión de dicho tratamiento permitió acortar el tiempo de obtención de los mismos, minimizó la degradación de los ácidos grasos esenciales de chía durante la complejación y favoreció la interacción de la amilosa con el ácido  $\alpha$ -linolénico.
- Entre los complejos obtenidos bajo las distintas condiciones operativas evaluadas, aquellos formados sin templado con 20% de relación másica hidrolizado/almidón y sin la aplicación de ultrasonido (CI20) fueron los que presentaron la mayor estabilidad oxidativa acelerada, exhibiendo el mejor comportamiento preliminar como sistema de vehiculización de ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 de chía.
- Se logró la fortificación de una sopa instantánea comercial con ácidos grasos esenciales  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6, a través de la adición de complejos de inclusión amilosa-ácidos grasos de chía, los cuales actuaron como sistemas de provisión de dichos ingredientes funcionales.
- La incorporación de los complejos generó un aumento de la fluidez de las premezclas de sopa en polvo, no modificó el tiempo de dispersión y provocó una disminución de la pseudoplasticidad y de la viscosidad aparente en relación a la sopa comercial. A su vez, se detectaron diferencias leves a moderadas en la apariencia, el aroma y la consistencia entre las sopas con complejos y la sopa comercial.
- Los resultados encontrados en el estudio de digestibilidad *in vitro* sugirieron que los complejos, tanto en estado libre como incorporados en la sopa, fueron estables bajo las condiciones estomacales y mostraron una degradación selectiva del material complejante (almidón) en el intestino, en concordancia con el comportamiento esperado para un sistema de vehiculización. Además, se detectó una liberación de 18-20% de ácido  $\alpha$ -linolénico al finalizar la etapa intestinal, la cual ocurrió en respuesta

a la acción de las enzimas digestivas y no varió cuando los complejos se incorporaron a la matriz alimentaria.

- Los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Tesis contribuyen con interesante información acerca de las propiedades de los complejos de inclusión con amilosa como sistemas de vehiculización de ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 provenientes del aceite de chía, contribuyendo a la revalorización de esta especie vegetal en la industria alimentaria mediante el desarrollo de alimentos funcionales, con beneficios potenciales para el consumidor.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

En virtud de lo expuesto en el presente Trabajo de Tesis, se detallan a continuación las siguientes perspectivas futuras:

- Evaluar la aplicación de otras metodologías analíticas (tales como el índice de peróxidos, entre otras) que permitan monitorear la estabilidad oxidativa de los complejos de inclusión, bajo condiciones de degradación tanto aceleradas como a tiempo real.
- Evaluar la aceptabilidad sensorial de las sopas adicionadas con complejos de inclusión por parte de los consumidores, como complemento del ensayo de diferencia con el control y de la prueba de ordenamiento realizados.
- Estudiar la incorporación de los complejos amilosa-ácidos grasos de chía en la formulación de otra matriz alimentaria, que involucre el empleo de condiciones drásticas de procesamiento y/o preparación, como puede ser la aplicación de altas temperaturas durante tiempos prolongados de cocción.
- Evaluar otro sistema de vehiculización de aceite de chía a base de almidón, tales como emulsiones *pickering*, para su aplicación en el desarrollo de alimentos funcionales.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Adekunte, A. O., Tiwari, B. K., Cullen, P. J., Scannell, A. G. M., y O'Donnell, C. P. (2010). Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. *Food Chemistry*, 122(3), 500–507.
- Ades, H., Kesselman, E., Ungar, Y., y Shimoni, E. (2012). Complexation with starch for encapsulation and controlled release of menthone and menthol. *LWT - Food Science and Technology*, 45(2), 277–288.
- Alcázar-Alay, S. C., y Meireles, M. A. A. (2015). Physicochemical properties, modifications and applications of starches from different botanical sources. *Food Science and Technology*, 35(2), 215–236.
- Amoako, D. B., y Awika, J. M. (2019). Resistant starch formation through intrahelical V-complexes between polymeric proanthocyanidins and amylose. *Food Chemistry*, 285, 326–333.
- AOCS. (1997a). AOCS Official Method Ca 5a-40. En *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*.
- AOCS. (1997b). AOCS Official Method Cd 8-53. En *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*.
- AOCS. (2024). *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS*. [https://library.aocs.org/all\\_methods/](https://library.aocs.org/all_methods/)
- Ayerza, R. (1995). Oil content and fatty acid composition of chia (*Salvia hispanica* L.) from five northwestern locations in Argentina. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72(9), 1079–1081.
- Ayerza, R., y Coates, W. (1996). *New industrial crops: Northwestern Argentina Regional Project*.
- Ayerza, R., y Coates, W. (2005). Chia: rediscovering a forgotten crop of the Aztecs. En *The University of Arizona Press*.
- Ayerza, R., y Coates, W. (2009). Influence of environment on growing period and yield,

- protein, oil and  $\alpha$ -linolenic content of three chia (*Salvia hispanica* L.) selections. *Industrial Crops and Products*, 30(2), 321–324.
- Bamidele, O. P., Duodu, K. G., y Emmambux, M. N. (2017). Encapsulation and antioxidant activity of ascorbyl palmitate with maize starch during pasting. *Carbohydrate Polymers*, 166, 202–208.
- Bamidele, O. P., Duodu, K. G., y Emmambux, M. N. (2019). Encapsulation and antioxidant activity of ascorbyl palmitate with normal and high amylose maize starch by spray drying. *Food Hydrocolloids*, 86, 124–133.
- Bañares, C., Martín, D., Reglero, G., y Torres, C. F. (2019). Protective effect of hydroxytyrosol and rosemary extract in a comparative study of the oxidative stability of Echim oil. *Food Chemistry*, 290, 316–323.
- Banks, W., y Greenwood, C. T. (1971). The Conformation of Amylose in Dilute Solution. *Starch - Stärke*, 23(9), 300–314.
- Belitz, H. D., Grosch, W., y Schieberle, P. (2009). Food chemistry. En *Food Chemistry* (4th ed.). Springer.
- Bhandari, B., Bansal, N., Zhang, M., y Schuck, P. (2013). Handbook of Food Powders: Processes and Properties. En *Handbook of Food Powders: Processes and Properties*.
- Biesalski, H. K., Dragsted, L. O., Elmadfa, I., Grossklaus, R., Müller, M., Schrenk, D., Walter, P., y Weber, P. (2009). Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition*, 25(11–12), 1202–1205.
- Biliaderis, C. G., y Galloway, G. (1989). Crystallization behavior of amylose-V complexes: structure-property relationships. *Carbohydrate Research*, 189, 31–48.
- Bordón, M. G., Paredes, A. J., Camacho, N. M., Penci, M. C., González, A., Palma, S. D., Ribotta, P. D., y Martínez, M. L. (2021). Formulation, spray-drying and physicochemical characterization of functional powders loaded with chia seed oil and prepared by complex coacervation. *Powder Technology*, 391, 479–493.
- Borneo, R., Aguirre, A., y León, A. E. (2010). Chia (*Salvia hispanica* L) Gel Can Be Used as Egg or Oil Replacer in Cake Formulations. *Journal of the American Dietetic*

*Association*, 110(6), 946–949.

Bottom, R. (2008). Thermogravimetric Analysis. En *Principles and Applications of Thermal Analysis* (pp. 87–118).

Britannica. (2024). *X-ray diffraction | Definition, Diagram, Equation, & Facts*.  
<https://www.britannica.com/science/X-ray-diffraction>

Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991–1014.

Buanz, A. (2021). Powder characterization. En *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (pp. 295–305). Academic Press.

Bunaciu, A. A., Udriștioiu, E. gabriela, y Aboul-Enein, H. Y. (2015). X-Ray Diffraction: Instrumentation and Applications. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 45(4), 289–299.

Campelo, P. H., Sant'Ana, A. S., y Pedrosa Silva Clerici, M. T. (2020). Starch nanoparticles: production methods, structure, and properties for food applications. *Current Opinion in Food Science*, 33, 136–140.

Cao, Z., Woortman, A. J. J., Rudolf, P., y Loos, K. (2015). Facile Synthesis and Structural Characterization of Amylose-Fatty Acid Inclusion Complexes. *Macromolecular Bioscience*, 15(5), 691–697.

Carvalho, P. de O., Campos, P. R. B., Noffs, M. D., Oliveira, J. G. de, Shimizu, M. T., y Silva, D. M. da. (2003). Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Química Nova*, 26(1), 75–80.

Castejón, N., Moreno-Pérez, S., Abreu Silveira, E., Fernández Lorente, G., Guisán, J. M., y Señoráns, F. J. (2019). Synthesis of omega-3 ethyl esters from chia oil catalyzed by polyethylene glycol-modified lipases with improved stability. *Food Chemistry*, 271, 433–439.

Cervantes-Ramírez, J. E., Cabrera-Ramirez, A. H., Morales-Sánchez, E., Rodriguez-

- García, M. E., De La, M., Reyes-Vega, L., Ramírez-Jiménez, A. K., Contreras-Jiménez, B. L., y Gaytán-Martínez, M. (2020). Amylose-lipid complex formation from extruded maize starch mixed with fatty acids. *Carbohydrate Polymers*, 246, 116555.
- Chai, Y., Wang, M., y Zhang, G. (2013). Interaction between Amylose and Tea Polyphenols Modulates the Postprandial Glycemic Response to High-Amylose Maize Starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 8608–8615.
- Chan, H. T., Bhat, R., y Karim, A. A. (2010). Effects of sodium dodecyl sulphate and sonication treatment on physicochemical properties of starch. *Food Chemistry*, 120(3), 703–709.
- Chao, C., Yu, J., Wang, S., Copeland, L., y Wang, S. (2018). Mechanisms Underlying the Formation of Complexes between Maize Starch and Lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(1), 272–278.
- Chemat, F., Grondin, I., Costes, P., Moutoussamy, L., Sing, A. S. C., y Smadja, J. (2004). High power ultrasound effects on lipid oxidation of refined sunflower oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11(5), 281–285.
- Chen, B., Jia, X., Miao, S., Zeng, S., Guo, Z., Zhang, Y., y Zheng, B. (2018). Slowly digestible properties of lotus seed starch-glycerine monostearin complexes formed by high pressure homogenization. *Food Chemistry*, 252, 115–125.
- Chen, B., Zeng, S., Zeng, H., Guo, Z., Zhang, Y., y Zheng, B. (2017). Properties of lotus seed starch–glycerin monostearin complexes formed by high pressure homogenization. *Food Chemistry*, 226, 119–127.
- Código Alimentario Argentino. (2023a). Capítulo VII Alimentos Grasos Aceites Alimenticios. En *Código Alimentario Argentino*.
- Código Alimentario Argentino. (2023b). Capítulo XIX Harinas, Concentrados, Aislados y Derivados Proteínicos. En *Código Alimentario Argentino*.
- Código Alimentario Argentino. (2024a). Capítulo VI Alimentos Cárneos y Afines. En *Código Alimentario Argentino*.
- Código Alimentario Argentino. (2024b). Capítulo XVII Alimentos de Régimen o

Dietéticos. En *Código Alimentario Argentino*.

- Copado, C. N., Diehl, B. W. K., Ixtaina, V. Y., y Tomás, M. C. (2017). Application of Maillard reaction products on chia seed oil microcapsules with different core/wall ratios. *LWT - Food Science and Technology*, *86*, 408–417.
- Copado, C. N., Julio, L. M., Diehl, B. W. K., Ixtaina, V. Y., y Tomás, M. C. (2021). Multilayer microencapsulation of chia seed oil by spray-drying using electrostatic deposition technology. *LWT*, *152*, 112206.
- da Silveira Ramos, I. F., Magalhães, L. M., do O Pessoa, C., Pinheiro Ferreira, P. M., dos Santos Rizzo, M., Osajima, J. A., Silva-Filho, E. C., Nunes, C., Raposo, F., Coimbra, M. A., Ribeiro, A. B., y Costa, M. P. (2021). New properties of chia seed mucilage (*Salvia hispanica* L.) and potential application in cosmetic and pharmaceutical products. *Industrial Crops and Products*, *171*, 113981.
- de Campo, C., dos Santos, P. P., Costa, T. M. H., Paese, K., Guterres, S. S., Rios, A. de O., y Flôres, S. H. (2017). Nanoencapsulation of chia seed oil with chia mucilage (*Salvia hispanica* L.) as wall material: Characterization and stability evaluation. *Food Chemistry*, *234*, 1–9.
- Deladino, L., Navarro, A. S., y Martino, M. N. (2013). Carrier systems for yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) to enrich instant soups. Release mechanisms under different pH conditions. *LWT - Food Science and Technology*, *53*(1), 163–169.
- Di Marco, A. E., Ixtaina, V. Y., y Tomás, M. C. (2022). Analytical and technological aspects of amylose inclusion complexes for potential applications in functional foods. *Food Bioscience*, *47*, 101625.
- Di Marco, A. E., Ixtaina, V. Y., y Tomás, M. C. (2023). Effect of ligand concentration and ultrasonic treatment on inclusion complexes of high amylose corn starch with chia seed oil fatty acids. *Food Hydrocolloids*, *136*, 108222.
- Eliasson, A. C. (1994). Interactions between starch and lipids studied by DSC. *Thermochimica Acta*, *246*(2), 343–356.
- Eliasson, A. C. (2004). *Starch in food: Structure, function and applications*. CRC press.
- Fanta, G. F., Felker, F. C., Shogren, R. L., y Salch, J. H. (2008). Preparation of spherulites

- from jet cooked mixtures of high amylose starch and fatty acids. Effect of preparative conditions on spherulite morphology and yield. *Carbohydrate Polymers*, 71(2), 253–262.
- Fanta, G. F., Kenar, J. A., Byars, J. A., Felker, F. C., y Shogren, R. L. (2010). Properties of aqueous dispersions of amylose-sodium palmitate complexes prepared by steam jet cooking. *Carbohydrate Polymers*, 81, 645–651.
- Fanta, G. F., Kenar, J. A., y Felker, F. C. (2015). Nanoparticle formation from amylose-fatty acid inclusion complexes prepared by steam jet cooking. *Industrial Crops and Products*, 74, 36–44.
- Fanta, G. F., Shogren, R. L., y Salch, J. H. (1999). Steam jet cooking of high-amylose starch-fatty acid mixtures. An investigation of complex formation. *Carbohydrate Polymers*, 38(1), 1–6.
- Fathi, M., Martín, Á., y McClements, D. J. (2014). Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 39(1), 18–39.
- Frankel, E. N. (2005). *Lipid Oxidation* (2nd ed.). The Oily Press.
- Freitas, L., Bueno, T., Perez, V. H., Santos, J. C., y De Castro, H. F. (2007). Enzymatic hydrolysis of soybean oil using lipase from different sources to yield concentrated of polyunsaturated fatty acids. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(12), 1725–1731.
- Fu, Z., Chen, J., Luo, J., Liu, C.-M., y Liu, W. (2015). Effect of food additives on starch retrogradation: A review. *Starch-Stärke*, 67(1–2), 69–78.
- Gallant, D. J., Bouchet, B., y Baldwin, P. M. (1997). Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. *Carbohydrate Polymers*, 32(3–4), 177–191.
- Gallo, L. R. dos R., Assunção Botelho, R. B., Ginani, V. C., de Lacerda de Oliveira, L., Riquette, R. F. R., y Leandro, E. dos S. (2020). Chia (*Salvia hispanica* L.) Gel as Egg Replacer in Chocolate Cakes: Applicability and Microbial and Sensory Qualities After Storage. *Journal of Culinary Science & Technology*, 18(1), 29–39.
- Gao, Q., Zhang, B., Qiu, L., Fu, X., y Huang, Q. (2020). Ordered structure of starch

- inclusion complex with C10 aroma molecules. *Food Hydrocolloids*, 108, 105969.
- Garti, N., y McClements, D. J. (2012). *Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Gill, P., Moghadam, T. T., y Ranjbar, B. (2010). Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience. *Journal of Biomolecular Techniques : JBT*, 21(4), 167.
- Gökmen, V., Mogol, B. A., Lumaga, R. B., Fogliano, V., Kaplun, Z., y Shimoni, E. (2011). Development of functional bread containing nanoencapsulated omega-3 fatty acids. *Journal of Food Engineering*, 105(4), 585–591.
- Grancieri, M., Martino, H. S. D., y Gonzalez de Mejia, E. (2019). Chia Seed (*Salvia hispanica* L.) as a Source of Proteins and Bioactive Peptides with Health Benefits: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(2), 480–499.
- Guillen, M. D., y Cabo, N. (1997). Infrared Spectroscopy in the Study of Edible Oils and Fats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75(1), 1–11.
- Gunenc, A., Kong, L., Elias, R. J., y Ziegler, G. R. (2018). Inclusion complex formation between high amylose corn starch and alkylresorcinols from rye bran. *Food Chemistry*, 259, 1–6.
- Guo, J., y Kong, L. (2022). Enhancement of enzymatic resistance in V-type starch inclusion complexes by hydrothermal treatments. *Food Hydrocolloids*, 127, 107533.
- Guo, J., Ziegler, G. R., y Kong, L. (2022). Polymorphic transitions of V-type amylose upon hydration and dehydration. *Food Hydrocolloids*, 125, 107372.
- Guo, T., Hou, H., Liu, Y., Chen, L., y Zheng, B. (2021). In vitro digestibility and structural control of rice starch-unsaturated fatty acid complexes by high-pressure homogenization. *Carbohydrate Polymers*, 256, 117607.
- Guo, Z., Jia, X., Miao, S., Chen, B., Lu, X., y Zheng, B. (2018). Structural and thermal properties of amylose–fatty acid complexes prepared via high hydrostatic pressure. *Food Chemistry*, 264, 172–179.

- Guo, Z., Zeng, S., Lu, X., Zhou, M., Zheng, M., y Zheng, B. (2015). Structural and physicochemical properties of lotus seed starch treated with ultra-high pressure. *Food Chemistry*, *186*, 223–230.
- Guo, Z., Zeng, S., Zhang, Y., Lu, X., Tian, Y., y Zheng, B. (2015). The effects of ultra-high pressure on the structural, rheological and retrogradation properties of lotus seed starch. *Food Hydrocolloids*, *44*, 285–291.
- Gurr, M. I., y Harwood, J. L. (1991). Fatty acid structure and metabolism. En *Lipid Biochemistry. An introduction* (pp. 29–33). Springer-Science+Business Media, B.V.
- Gutiérrez, T. J., y Tovar, J. (2021). Update of the concept of type 5 resistant starch (RS5): Self-assembled starch V-type complexes. *Trends in Food Science & Technology*, *109*, 711–724.
- Han, S., Hao, Z., Hu, Y., Li, C., Wang, Y., Gu, Z., Zhang, Q., Xiao, Y., Liu, Y., Liu, K., Zheng, M., Zhou, Y., y Yu, Z. (2023). Changes in morphological and structural characteristics of high amylose maize starch in alkaline solution at different temperatures. *International Journal of Biological Macromolecules*, *244*, 125397.
- Hanan, E., Rudra, S. G., Sagar, V. R., y Sharma, V. (2020). Utilization of pea pod powder for formulation of instant pea soup powder. *Journal of Food Processing and Preservation*, *44*(11), e14888.
- Holm, J., Björck, I., Ostrowska, S., Eliasson, A. C., Asp, N. G., Larsson, K., y Lundquist, I. (1983). Digestibility of Amylose-Lipid Complexes in-vitro and in-vivo. *Starch - Stärke*, *35*(9), 294–297.
- Hrnčič, M. K., Ivanovski, M., Cör, D., y Knez, Ž. (2020). Chia Seeds (*Salvia Hispanica* L.): An overview-phytochemical profile, isolation methods, and application. En *Molecules* (Vol. 25, Número 1). MDPI AG.
- Hu, M., y Jacobsen, C. (2016). *Oxidative Stability and Shelf Life of Foods Containing Oils and Fats*. Elsevier.
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., y McClements, D. J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, *125*(1), 1–12.
- Inkson, B. J. (2016). Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron

- microscopy (TEM) for materials characterization. *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*, 17–43.
- Isaschar-Ovdat, S., Shani-Levi, C., y Lesmes, U. (2021). Capsaicin stability and bio-accessibility affected by complexation with high-amylose corn starch (HACS). *Food & Function*, 12(15), 6992–7000.
- Ixtaina, V. Y. (2010). *Caracterización de la semilla y el aceite de chía (Salvia hispanica L.) obtenido mediante distintos procesos: aplicación en tecnología de alimentos*.
- Ixtaina, V. Y., Martínez, M. L., Spotorno, V., Mateo, C. M., Maestri, D. M., Diehl, B. W. K., Nolasco, S. M., y Tomás, M. C. (2011). Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(2), 166–174.
- Jain, S., y Sharma, M. P. (2011). Measurement of the Oxidation Stability of Biodiesel Using a Modified Karl Fischer Apparatus. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(7), 899–905.
- Jane, J. L., y Robyt, J. F. (1984). Structure studies of amylose-V complexes and retrograded amylose by action of alpha amylases, and a new method for preparing amyloextrins. *Carbohydrate Research*, 132(1), 105–118.
- Kang, N., Zuo, Y. J., Hilliou, L., Ashokkumar, M., y Hemar, Y. (2016). Viscosity and hydrodynamic radius relationship of high-power ultrasound depolymerised starch pastes with different amylose content. *Food Hydrocolloids*, 52, 183–191.
- Kang, X., Liu, P., Gao, W., Wu, Z., Yu, B., Wang, R., Cui, B., Qiu, L., y Sun, C. (2020). Preparation of starch-lipid complex by ultrasonication and its film forming capacity. *Food Hydrocolloids*, 99, 105340.
- Kang, X., Yu, B., Zhang, H., Sui, J., Guo, L., Abd El-Aty, A. M., y Cui, B. (2021). The formation and in vitro enzymatic digestibility of starch-lipid complexes in steamed bread free from and supplemented with different fatty acids: Effect on textural and retrogradation properties during storage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 166, 1210–1219.
- Kanicky, J. R., y Shah, D. O. (2002). Effect of degree, type, and position of unsaturation

- on the pKa of long-chain fatty acids. *Journal of Colloid and Interface Science*, 256(1), 201–207.
- Karkalas, J., Ma, S., Morrison, W. R., y Pethrick, R. A. (1995). Some factors determining the thermal properties of amylose inclusion complexes with fatty acids. *Carbohydrate Research*, 268(2), 233–247.
- Karkalas, J., y Raphaelides, S. (1986). Quantitative aspects of amylose-lipid interactions. *Carbohydrate Research*, 157(C), 215–234.
- Kenar, J. A., Compton, D. L., Little, J. A., y Peterson, S. C. (2016). Formation of inclusion complexes between high amylose starch and octadecyl ferulate via steam jet cooking. *Carbohydrate Polymers*, 140, 246–252.
- Kim, H. Y., Park, S. S., y Lim, S. T. (2015). Preparation, characterization and utilization of starch nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 126, 607–620.
- Klinkesorn, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., McClements, D. J., y Decker, E. A. (2005). Stability of spray-dried tuna oil emulsions encapsulated with two-layered interfacial membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(21), 8365–8371.
- Kong, L., Perez-Santos, D. M., y Ziegler, G. R. (2019). Effect of guest structure on amylose-guest inclusion complexation. *Food Hydrocolloids*, 97, 105188.
- Kong, L., y Ziegler, G. R. (2014a). Formation of starch-guest inclusion complexes in electrospun starch fibers. *Food Hydrocolloids*, 38, 211–219.
- Kong, L., y Ziegler, G. R. (2014b). Molecular encapsulation of ascorbyl palmitate in preformed V-type starch and amylose. *Carbohydrate Polymers*, 111, 256–263.
- Kulczyński, B., Kobus-Cisowska, J., Taczanowski, M., Kmiecik, D., y Gramza-Michałowska, A. (2019). The Chemical Composition and Nutritional Value of Chia Seeds—Current State of Knowledge. *Nutrients*, 11(6), 1242.
- Lalush, I., Bar, H., Zakaria, I., Eichler, S., y Shimoni, E. (2005). Utilization of amylose-lipid complexes as molecular nanocapsules for conjugated linoleic acid. *Biomacromolecules*, 6(1), 121–130.

- Lay Ma, U. V., Floros, J. D., y Ziegler, G. R. (2011). Formation of inclusion complexes of starch with fatty acid esters of bioactive compounds. *Carbohydrate Polymers*, 83(4), 1869–1878.
- Le-Bail, P., Houinsou-Houssou, B., Kosta, M., Pontoire, B., Gore, E., y Le-Bail, A. (2015). Molecular encapsulation of linoleic and linolenic acids by amylose using hydrothermal and high-pressure treatments. *Food Research International*, 67, 223–229.
- Le, C. A. K., Ogawa, Y., Dubreuil, F., Grimaud, F., Mazeau, K., Ziegler, G. R., Tanwar, S., Nishiyama, Y., Potocki-Veronese, G., Choisnard, L., Wouessidjewe, D., y Putaux, J. L. (2021). Crystal and molecular structure of V-amylose complexed with ibuprofen. *Carbohydrate Polymers*, 261, 117885.
- Lee, H.-S., Kim, K.-H., Park, S.-H., Hur, S.-W., y Auh, J.-H. (2020). Amylose-Lipid Complex as a Fat Replacement in the Preparation of Low-Fat White Pan Bread. *Foods*, 9(2), 194.
- Lei, M., Jiang, F. C., Cai, J., Hu, S., Zhou, R., Liu, G., Wang, Y. H., Wang, H. B., He, J. R., y Xiong, X. G. (2018). Facile microencapsulation of olive oil in porous starch granules: Fabrication, characterization, and oxidative stability. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 755–761.
- Lesmes, U., Barchechath, J., y Shimoni, E. (2008). Continuous dual feed homogenization for the production of starch inclusion complexes for controlled release of nutrients. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(4), 507–515.
- Lesmes, U., Cohen, S. H., Shener, Y., y Shimoni, E. (2009). Effects of long chain fatty acid unsaturation on the structure and controlled release properties of amylose complexes. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 667–675.
- Lesmes, U., y McClements, D. J. (2009). Structure-function relationships to guide rational design and fabrication of particulate food delivery systems. *Trends in Food Science and Technology*, 20(10), 448–457.
- Li, H., Gidley, M. J., y Dhital, S. (2019). High-Amylose Starches to Bridge the “Fiber Gap”: Development, Structure, and Nutritional Functionality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(2), 362–379.

- Li, X., Li, Y., Yang, F., Liu, R., Zhao, C., Jin, Q., y Wang, X. (2019). Oxidation degree of soybean oil at induction time point under Rancimat test condition: Theoretical derivation and experimental observation. *Food Research International*, *120*, 756–762.
- Li, X., Luo, S., Hou, Y., Liu, Y., Hu, X., y Liu, C. (2020). Effect of triglyceride on complexation between starch and fatty acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, *155*, 1069–1074.
- Li, Y. X., y Lim, S. T. (2016). Preparation of aqueous alpha-lipoic acid dispersions with octenylsuccinylated high amylose starch. *Carbohydrate Polymers*, *140*, 253–259.
- Li, Y. X., Park, E. Y., y Lim, S. T. (2018). Stabilization of alpha-lipoic acid by complex formation with octenylsuccinylated high amylose starch. *Food Chemistry*, *242*, 389–394.
- Lin, K.-Y., Daniel, J. R., y Whistler, R. L. (1994). Structure of chia seed polysaccharide exudate. *Carbohydrate Polymers*, *23*, 13–18.
- Lin, R., Wu, K., Chai, X., y Zhong, S. (2011). The study of the preparation of linolenic acid-amylose complexes and their oxidation stability. *Advanced Materials Research*, *317–319*, 194–200.
- Liu, B., Zhong, F., Yokoyama, W., Huang, D., Zhu, S., y Li, Y. (2020). Interactions in starch co-gelatinized with phenolic compound systems: Effect of complexity of phenolic compounds and amylose content of starch. *Carbohydrate Polymers*, *247*, 116667.
- Liu, P., Wang, R., Kang, X., Cui, B., y Yu, B. (2018). Effects of ultrasonic treatment on amylose-lipid complex formation and properties of sweet potato starch-based films. *Ultrasonics Sonochemistry*, *44*, 215–222.
- Liu, S., Kong, L., Huang, T., Wei, X., Tan, L., Luo, H., y Zhang, H. (2023). Encapsulation in Amylose Inclusion Complex Enhances the Stability and Release of Vitamin D. *Nutrients*, *15*(5), 1111.
- Lopez-Rubio, A., Flanagan, B. M., Gilbert, E. P., y Gidley, M. J. (2008). A novel approach for calculating starch crystallinity and its correlation with double helix

- content: A combined XRD and NMR study. *Biopolymers*, 89(9), 761–768.
- Lopez-Rubio, A., Flanagan, B. M., Shrestha, A. K., Gidley, M. J., y Gilbert, E. P. (2008). Molecular Rearrangement Of Starch During In Vitro Digestion: Toward A Better Understanding Of Enzyme Resistant Starch Formation In Processed Starches. *Biomacromolecules*, 9(7), 1951–1958.
- Lv, R., Qi, L., Zou, Y., Zou, J., Luo, Z., Shao, P., y Tamer, T. M. (2019). Preparation and structural properties of amylose complexes with quercetin and their preliminary evaluation in delivery application. *International Journal of Food Properties*, 22(1), 1445–1462.
- Marinopoulou, A., Kalogianni, E. P., y Raphaelides, S. N. (2016). Amylose-fatty acid inclusion complexes as examined by interfacial tension measurements. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 137, 133–137.
- Marinopoulou, A., Karageorgiou, V., Iordanidis, C., Dagklis, A., Zoumakis, N., y Raphaelides, S. N. (2021). Parametric analysis of the spray drying process for the production of starch molecular inclusion complexes with fatty acids. *Drying Technology*, 39(5), 580–595.
- Marinopoulou, A., Karageorgiou, V., Papastergiadis, E., Iordanidis, C., Dagklis, A., y Raphaelides, S. N. (2019). Production of spray-dried starch molecular inclusion complexes on an industrial scale. *Food and Bioproducts Processing*, 116, 186–195.
- Marinopoulou, A., Karageorgiou, V., Petridis, D., y Raphaelides, S. N. (2020). Physical properties of starch-paracetamol molecular inclusion complexes produced by the spray drying process on an industrial scale. *Drying Technology*, 1–18.
- Marinopoulou, A., Papastergiadis, E., y Raphaelides, S. N. (2016). An investigation into the structure, morphology and thermal properties of amylo maize starch-fatty acid complexes prepared at different temperatures. *Food Research International*, 90, 111–120.
- Marinopoulou, A., Papastergiadis, E., y Raphaelides, S. N. (2019). Inclusion Complexes of Non-Granular Maize Starch with Fatty Acids and Ibuprofen. A Comparative Study of Their Morphology and Structure. *Starch/Staerke*, 71(1–2), 1–12.

- Marinopoulou, A., Papastergiadis, E., Raphaelides, S. N., y Kontominas, M. G. (2016a). Morphological characteristics, oxidative stability and enzymic hydrolysis of amylose-fatty acid complexes. *Carbohydrate Polymers*, *141*, 106–115.
- Marinopoulou, A., Papastergiadis, E., Raphaelides, S. N., y Kontominas, M. G. (2016b). Structural characterization and thermal properties of amylose-fatty acid complexes prepared at different temperatures. *Food Hydrocolloids*, *58*, 224–234.
- Marinopoulou, A., Zoumaki, M., Goulas, A., Petridis, D., Raphaelides, S., Aslampaloglou, A., Tzikas, A., y Karageorgiou, V. (2022). Functional Characteristics and Physical Properties of Spray Dried Starch Inclusion Complexes with Drugs. *Starch - Stärke*, *74*(1–2), 2100176.
- Mariscal-Moreno, R. M., Figueroa-Cárdenas, J. de D., Santiago-Ramos, D., y Rayas-Duarte, P. (2019). Amylose lipid complexes formation as an alternative to reduce amylopectin retrogradation and staling of stored tortillas. *International Journal of Food Science & Technology*, *54*(5), 1651–1657.
- Márquez-Ruiz, G., Martín-Polvillo, M., Velasco, J., y Dobarganes, C. (2008). Formation of oxidation compounds in sunflower and olive oils under oxidative stability index conditions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *110*(5), 465–471.
- McClements, D. J. (2018). Delivery by Design (DbD): A Standardized Approach to the Development of Efficacious Nanoparticle- and Microparticle-Based Delivery Systems. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *17*(1), 200–219.
- McClements, D. J. (2021). Food hydrocolloids: Application as functional ingredients to control lipid digestion and bioavailability. *Food Hydrocolloids*, *111*, 106404.
- McClements, D. J., Decker, E. A., Park, Y., y Weiss, J. (2008). Designing food structure to control stability, digestion, release and absorption of lipophilic food components. *Food Biophysics*, *3*(2), 219–228.
- McClements, D. J., Decker, E. A., Park, Y., y Weiss, J. (2009). Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *49*(6), 577–606.
- Mendes, A. A., Oliveira, P. C., y De Castro, H. F. (2012). Properties and biotechnological

- applications of porcine pancreatic lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 78, 119–134.
- Mendes, E., y Duarte, N. (2021). Mid-Infrared Spectroscopy as a Valuable Tool to Tackle Food Analysis: A Literature Review on Coffee, Dairies, Honey, Olive Oil and Wine. *Foods*, 10(2), 477.
- Meng, S., Ma, Y., Cui, J., y Sun, D. W. (2014). Preparation of corn starch-fatty acid complexes by high-pressure homogenization. *Starch-Stärke*, 66(9–10), 809–817.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carri, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, L. S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., ... Jorge, I. P. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113–1124.
- Monroy, Y. (2021). *Desarrollo de bioadhesivos a base de almidones modificados con aplicaciones potenciales en el área de envases* [Universidad Nacional de La Plata].
- Morales, J. P., Valenzuela, R. B., González, D. M., González, M. E., Tapia, G. O., Sanhueza, J. C., y Valenzuela, A. B. (2012). Nuevas fuentes dietarias de ácido alfa-linolénico: una visión crítica. *Revista chilena de nutrición*, 39(3), 79–87.
- MordorIntelligence. (2024). *Chia Seeds Market Size & Share Analysis - Growth Trends & Forecasts (2024-2029)*. <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/chia-seeds-market>
- Morrison, W. R., y Laignelet, B. (1983). An improved colorimetric procedure for determining apparent and total amylose in cereal and other starches. *Journal of Cereal Science*, 1(1), 9–20.
- Muñoz, L. A., Cobos, A., Diaz, O., y Aguilera, J. M. (2012). Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration. *Journal of Food Engineering*, 108(1), 216–224.
- Ninčević Grassino, A., Rimac Brnčić, S., Badanjak Sabolović, M., Šic Žlabur, J., Marović, R., y Brnčić, M. (2023). Carotenoid Content and Profiles of Pumpkin Products and By-Products. *Molecules*, 28(2), 858.
- Nishiyama, Y., Mazeau, K., Morin, M., Cardoso, M. B., Chanzy, H., y Putaux, J. L.

- (2010). Molecular and crystal structure of 7-fold V-amylose complexed with 2-propanol. *Macromolecules*, 43(20), 8628–8636.
- Obadi, M., Qi, Y., y Xu, B. (2023). High-amylose maize starch: Structure, properties, modifications and industrial applications. *Carbohydrate Polymers*, 299, 120185.
- Obiro, W. C., Sinha Ray, S., y Emmambux, M. N. (2012). V-amylose Structural Characteristics, Methods of Preparation, Significance, and Potential Applications. *Food Reviews International*, 28(4), 412–438.
- Oostveen, M. L. M., Meesters, G. M. H., y van Ommen, J. R. (2015). Quantification of powder wetting by drop penetration time. *Powder Technology*, 274, 62–66.
- Orona-Tamayo, D., y Paredes-López, O. (2024). Chia-The New Golden Seed for the 21st Century: Nutraceutical Properties and Technological Uses. En *Sustainable Protein Sources* (pp. 443–470). Academic Press.
- Oyeyinka, S. A., Singh, S., Ma, Y., y Amonsou, E. O. (2016). Effect of high-pressure homogenization on structural, thermal and rheological properties of bambara starch complexed with different fatty acids. *RSC Advances*, 6(83), 80174–80180.
- Panyoo, A. E., y Emmambux, M. N. (2017). Amylose–lipid complex production and potential health benefits: A mini-review. *Starch/Staerke*, 69(7–8), 1–7.
- Park, E. Y., Choi, S. M., Lim, S. T., y Kim, J. Y. (2018). Effects of dextrinization and octenylsuccinylation of high amylose starch on complex formation with  $\omega$ -3 fatty acids (EPA/DHA). *Food Hydrocolloids*, 77, 357–362.
- Peleg, M. (1977). Flowability of food powders and methods for its evaluation—a review. *Journal of Food Process Engineering*, 1(4), 303–328.
- Piloni, R. V., Bordón, M. G., Barrera, G. N., Martínez, M. L., y Ribotta, P. D. (2022). Porous Microparticles of Corn Starch as Bio-Carriers for Chia Oil. *Foods*, 11(24), 4022.
- Putseys, J. A., Lamberts, L., y Delcour, J. A. (2010). Amylose-inclusion complexes: Formation, identity and physico-chemical properties. *Journal of Cereal Science*, 51(3), 238–247.

- Raphaelides, S., y Karkalas, J. (1988). Thermal dissociation of amylose-fatty acid complexes. *Carbohydrate Research*, 172(1), 65–82.
- Raphaelides, S. N., Dimitreli, G., Exarhopoulos, S., Iliá, E., y Koutsomihali, P. (2015). A process designed for the continuous production of starch inclusion complexes on an industrial scale. *Food and Bioproducts Processing*, 96, 245–255.
- Raphaelides, S. N., Dimitreli, G., Exarhopoulos, S., Mintzas, D., y Lykidou, A. (2012). Effect of processing conditions on the physicochemical and structural characteristics of pregelatinised starch–fatty acid–glycerol extrudates. *Carbohydrate Polymers*, 88(1), 282–289.
- Raza, H., Ameer, K., Ren, X., Liang, Q., Chen, X., Chen, H., y Ma, H. (2021). Physicochemical properties and digestion mechanism of starch-linoleic acid complex induced by multi-frequency power ultrasound. *Food Chemistry*, 364, 130392.
- Reyes-Caudillo, E., Tecante, A., y Valdivia-López, M. A. (2008). Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry*, 107(2), 656–663.
- Rodríguez, M. E., Lobo-Zavalía, R. I., Acreche, M. M., Castaldo, V., Pérez, M., Schneider-Teixeira, A., Deladino, L., y Ixtaina, V. Y. (2022). Characterization and Agronomic Evaluation of Chia Germplasm in La Plata, Buenos Aires, Argentina. *Biology and Life Sciences Forum*, 17(1), 16.
- Rostamabadi, H., Falsafi, S. R., y Jafari, S. M. (2019a). Nano-helices of amylose for encapsulation of food ingredients. En *Biopolymer Nanostructures for Food Encapsulation Purposes* (pp. 463–491). Elsevier.
- Rostamabadi, H., Falsafi, S. R., y Jafari, S. M. (2019b). Starch-based nanocarriers as cutting-edge natural cargos for nutraceutical delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 397–415.
- Saldanha, L. G. (2004). *American Dietetic Association*. [www.eatright.org](http://www.eatright.org)202/775-8277FAX202/775-8284
- Seneviratne, H. D., y Biliaderis, C. G. (1991). Action of  $\alpha$ -amylases on amylose-lipid

- complex superstructures. *Journal of Cereal Science*, 13(2), 129–143.
- Seo, T. R., Kim, H. Y., y Lim, S. T. (2016). Preparation and characterization of aqueous dispersions of high amylose starch and conjugated linoleic acid complex. *Food Chemistry*, 211, 530–537.
- Seo, T. R., Kim, J. Y., y Lim, S. T. (2015). Preparation and characterization of crystalline complexes between amylose and C18 fatty acids. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 889–897.
- Seok, J. Y., Lee, D. J., Lim, S. T., y Reddy, C. K. (2019). Preparation and characterization of inclusion complexes between debranched maize starches and conjugated linoleic acid. *Food Hydrocolloids*, 96, 503–509.
- Shabana, S., Prasansha, R., Kalinina, I., Potoroko, I., Bagale, U., y Shirish, S. H. (2019). Ultrasound assisted acid hydrolyzed structure modification and loading of antioxidants on potato starch nanoparticles. *Ultrasonics Sonochemistry*, 51, 444–450.
- Shang, Y., Chao, C., Yu, J., Copeland, L., Wang, S., y Wang, S. (2018). Starch Spherulites Prepared by a Combination of Enzymatic and Acid Hydrolysis of Normal Corn Starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(25), 6357–6363.
- Shi, L., Hopfer, H., Ziegler, G. R., y Kong, L. (2019). Starch-menthol inclusion complex: Structure and release kinetics. *Food Hydrocolloids*, 97, 105183.
- Shi, M., Wang, F., Lan, P., Zhang, Y., Zhang, M., Yan, Y., y Liu, Y. (2021). Effect of ultrasonic intensity on structure and properties of wheat starch-monoglyceride complex and its influence on quality of norther-style Chinese steamed bread. *LWT*, 138, 110677.
- Shittu, T. A., y Lawal, M. O. (2007). Factors affecting instant properties of powdered cocoa beverages. *Food Chemistry*, 100(1), 91–98.
- Simopoulos, A. P. (2009). Omega-6/omega-3 essential fatty acids: biological effects. *World review of nutrition and dietetics*, 99(2), 1–16.
- Simopoulos, A. P. (2011). Importance of the omega-6/omega-3 balance in health and

- disease: Evolutionary aspects of diet. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 102, 10–21.
- Singh, M., Byars, J. A., y Kenar, J. A. (2014). Amylose–Potassium Oleate Inclusion Complex in Plain Set-Style Yogurt. *Journal of Food Science*, 79(5), E822–E827.
- Sosa-Baldivia, A., Ruiz-Ibarra, G., de la Torre, R. R. R., López, R. R., y López, A. M. (2018). The chia (*Salvia hispanica*): Past, present and future of an ancient Mexican crop. *Australian Journal of Crop Science*, 12(10), 1626–1632.
- Sosa-Baldivia, A., Ruiz-Ibarra, G., Gordillo-Sobrino, G. V., Etchevers-Barra, J. D., Sharma, M., Liu, X., y Robles-de la Torre, R. R. (2017). Respuesta de cuatro cultivares de chíá (*Salvia hispanica* L.) a la fertilización nitrogenada en el Petacal, Jalisco, México. *Informaciones Agronómicas Hispanoamérica*, 28, 8–13.
- Sosa, B. A., Ruiz Ibarra, G., Robles de la Torre, R. R., Gordillo Sobrino, G., Sharma, M., y Liu, X. (2017). La chíá mexicana (*Salvia hispanica* L.): su historia e importancia como cultivo mundial. En *Manejo y Conservación de recursos genéticos* (Vol. 1, Número November).
- Stribeck, N. (2007). *X-ray scattering of soft matter* (Vol. 1).
- Sun, S., Jin, Y., Hong, Y., Gu, Z., Cheng, L., Li, Z., y Li, C. (2021). Effects of fatty acids with various chain lengths and degrees of unsaturation on the structure, physicochemical properties and digestibility of maize starch-fatty acid complexes. *Food Hydrocolloids*, 110, 106224.
- Szejtli, J., y Bánky-Elöd, E. (1975). Inclusion Complexes of Unsaturated Fatty Acids with Amylose and Cyclodextrin. *Starch - Stärke*, 27(11), 368–376.
- Tan, L., y Kong, L. (2020). Starch-guest inclusion complexes: Formation, structure, and enzymatic digestion. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(5), 780–790.
- Tang, M. C., y Copeland, L. (2007). Analysis of complexes between lipids and wheat starch. *Carbohydrate Polymers*, 67(1), 80–85.
- Tapia, M. S., Alzamora, S. M., y Chirife, J. (2020). Effects of Water Activity (aw) on Microbial Stability as a Hurdle in Food Preservation. En *Water Activity in Foods:*

*Fundamentals and Applications* (pp. 323–355).

- Tarazi Riess, H., Shani Levi, C., y Lesmes, U. (2022). Inclusion of phenolic bioactives in high amylose corn starch for gastro-intestinal delivery. *Frontiers in Nutrition*, *9*, 981408.
- Tian, Y., Zhu, Y., Bashari, M., Hu, X., Xu, X., y Jin, Z. (2013). Identification and releasing characteristics of high-amylose corn starch–cinnamaldehyde inclusion complex prepared using ultrasound treatment. *Carbohydrate Polymers*, *91*, 586–589.
- Tufvesson, F., Wahlgren, M., y Eliasson, A. C. (2003a). Formation of Amylose-Lipid Complexes and Effects of Temperature Treatment. Part 1. Monoglycerides. *Starch - Stärke*, *55*(2), 61–71.
- Tufvesson, F., Wahlgren, M., y Eliasson, A. C. (2003b). Formation of Amylose-Lipid Complexes and Effects of Temperature Treatment. Part 2. Fatty Acids. *Starch - Stärke*, *55*(3–4), 138–149.
- US Pharmacopeia. (2024). *Powder Flow*. <https://www.usp.org/harmonization-standards/pgd/general-chapters/powder-flow>
- USDA. (2019). *Food Data Central*. <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/170554/nutrients>
- Van Aardt, M., Duncan, S. E., Long, T. E., O’Keefe, S. F., Marcy, J. E., y Sims, S. R. (2004). Effect of Antioxidants on Oxidative Stability of Edible Fats and Oils: Thermogravimetric Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(3), 587–591.
- Velasco, J., Dobarganes, C., Holgado, F., y Márquez-Ruiz, G. (2009). A follow-up oxidation study in dried microencapsulated oils under the accelerated conditions of the Rancimat test. *Food Research International*, *42*(1), 56–62.
- Velasco, J., Dobarganes, M. C., y Márquez-Ruiz, G. (2000). Application of the Accelerated Test Rancimat to Evaluate Oxidative Stability of Dried Microencapsulated Oils. *Grasas y Aceites*, *51*(4), 261–267.
- Velasco, J., Marmesat, S., Dobarganes, C., y Márquez-Ruiz, G. (2006). Heterogeneous

- Aspects of Lipid Oxidation in Dried Microencapsulated Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5), 1722–1729.
- Wang, C., Chen, X., y Liu, S. (2020). Encapsulation of tangeretin into debranched-starch inclusion complexes: Structure, properties and stability. *Food Hydrocolloids*, 100, 105409.
- Wang, S., Kong, L., Zhao, Y., Tan, L., Zhang, J., Du, Z., y Zhang, H. (2019). Lipophilization and molecular encapsulation of p-coumaric acid by amylose inclusion complex. *Food Hydrocolloids*, 93, 270–275.
- Wang, S., Li, C., Copeland, L., Niu, Q., y Wang, S. (2015). Starch Retrogradation: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(5), 568–585.
- Wang, Y., Zhang, Y., Guan, L., Wang, S., Zhang, J., Tan, L., Kong, L., y Zhang, H. (2021). Lipophilization and amylose inclusion complexation enhance the stability and release of catechin. *Carbohydrate Polymers*, 269, 118251.
- Xu, J., Zhao, W., Ning, Y., Bashari, M., Wu, F., Chen, H., Yang, N., Jin, Z., Xu, B., Zhang, L., y Xu, X. (2013). Improved stability and controlled release of  $\omega$ 3/ $\omega$ 6 polyunsaturated fatty acids by spring dextrin encapsulation. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1633–1640.
- Yang, D., Guo, Q., Li, R., Chen, L., y Zheng, B. (2024). Amylose content controls the V-type structural formation and in vitro digestibility of maize starch-resveratrol complexes and their effect on human gut microbiota. *Carbohydrate Polymers*, 327, 121702.
- Yang, Y., Zhengbiao, G. U., y Zhang, G. (2009). Delivery of Bioactive Conjugated Linoleic Acid with Self-Assembled Amylose-CLA Complex. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 7125–7130.
- Yeo, L., Thompson, D. B., y Peterson, D. G. (2016). Inclusion complexation of flavour compounds by dispersed high-amylose maize starch (HAMS) in an aqueous model system. *Food Chemistry*, 199, 393–400.
- Yun, P., Devahastin, S., y Chiewchan, N. (2020). Physical properties, microstructure and

- digestion behavior of amylose-lipid powder complexes prepared using conventional and spray-drying based methods. *Food Bioscience*, 37, 100724.
- Zabar, S., Lesmes, U., Katz, I., Shimoni, E., y Bianco-Peled, H. (2009). Studying different dimensions of amylose-long chain fatty acid complexes: Molecular, nano and micro level characteristics. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1918–1925.
- Zabar, S., Lesmes, U., Katz, I., Shimoni, E., y Bianco-Peled, H. (2010). Structural characterization of amylose-long chain fatty acid complexes produced via the acidification method. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 347–357.
- Zhang, L., Guan, P., Zhang, Z., Dai, Y., y Hao, L. (2018). Physicochemical characteristics of complexes between amylose and garlic bioactive components generated by milling activating method. *Food Research International*, 105, 499–506.
- Zhang, X., Mi, T., Gao, W., Wu, Z., Yuan, C., Cui, B., Dai, Y., y Liu, P. (2022). Ultrasonication effects on physicochemical properties of starch–lipid complex. *Food Chemistry*, 388, 133054.
- Zhang, Y., Gladden, I., Guo, J., Tan, L., y Kong, L. (2020). Enzymatic digestion of amylose and high amylose maize starch inclusion complexes with alkyl gallates. *Food Hydrocolloids*, 108, 106009.
- Zhao, B., Sun, S., Lin, H., Chen, L., Qin, S., Wu, W., Zheng, B., y Guo, Z. (2019). Physicochemical properties and digestion of the lotus seed starch-green tea polyphenol complex under ultrasound-microwave synergistic interaction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 52, 50–61.
- Zhou, D., Liu, S., Liu, X., y Tang, X. (2020). Effects of Ligand Concentration on the Thermal Properties, Structure, and Digestibility of Maize Starch Inclusion Complexes with Ascorbyl Palmitate. *Starch-Stärke*, 72(3–4), 1900168.
- Zhou, D., Liu, S., Song, H., Liu, X., y Tang, X. (2021). Preparation and characterization of chemically modified high amylose maize starch-ascorbyl palmitate inclusion complexes in mild reaction condition. *LWT - Food Science and Technology*, 142, 110983.
- Zhou, J., Guo, J., Gladden, I., Contreras, A., y Kong, L. (2022). Complexation ability and

physicochemical properties of starch inclusion complexes with C18 fatty acids. *Food Hydrocolloids*, 123, 107175.

Zobel, H. F. (1988a). Molecules to Granules: A Comprehensive Starch Review. *Starch - Stärke*, 40(2), 44–50.

Zobel, H. F. (1988b). Starch Crystal Transformations and Their Industrial Importance. *Starch-Stärke*, 40(1), 1–7.