



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Facultad de Ciencias Exactas

Departamento de Química

APLICACIÓN DE SUBPRODUCTOS DE CHÍA

(*Salvia hispanica* L.) Y GIRASOL (*Helianthus annuus* L.)

EN ALIMENTOS



Tesis Doctoral

Estefania N. Guiotto
Director

Dra. Mabel C. Tomás
Codirector

Ms. Sc. Susana M. Nolasco

Año 2014

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 Criotecnología de Alimentos (CIDCA-UNLP-CONICET) y en la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA) bajo la dirección de la Dra. Mabel Cristina Tomás y la codirección de la Ms. Sc. Susana María Nolasco.

Agradecimientos

Quisiera expresar mis más sinceros agradecimientos:

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por las becas otorgadas para la realización del Doctorado y el financiamiento de los trabajos de investigación.

A la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y a la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA) por brindarme una formación de alto nivel académico.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) (CONICET La Plata - UNLP) y al Núcleo de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Semillas y Alimentos (TECSE) (Facultad de Ingeniería - UNCPBA), por la posibilidad de desarrollar el presente trabajo de Tesis en sus instituciones.

A mis directoras Mabel y Susana por ser ejemplos de esfuerzo, perseverancia y ayudarme a crecer día a día tanto a nivel profesional como personal.

A mis compañeros del Grupo Aceites, Dario y Vanesa por ayudarme a dar los primeros pasos en la investigación, transmitirme su experiencia, sabiduría con la mejor predisposición. A Marian y Luciana por ser tan buenas personas, compañeras y ser cómplices en muchos momentos cargados de buena onda.

Al Dr. Jorge Wagner y su grupo de trabajo de la Universidad Nacional de Quilmes (UNQ) por permitirme realizar parte de los ensayos en sus laboratorios.

Al personal directivo, técnico y administrativo del CIDCA por toda su colaboración.

A Spectral Service, Vicentin, Danisco y el TECSE por su valiosa y fundamental aporte a este trabajo científico.

A Norma "Piky" Tedesco y Melisa Tonetto por las traducciones al idioma inglés de los trabajos presentados en revistas científicas.

A todos mis compañeros de CIDCA y del box por compartir conocimientos, reflexiones, ideas, conversaciones y ratos divertidos.

A mi familia querida por apoyarme, alentarme y brindarme incondicionalmente su amor, especialmente a mi mamá por toda su comprensión.

A las chicas de la pensión por su compañía en tantos momentos inolvidables y hacer tan grata mi adaptación a la ciudad de La Plata.

A mis amigas de la vida por estar siempre.

Y sobre todo gracias a Dios por haberme regalado la vida y guiar cada uno de mis pasos, estando a mi lado en todo momento y enseñarme el camino.

Resumen

Recientemente, la semilla de chía (*Salvia hispanica* L.) ha sido redescubierta como una importante fuente de ácidos grasos omega-3, proteínas, fibra dietética y antioxidantes, a partir de la cual puede obtenerse aceite con una elevada proporción de ácidos grasos esenciales. Su incorporación en la dieta permite disminuir la incidencia de enfermedades coronarias, refuerza el sistema nervioso; la fibra dietaria es una valiosa alternativa para regular el tránsito intestinal, lo cual ayuda a prevenir la obesidad, el cáncer de colon, así como los elevados niveles de colesterol y de glucosa en sangre. En nuestro país, la creciente expansión de su cultivo en las provincias del noroeste puede representar un aporte tendiente a la diversificación de la producción agrícola con el consecuente impacto socioeconómico en dicha región.

Por otra parte, Argentina es uno de los principales productores y exportadores de aceite de girasol (*Helianthus annuus* L.) y la industria local se destaca por su avanzada tecnología y alta competitividad. Asimismo, el girasol es el segundo cultivo oleaginoso en importancia a escala nacional luego de la soja. El 92% del girasol producido en la Argentina es procesado, siendo exportado el 70% como aceite crudo a granel y harina proteica y el 30% restante como aceite refinado.

Los aceites comestibles constituyen un componente importante en nuestra alimentación, cuya variedad y consumo depende de la disponibilidad de cada país y región. La composición de los aceites varía considerablemente en el aporte de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados y particularmente, en el tenor de ácidos grasos omega-6 y omega-3. La nutrición en el mundo occidental se caracteriza por una elevada ingesta de ácidos grasos omega-6 y un bajo consumo de ácidos grasos omega-3, debido mayoritariamente al origen vegetal de los aceites que se producen y al bajo consumo de pescados grasos. De esta forma, la relación omega-6:omega-3 está alejada de la que recomienda la FAO/OMS. En virtud de ello, es posible preparar aceites con relaciones omega-6:omega-3 muy cercanas a las recomendadas, desarrollando productos que contengan mezclas de aceites con una adecuada composición de ácidos grasos.

En nuestro país, debido a la gran producción de aceite de girasol, es interesante la revalorización de los subproductos generados en el proceso de extracción y/o refinación del mismo. Entre ellos se encuentran las gomas, constituidas por una mezcla de fosfolípidos, agua y restos de aceite. La posterior deshidratación de las mismas da lugar al subproducto denominado lecitina. Cada

fosfolípido constituyente contribuye a la funcionalidad de la lecitina, por lo que la modificación de su estructura y/o de su concentración posibilita ampliar las propiedades funcionales de las mismas.

En el **Capítulo I** se presenta una introducción sobre la chía y el girasol, describiendo el origen y los antecedentes históricos de estas especies, las principales características botánicas, así como la composición química de las semillas y sus respectivos aceites. Además, se describe el proceso de obtención de los aceites vegetales y de la lecitina, la cual es principalmente utilizada como agente emulsificante en la industria alimentaria. Por último, se describen los mecanismos de formación, estabilidad y desestabilización de las emulsiones.

En el **Capítulo II** se detalla el proceso de fraccionamiento de lecitina nativa de girasol, mediante el empleo de diferentes soluciones etanol-agua y distintos niveles de pH del solvente de extracción. Además, se analizan las propiedades funcionales de las fracciones enriquecidas en fosfatidilcolina PC, como agentes emulsificantes de emulsiones O/W.

En el **Capítulo III** se estudia la obtención, caracterización, estabilidad oxidativa y condiciones de almacenamiento más adecuadas de aceites mezcla girasol-chía, los cuales presentan relaciones omega-6:omega-3 acordes a las recomendadas por la FAO/OMS, evaluando la eficiencia de la adición de antioxidantes (extracto de romero, palmitato de ascorbilo y su mezcla) con respecto al deterioro oxidativo de los mismos. Además, se presentan los resultados del análisis sensorial.

En el **Capítulo IV** se evalúa la estabilidad física de emulsiones O/W formuladas con aceites mezcla girasol-chía, lecitinas modificadas de girasol mediante “deoiling” y fraccionamiento (agente emulsificante) y mucílago de chía (agente estabilizante).

Finalmente, se exponen las **Conclusiones generales** obtenidas a partir de este trabajo de Tesis y en base a ellas, las **Perspectivas futuras**.

Capítulo I	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. LA CHÍA	2
1.1.1. Origen y antecedentes históricos	2
1.1.2. Ubicación sistemática y características botánicas	4
1.1.3. Distribución geográfica y producción	6
1.1.4. Composición química de las semillas de chía	8
1.1.5. Aceite de chía	9
1.1.6. Mucílago de chía	11
1.2. EL GIRASOL	12
1.2.1. Origen y antecedentes históricos del cultivo de girasol	12
1.2.2. Ubicación sistemática y características botánicas	15
1.2.3. La planta de girasol	17
1.2.4. Composición química de las semillas de girasol	19
1.2.5. Aceite de girasol	19
1.3. LA IMPORTANCIA DE LOS ACEITES Y GRASAS	21
1.3.1. Procesamiento de los aceites vegetales	22
1.3.1.1. Acondicionamiento previo a la extracción	22
1.3.1.2. Extracción de aceite por prensado en frío	23
1.3.1.3. Extracción sólido-líquido de aceite	24
1.3.1.4. Refinación de los aceites crudos	25
1.3.2. Oxidación lipídica	28
1.3.2.1. Factores que afectan la velocidad de autooxidación lipídica	31
1.4. LECITINAS	33
1.4.1. Estructura molecular de las lecitinas (fosfolípidos)	34
1.4.2. Producción de lecitinas vegetales	37
1.4.3. Aspectos de calidad y análisis de las lecitinas	40
1.4.4. Procesos de modificación de lecitinas	43
1.4.4.1. Fraccionamiento	44
1.4.5. Propiedades funcionales de las lecitinas	47
1.5. EMULSIONES	49
1.5.1. Características generales	49

1.5.2. Principios físicos de la emulsificación	51
1.5.3. Variables que influyen en la emulsificación	51
1.5.4. Tipos de homogeneizadores	54
1.5.5. Estabilidad de las emulsiones	56
1.5.5.1. Fuerzas que actúan entre las partículas	56
1.5.5.2. Mecanismos de desestabilización de emulsiones	58
1.5.6. Balance Hidrofílico-Lipofílico (HLB)	61
1.5.7. Distribución de tamaño de partículas	62
1.6. OBJETIVOS	66
<i>Capítulo II</i>	67
<i>FRACCIONAMIENTO DE LECITINAS DE GIRASOL.</i>	
<i>CARACTERIZACIÓN Y PROPIEDADES EMULSIFICANTES DE</i>	
<i>FRACCIONES ENRIQUECIDAS EN FOSFATIDILCOLINA (FPC)</i>	67
2.1. INTRODUCCIÓN	68
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	72
2.2.1. Materiales	72
2.2.2. Proceso de fraccionamiento	72
2.2.2.1. Fraccionamiento de lecitina de girasol con mezclas etanol absoluto:agua a diferentes niveles de pH	72
2.2.2.2. Eliminación del aceite residual (“deoiling”)	73
2.2.2.3. Composición fosfolípídica de las fracciones mediante ³¹ P NMR	73
2.2.2.4. Rendimiento másico porcentual	74
2.2.2.5. Coeficientes de extracción	74
2.2.3 Evaluación de propiedades emulsificantes	75
2.2.3.1 Preparación de emulsiones O/W	75
2.2.3.2 Estabilidad de las emulsiones (QuickScan)	75
2.2.3.3 Análisis del tamaño de partículas	77
2.2.4 Análisis estadístico	77
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	78
2.3.1. Lecitina nativa de girasol	78
2.3.1.1. Rendimiento de las fracciones	78
2.3.1.2. Composición de fosfolípidos	79
2.3.1.3 Coeficientes de extracción	82

2.3.1.4. Emulsiones con fracciones enriquecidas en fosfatidilcolina (FPC) de lecitina nativa de girasol	83
2.3.1.4.1. Procesos de desestabilización	83
2.3.1.4.2. Cinéticas de desestabilización	85
2.3.1.4.3. Análisis del tamaño de partículas	89
2.4. CONCLUSIONES PARCIALES	91
2.5. DIFUSIÓN DE RESULTADOS	93
Capítulo III	94
CONSERVACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ACEITES MEZCLA GIRASOL-CHÍA	94
3.1. INTRODUCCIÓN	95
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	101
3.2.1. Aceites y antioxidantes utilizados	101
3.2.2. Análisis fisicoquímico de los aceites vegetales	102
3.2.2.1. Composición de ácidos grasos mediante cromatografía gaseosa (CG-FID)	102
3.2.2.2. Determinación de Tocoferoles	103
3.2.2.3. Metales	104
3.2.2.4. Ácidos grasos libres (FFA)	104
3.2.2.5. Valor de peróxido (PV)	105
3.2.2.6. Valor de <i>p</i> -anisidina (<i>p</i> -AV)	106
3.2.3. Estudio de la termoxidación de aceites mezcla girasol-chía mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC)	107
3.2.4. Análisis sensorial	108
3.2.5. Ensayo de almacenamiento	111
3.2.6. Ensayo acelerado de estabilidad oxidativa (Rancimat)	111
3.2.7. Análisis estadístico	112
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	112
3.3.1. Caracterización de los aceites y de sus mezclas	112
3.3.2. Estudio de la termoxidación de los aceites mezcla mediante calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	115
3.3.3. Evaluación sensorial	123
3.3.4. Almacenamiento de los aceites mezcla girasol-chía	124

3.3.5. Ensayo de estabilidad oxidativa acelerada mediante Rancimat	131
3.4. CONCLUSIONES PARCIALES	134
3.5. DIFUSIÓN DE RESULTADOS	136
Capítulo IV	137
EMULSIONES ALIMENTARIAS FUNCIONALES O/W CON SUBPRODUCTOS DE CHÍA Y GIRASOL	137
4.1. INTRODUCCIÓN	138
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	142
4.2.1. Lecitinas de girasol	142
4.2.1.1. Composición de fosfolípidos	143
4.2.2. Mucílago de chía	143
4.2.2.1. Determinación del contenido de proteínas	144
4.2.2.2. Determinación de lípidos residuales	145
4.2.2.3. Dispersiones de mucílago de chía	145
4.2.3. Preparación de emulsiones O/W	145
4.2.4. Caracterización de las emulsiones O/W	146
4.2.4.1. Caracterización óptica mediante un analizador vertical de barrido (QuickScan)	146
4.2.4.2. Distribución y tamaño de partículas	147
4.2.4.3. Observaciones microscópicas	148
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	148
4.3.1. Emulsiones O/W con lecitinas modificadas de girasol (FPC, LGD)	148
4.3.1.1. Composición de fosfolípidos de las diferentes lecitinas	148
4.3.1.2. Estabilidad de las emulsiones O/W con lecitinas modificadas de girasol (FPC, LGD) como agente emulsificante	149
4.3.1.3. Análisis de la distribución y tamaño de partículas	153
4.3.2. Emulsiones O/W con mucílago de chía como agente espesante	156
4.3.2.1. Composición del mucílago de chía	156
4.3.2.2. Estabilidad de las emulsiones O/W con mucílago de chía	157
4.3.2.3. Análisis de la distribución y el tamaño de partículas	159
4.3.2.4. Microscopía óptica de las emulsiones con mucílago de chía	161
4.3.3. Emulsiones O/W (Φ_m 0,10) con lecitinas modificadas de girasol (FPC, LGD) y mucílagos de chía (M1, M2)	162

4.3.3.1. Estabilidad de las emulsiones O/W con M1 y lecitinas modificadas de girasol (FPC, LGD)	162
4.3.3.2. Análisis de la distribución y tamaño de partículas de las emulsiones O/W con M1 y lecitinas modificadas de girasol (FPC, LGD)	164
4.3.3.3 Estabilidad de las emulsiones O/W con M2 y lecitinas modificadas de girasol (FPC, LGD)	169
4.3.3.4. Análisis de la distribución y tamaño de partículas de las emulsiones O/W con M2 y lecitinas modificadas de girasol (FPC, LGD)	171
4.3.3.5. Microscopía óptica de las emulsiones con lecitinas modificadas de girasol (FPC, LGD) y mucílago de chía (M1)	175
4.4. CONCLUSIONES PARCIALES	176
4.5. DIFUSIÓN DE RESULTADOS	178
CONCLUSIONES GENERALES	179
PERSPECTIVAS FUTURAS	183
BIBLIOGRAFÍA	186

Listado de abreviaturas

% p/p	Porcentaje peso en peso
% p/v	Porcentaje peso en volumen
% v/v	Porcentaje volumen en volumen
%BS	Porcentaje de "Back-Scattering" o luz dispersada
³¹ P NMR	Resonancia magnética nuclear de ³¹ P NMR (³¹ P Nuclear Magnetic Resonance)
A	Factor preexponencial (estudio de la termoxidación)
AARE	Error relativo absoluto
Ab	absorbancia de la fase lipídica antes de la reacción con la <i>p</i> -anisidina
AGMI	Ácidos grasos monoinsaturados
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
AIE	Área interfacial específica
ANOVA	Análisis de varianza
AOCS	American Oil Chemists' Society
AP	Palmitato de ascorbilo
As	absorbancia de la fase lipídica después de la reacción con la <i>p</i> -anisidina
C	Aceite de chía
C16:0	Ácido palmítico
C18:0	Ácido esteárico
C18:1	Ácido oleico
C18:2	Ácido linoleico
C18:3	Ácido α -linolénico
CAA	Código Alimentario Argentino
CG	Cromatografía gaseosa
D [3,2]	Diámetro promedio De Sauter en superficie
D [4,3]	Diámetro promedio de De Brouker en volumen
D	Diámetro de gota
d	días
DHA	Ácido graso docosahexanoico
DPA	Ácido graso docosapentanoico
DSC	Calorimetría diferencial de barrido

D _{v,0,1}	Percentil del 10% de la distribución en volumen
D _{v,0,5}	Mediana de la distribución en volumen o percentil del 50%
D _{v,0,9}	Percentil del 90% de la distribución en volumen
D _{x, y}	Percentil de la distribución de tamaño de partícula
E _a	Energía de activación
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
EO	Estabilidad oxidativa
EPA	Ácido graso eicosapentanoico
EPL	Coefficiente de extracción de fosfolípidos
ER	Extracto de romero
EtOH:Agua	Relación etanol:agua (v/v)
FA	Ácido graso (fatty acid)
FAME	Metil ésteres de ácidos grasos
FAO	Food and Agriculture Organization
FAs	Ácidos grasos
FDA	Food and Drug Administration
FFA	Ácidos grasos libres
FID	Detector de ionización de llama
FL	Fosfolípido
FLT	Fosfolípidos totales
FPC	Fracciones enriquecidas en fosfatidilcolina
FPI	Fracciones enriquecidas en fosfatidilinositol
G	Aceite de girasol
GMP	Buenas prácticas de manufactura
GRAS	Generalmente reconocido como seguro (Generally Recognized As Safe)
ha	Hectárea
HACCP	Análisis de peligros y puntos críticos de control
HLB	Balance Hidrofílico-Lipofílico
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (High Performance Liquid Chromatography)
IA	Índice de acidez
IAC	Sustancias insolubles en acetona
IH	Sustancia insolubles en Hexano

ILPS	International Lecithin and Phospholipids Society
IRAM	Instituto Argentino de Racionalización de Materiales
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
L*	Radical libre lipídico
LGC	Lecitina de girasol cruda
LGD	Lecitina de girasol “deoiled”
LH	Lípido
LO*	Radical alcoxilo
LOO*	Radical peroxilo
LOOH	Hidroperóxido
LSD	Least Significant Differences
<i>m</i>	Masa unitaria
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
MARE	Error absoluto relativo promedio
msnm	Metros sobre el nivel del mar
MSR	Metodología de Superficies de Respuesta
<i>n</i>	Número de repeticiones
nd	No detectado
O/W	Emulsión aceite en agua
OFW	Método de Ozawa-Flynn-Wall
OGM	Organismo genéticamente modificado
OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>p</i>	Nivel de significación
P	Polidispersidad
PA	Ácido fosfatídico
<i>p</i> -AV	Valor de <i>p</i> -ansidina
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PI	Fosfatidilinositol
PS	Fosfatidilserina
PV	Índice de peróxido
<i>r</i>	Coefficiente de correlación
SD	Desviación estándar
T	Temperatura

t	tiempo
T _e	Temperatura extrapolada de inicio de la oxidación (DSC)
t _i	tiempo de inducción (Rancimat)
TLC	Cromatografía de capa delgada
tn	tonelada
Totox	Valor total de oxidación
T _{p1}	Temperatura máxima del primer pico (DSC)
T _{p2}	Temperatura máxima del segundo pico (DSC)
UV	Ultravioleta
W/O	Emulsión agua en aceite

Capítulo I

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. LA CHÍA

1.1.1. Origen y antecedentes históricos

Salvia hispanica L. es una especie originaria de Mesoamérica cuya mayor diversidad genética se presenta en la vertiente del Océano Pacífico (Beltrán-Orozco y Romero, 2003; Cahill, 2004), siendo nativa de las áreas montañosas del oeste y centro de México.

S. hispanica L. es comúnmente conocida como chía, siendo esta palabra una adaptación española al término nahua *chían* o *chien* (plural), término que en náhuatl significa “semilla de la que se obtiene aceite” (Watson, 1938).

Existen evidencias que demuestran que la semilla de chía fue utilizada como alimento hacia el año 3500 a.C., siendo cultivada en el Valle de México entre los años 2600 y 900 a.C. por las civilizaciones teotihuacanas y toltecas. Asimismo, fue uno de los principales componentes de la dieta de los aztecas junto con la quinoa, el amaranto, el maíz y cierta variedad de porotos (Rodríguez Vallejo, 1992).

La chía era utilizada como materia prima para la elaboración de medicinas, alimentos y pinturas, así como en ofrendas a los dioses durante las ceremonias religiosas (Sahagún, 1579). Con la llegada de los españoles, las tradiciones de los nativos fueron suprimidas y la mayor parte de su agricultura intensiva y su sistema de comercialización destruidos. Muchos cultivos que habían tenido preponderancia en las dietas precolombinas fueron prohibidos por los españoles debido a su estrecha asociación con los cultos religiosos, siendo reemplazados por especies exóticas (trigo, cebada, arroz, entre otras) demandadas por los conquistadores (Soustelle, 1955; Engel, 1987). Así, de los cuatro cultivos básicos (chía, amaranto, quinoa y maíz) de la dieta azteca, la chía y el amaranto perdieron sus lugares de privilegio y casi desaparecieron, siendo mayores los efectos de la persecución española sobre la chía (National Research Council, 1989). Sin embargo, esta especie logró sobrevivir debido a la conservación de algunas tradiciones precolombinas por parte de pequeños grupos de descendientes de las naciones Nahuatl. Así, estos pueblos lograron vencer a los conquistadores y a las presiones de la cultura impuesta, permaneciendo aislados en el sudoeste de México y las zonas montañosas de Guatemala. Actualmente, los descendientes de los Nahuatl y de los

Mayas utilizan este grano ancestral en una popular bebida denominada chía fresca (Ayerza y Coates, 2005).

Durante muchos años las semillas de chía fueron comercializadas solamente en los mercados mexicanos y utilizada como materia prima para la elaboración de la bebida denominada chía fresca, la cual era consumida por razones étnicas o religiosas. En 1965 la chía comenzó a estar disponible en comercios dietéticos del sudeste de California y Arizona (Hicks, 1966) y hacia finales de los años 1980s se empezó a comercializar en los Estados Unidos un alimento para mascotas (Chía Pets), incrementándose la demanda de las semillas y posibilitando la venta mayoritaria de su producción.

En 1991 se inició el Proyecto Regional del Noroeste de Argentina con el fin de identificar y llevar a producción comercial nuevos cultivos industriales que pudieran ayudar a diversificar la producción agrícola e incrementar las ganancias de los agricultores de dicha región. Desde su comienzo, organizaciones privadas y gubernamentales de los Estados Unidos y Argentina han trabajado en este proyecto en forma cooperativa. Durante el curso del proyecto, si bien ciertas especies, tales como “kenaf” (*Hibiscus cannabinus* L.) y “lesquerella” (*Lesquerella fendleri* L.) fueron cultivadas comercialmente por su mayor potencial para la región, la chía fue identificada como la especie más promisoría (Ayerza y Coates, 2005).

Paralelamente, los resultados de las investigaciones científicas acerca de los efectos negativos de las grasas saturadas, los ácidos grasos *trans* y del desbalance entre los ácidos grasos ω -6 y ω -3 en la dieta occidental así como los beneficios del incremento del consumo de ácidos grasos ω -3 para prevenir enfermedades cardiovasculares, depresión, cáncer y otras patologías comenzaron a tener cada vez un mayor interés. Asimismo, la información sobre la chía, fuente natural de ácidos grasos ω -3, antioxidantes y fibra dietética, acrecentó las expectativas en torno a su cultivo. En virtud de ello, su uso como alimento comenzó a expandirse fuera de México (Ayerza y Coates, 2005). La composición química y el valor nutricional asociado, le confieren un gran potencial para incorporarla en la industria alimentaria. A su vez, la información tecnológica disponible brinda una excelente oportunidad para el desarrollo de una industria agrícola capaz de ofrecer al mundo un “cultivo nuevo y antiguo a la vez” (Ayerza y Coates, 2005). Actualmente, la *European Food Safety Authority* (EFSA, 2009) emitió dictamen sobre la inocuidad de las semillas

enteras y trituradas como ingredientes alimentarios. Además, dicho organismo autorizó su comercialización para ser utilizadas en productos de panadería con un contenido máximo del 5%. Posteriormente, a partir de 2013 la semilla de chía se introduce como ingrediente alimentario en diversos productos tales como cereales de desayuno, mezclas de frutas, frutos secos y semillas y como semillas preenvasadas (Haros, 2013).

1.1.2. Ubicación sistemática y características botánicas

Según la clasificación taxonómica propuesta por Linneo, la posición sistemática de la chía (*Salvia hispanica* L.) es la siguiente:

Reino: Vegetal o Plantae

División: Magnoliophyta o Angiospermae

Clase: Magnoliopsida o Dicotyledoneae

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Subfamilia: Nepetoideae

Tribu: Mentheae

Género: *Salvia*

Especie: *hispanica*

La familia *Lamiaceae* cuenta con 170 géneros y más de 3000 especies de amplia distribución en regiones tropicales y templadas, de las cuales en Argentina existen alrededor de 26 géneros (Burkart, 1979). Son hierbas anuales o arbustos perennes, que contienen aceites esenciales en los pelos glandulares de sus hojas y tallos, motivo por lo cual han sido domesticadas para ser utilizadas como condimentos y en la elaboración de perfumes.

El género *Salvia* incluye unas 900 especies y se distribuye extensamente en varias regiones del mundo, tales como Sudáfrica, América Central, América del Norte, Sudamérica y Asia Sur-Oriental. Las plantas pueden ser herbáceas o leñosas, y sus flores muy atractivas y de varios colores.

Salvia hispanica es una planta herbácea anual, que se desarrolla desde 1 a 1,5 m de altura según la fecha de siembra, con tallos ramificados de sección cuadrangular con pubescencias cortas y blancas. Presenta hojas opuestas con bordes aserrados de 8-10 cm de longitud y 4-6 cm de ancho. La descripción de la

morfología floral de *S. hispanica* fue abordada por Martínez (1959) y Ramamoorthy (1985). Las flores son hermafroditas, púrpuras o blancas, pedunculadas y se encuentran reunidas en grupos de seis o más en ramilletes terminales (**Figura 1.1**).



Figura 1.1. Cultivo (izquierda) e inflorescencia (derecha) de chía (*Salvia hispanica* L.) (Di Sapio, 2008)

El fruto, al igual que otras especies de la familia *Lamiaceae*, es típicamente un esquizocarpo consistente en lóculos indehiscentes que se separan para formar 4 mericarpios parciales denominados núculas, comúnmente conocidos como semillas, los cuales son monospermicos, ovales, suaves y brillantes, de color pardo grisáceo con manchas irregulares marrones en su mayoría y algunos blancos (Ayerza y Coates, 2005) (**Figura 1.2**).



Figura 1.2. Semillas de chía (*Salvia hispanica* L.) (Di Sapio, 2008)

Las características morfológicas y fenológicas que diferencian a las variedades domesticadas de las silvestres de *S. hispanica* son cálices cerrados, semillas de mayor tamaño, inflorescencias más compactas, flores más grandes, presencia de dominancia apical y uniformidad en los periodos de floración y maduración (Cahill, 2005).

1.1.3. Distribución geográfica y producción

Actualmente, a nivel comercial la chía se cultiva en Argentina, México, Bolivia, Guatemala, Ecuador y Australia. En el año 2008, “The Ord Valley”, en el extremo noroccidental de Australia, fue el principal productor, con un área sembrada de 750 ha y una perspectiva de cultivo para 2009 de 1700 ha, lo que representa dos tercios de su producción mundial (Matt, 2008).

En países donde las condiciones climáticas no permiten la realización del cultivo a campo (ej. Gran Bretaña), las semillas se siembran en un invernadero durante los meses de marzo y abril. La germinación usualmente tarda un lapso de dos semanas y las plántulas se trasplantan cuando tienen la altura suficiente para ser colocadas en macetas individuales y luego a tierra firme desde finales de la primavera hasta principios del verano (Plants for a Future, 2002).

Debido a que es una planta sensible al fotoperiodo (longitud del día), la estación de crecimiento depende de la latitud a la cual se realice el cultivo. Por ejemplo, un cultivar sembrado en La Unión (Valle del Cauca, Colombia) presenta un ciclo de cultivo de 90 d, mientras que la duración del ciclo del mismo cultivar sembrado en El Carril (Salta, Argentina) es de 150 d (**Tabla 1.1**). A mayores latitudes, como Choele-Choel (39° 11'S, Argentina) y Tucson (32° 14'N, Estados Unidos) la chía no produce semillas ya que la planta muere por la ocurrencia de heladas antes del fin de la floración (Coates y Ayerza, 1996, 1997). En Argentina es un cultivo estival, cuya zona de cultivo se circunscribe a las provincias del noroeste (NOA).

Tabla 1.1. Características de la localización de los sitios de cultivo de la chía (Ayerza y Coates, 2005)

País	Localidad	Latitud	Elevación (msnm)	T° anual/ estación ² (°C)	Precipitaciones anuales/ estación (mm)	Ciclo de cultivo (d)
Argentina	El Carril	25° 05´S	1170	17,3/16,6	560/390	150
Bolivia	Santa Cruz	17° 43´S	437	24,6/22,8	1141/566	150
Colombia ¹	La Unión	4° 32´N	920	24/23,8	1118/341	90
México ¹	México	19° 00´N	2259	15,5/16,3	579/470	150
Perú ¹	Ica	14° 05´S	396	21,1/20,4	3/1	150

¹ Discontinuo

² Promedio de la estación de cultivo de la chía

Los suelos areno-limosos favorecen su crecimiento aunque también puede desarrollarse en suelos arcillo-limosos con buen drenaje. Las observaciones de campo indican un buen crecimiento de este cultivo en suelos con un amplio nivel de variación de nutrientes. Sin embargo, un bajo contenido de nitrógeno puede ser un factor limitante para obtener buenos rendimientos (Ayerza y Coates, 2005).

El material genético utilizado en Argentina y en Bolivia es lo suficientemente uniforme para permitir el uso de cosechadoras estándar con algunas modificaciones necesarias para mejorar la producción (Ayerza y Coates, 2005). El rendimiento promedio de esta especie en plantaciones comerciales es de alrededor de 500-600 kg/ha, aunque se han logrado obtener hasta 1260 kg/ha (Coates y Ayerza, 1998). En parcelas experimentales de la provincia de Salta, con la implementación de riego y fertilización nitrogenada se han registrado rendimientos de 2500 kg/ha.

La fecha de siembra ha influenciado la producción en el noroeste argentino. La época de siembra comprende desde mediados de enero hasta principios de marzo, siendo óptima la primera quincena de febrero. La temperatura, la luz, el tipo de suelo y la nutrición de las plantas afectan tanto la cantidad como la calidad del aceite contenido en la semilla de chía. Se ha encontrado una correlación negativa entre las temperaturas medias y el contenido del ácido graso α -linolénico de la semilla de chía formada a principios de abril y a fines de mayo (Ayerza, 1995). Es

probable que las altas temperaturas reduzcan la formación de este ácido graso esencial, tal como ocurre en otras oleaginosas, según lo informado por Howell y Collins (1957).

La **Tabla 1.2** muestra el contenido y la composición acídica del aceite de la semilla de chía obtenido a partir de cultivos comerciales realizados en Argentina, Bolivia, Colombia, México y Perú, utilizando la misma fuente de material genético. Como puede observarse, existen diferencias debido a la influencia de los factores ambientales previamente comentados (Ayerza y Coates, 2005).

Tabla 1.2. Contenido y composición de ácidos grasos de aceite de semilla de chía cultivada en diversos países de América (Ayerza y Coates, 2005)

País	Aceite (g/100 g semilla)	Ácido graso (%)				
		Palmítico	Esteárico	Oleico	Linoleico	α -linolénico
Argentina	34,0	7,0	3,0	6,7	19,5	63,1
Bolivia	32,7	7,4	2,7	7,1	18,7	63,6
Colombia	29,9	7,5	3,5	7,6	19,2	57,9
México	31,0	6,7	3,3	7,5	19,6	61,6
Perú	32,4	7,2	3,0	6,9	18,4	64,2

1.1.4. Composición química de las semillas de chía

La **Tabla 1.3** muestra la composición de las semillas de chía y la correspondiente a los cinco cereales de mayor importancia a nivel mundial (arroz, cebada, avena, trigo, maíz). En la misma, puede observarse que el contenido de proteínas, lípidos y fibra, así como la energía aportada por la semilla de chía son mayores que los presentes en los demás granos. La chía es conocida principalmente como una importante fuente de ácidos grasos esenciales ω -3, además aporta elevados niveles de fibra dietética, compuestos fenólicos, proteínas, minerales y vitaminas liposolubles como A, D, E y K (Tosco, 2004; Ixtaina, 2010; Capitani, 2013).

Tabla 1.3. Energía y composición centesimal correspondiente a diversos granos

Grano	Energía kcal/100g	Proteínas	Lípidos	Carbohidratos	Fibra	Cenizas
				%		
Arroz ¹	358	6,5	0,5	79,1	2,8	0,5
Cebada ¹	354	12,5	2,3	73,5	17,3	2,3
Avena ¹	389	16,9	6,9	66,3	10,6	1,7
Trigo ¹	339	13,7	2,5	71,1	12,2	1,8
Maíz ¹	365	9,4	4,7	74,3	3,3	1,2
Chía ^{2,3}	550	19-23	30-35	9-41	18-30	4-6

¹United States Department of Agriculture (2002); ²Ayerza y Coates (2004); ³Diario oficial de la Unión Europea (2009)

1.1.5. Aceite de chía

En el año 2009, mediante Resolución Conjunta 76/2009 y 391/2009 Modificación (06/2009), se autorizó el uso de aceite de chía exclusivamente en suplementos dietarios, en los términos del Artículo 1381 del Código Alimentario Argentino (CAA, 2008).

El contenido de aceite presente en la semilla de chía es de alrededor de 33%, el cual presenta el mayor porcentaje de ácido α -linolénico conocido hasta el momento (62 - 64%) (Ayerza, 1995). Por otra parte, se ha informado elevados contenidos de ácido α -linolénico en aceite de Sacha Inchi (*Plukenetia huayllabambana*) de alrededor de 53,9% y en lino (57,5%) (Ixtaina, 2010; Ruiz, 2013).

Actualmente, se disponen en el mercado de cuatro fuentes de ácidos grasos ω -3. Las dos más importantes en volumen de producción son las asociadas al pez “menhaden” (*Brevoortia tyrannus*) y a la semilla de lino, mientras que la fuentes minoritarias son la semilla de chía y las algas marinas. La **Tabla 1.4** muestra una caracterización comparativa del perfil de ácidos grasos de dichas fuentes. De estas cuatro materias primas, el lino y la chía son los cultivos agrícolas que presentan la mayor concentración conocida de ácido α -linolénico, sin embargo, a diferencia del lino, la semilla de chía no tiene factores antinutricionales (Ayerza, 1995; Oomah y

Kenasehuk, 1995). Las fuentes de origen vegetal a nivel terrestre presentan contenidos de ácidos grasos linoleico y linolénico mucho mayores con respecto a las fuentes marinas, así como un menor tenor de ácidos grasos saturados. Las otras dos fuentes de origen marino contienen DHA y EPA, ambos ácidos grasos ω -3 esenciales de cadena larga.

Tabla 1.4. Caracterización comparativa de diversas fuentes de ácidos grasos ricos en ω -3 (Adaptada de Ayerza y Coates, 2005)

Aceite	Ácido graso (% del total de ácidos grasos)										
	14:0	16:0	16:1 ¹	18:0	18:1 ²	18:2 ³	18:3 ⁴	20:4 ³	20:5 ⁴	22:5 ⁴	22:6 ⁴
“Menhaden”	8,0	15,2	10,5	7,8	14,5	2,1	1,5	1,2	13,2	4,9	8,6
Algas	4,2	14,5	27,6	0,8	5,4	2,3	1,7	4,7	27,7	-	-
Chía	-	6,9	-	2,8	6,6	19,0	63,8	-	-	-	-
Lino	-	5,5	-	1,4	19,5	15,0	57,5	-	-	-	-

14:0 = ácido mirístico; 16:0 = ácido palmítico; 16:1 = ácido palmitoleico; 18:0 = ácido esteárico; 18:1 = ácido oleico; 18:2 = ácido linoleico; 18:3 = ácido α -linolénico; 20:4 = araquidónico; 20:5 = ácido eicosapentanoico (EPA); 22:5 = docosapentanoico (DPA); 22:6 = ácido docosahexanoico (DHA); ¹ ω -7; ² ω -9; ³ ω -6; ⁴ ω -3

Cabe señalar que los aceites de chía, lino y algas marinas se diferencian del obtenido a partir del pez “menhaden”, dado que éste último contiene cantidades apreciables de colesterol (521 mg/100 g) y ácidos grasos poliinsaturados EPA (22:5) como DHA (22:6) (United States Department of Agriculture, 2002). La evidencia científica muestra que tanto EPA (22:5) como DHA (22:6) pueden ejercer efectos benéficos para reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Song y col., 2000). Sin embargo, estos ácidos grasos poliinsaturados son muy susceptibles a sufrir procesos de oxidación y deterioro, lo cual está asociado a cambios indeseables de sus propiedades organolépticas (Kleiner, 2013). Dichos compuestos se oxidan más rápidamente que los ácidos linoleico, α -linolénico y araquidónico, originando productos de oxidación con implicancias desde el punto de vista toxicológico (Freese y Mutanen, 1997).

Por otra parte, en lo que respecta al enriquecimiento de alimentos con ω -3, la chía no presenta ni transmite el característico “olor a pescado”, la estabilidad de dichos ácidos grasos ω -3 es otorgada por los antioxidantes naturales presentes en la semilla (Tosco, 2004).

1.1.6. Mucílago de chía

El análisis comparativo del contenido de fibra de las semillas de chía (18-30%) respecto al de otros cereales, permite apreciar que la chía tiene 1,6; 2,3; 2,6; 8,3 y 9,8 veces más contenido de fibra dietética que la cebada, trigo, avena, maíz y arroz, respectivamente (ver **Tabla 1.3**). El contenido de fibra en la harina residual de chía -luego de la extracción de aceite- representa alrededor de un 40%, del cual un 5% corresponde a fibra soluble, denominada mucílago. Las semillas de chía contienen 5-6% de mucílago que se puede utilizar como fibra dietética (Reyes-Caudillo y col., 2008).

Los mucílagos son constituyentes normales de los vegetales, producto de su metabolismo y se acumulan en células especiales dentro de los tejidos. Se localizan como material de reserva hidrocarbonado, reserva de agua en plantas o bien como elementos estructurales en vegetales inferiores (algas), proporcionándoles elasticidad y suavidad.

El mucílago de las semillas de chía es un polisacárido de alto peso molecular (Lin y col., 1994), se encuentra en las tres capas exteriores de la cubierta de la semilla. Cuando la semilla entra en contacto con el agua, el mucílago emerge inmediatamente y en un corto periodo se forma un "cápsula mucilaginosa" transparente que rodea la semilla (**Figura 1.3**) (Muñoz y col., 2012).

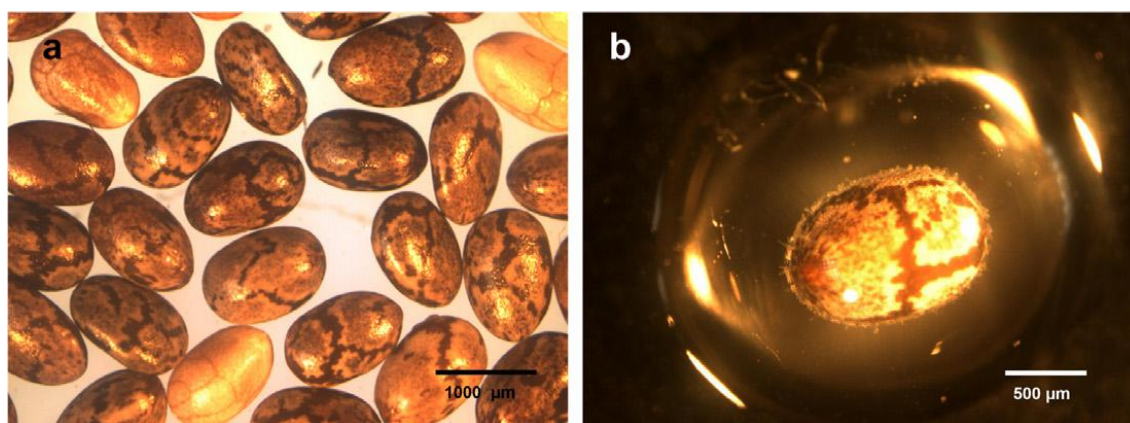


Figura 1.3. Micrográficas ópticas de semillas de chía (a) semillas secas y enteras (b) semilla entera hidratada con la formación de la "cápsula mucilaginosa"

Las unidades estructurales que componen el mucílago de la semilla de chía, fueron descritas como un tetrasacárido con una cadena principal compuesta por unidades de (1→4)-β-D-xilopiranosil-(1→4)-α-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-xilopiranosil con ramificaciones de 4-O-metil-α-D-ácido glucurónico en la posición O-

2 de β -D xilopiranosil de la cadena principal. La relación de los monosacáridos β -D-xilosa, α -D-glucosa y ácido 4-O-metil- α -D-ácido glucurónico es de 2:1:1. Cabe destacar que el contenido de ácido glucurónico es elevado (aproximadamente 25%), característico de este tipo de sustancias (Lin y col., 1994).

Los mucílagos no exudan de forma espontánea desde los vegetales, teniendo que recurrirse en muchas ocasiones a la trituración y/o a la utilización de disolventes para su extracción (Reynoso-Cortés, 2002).

La información existente en cuanto a sus propiedades funcionales es reciente e indica que se trata de un polímero con acción espesante (Lin y col., 1994). También se destaca por sus propiedades gelificantes, control de la sinéresis, estabilización de emulsiones, etc (Phillips y Williams, 2000). La alta solubilidad y capacidad de retención de agua del mucílago de chía le confieren potencialidad como ingrediente funcional para ser utilizado en diferentes aplicaciones en la industria alimentaria (Capitani y col., 2012; 2013).

La ingesta de mucílago de chía, sólo o en combinación con la semilla, ha demostrado tener influencia en el metabolismo de lípidos, mediante la disminución de la absorción intestinal de ácidos grasos, colesterol y el arrastre de sales biliares, aumentando la pérdida de colesterol a través de las heces, además de inhibir la síntesis endógena de colesterol y la desaceleración de la digestión y la absorción de nutrientes. Además, como constituyente de la fibra dietética soluble, origina geles de alta viscosidad que producen enlentecimiento del vaciado gástrico y brinda sensación de saciedad (Hentry y col., 1990).

1.2. EL GIRASOL

1.2.1. Origen y antecedentes históricos del cultivo de girasol

El girasol (*Helianthus annuus* L.) es una especie originaria de América del Norte introducida en Europa como planta ornamental en el siglo XVI, la cual comenzó a tener importancia como oleaginosa a comienzos del siglo XVIII. Su cultivo se extendió rápidamente en Rusia, donde recibió una amplia aceptación (Franco, 2002).

El inicio de la domesticación de este cultivo data de 2800 a.C. Sin embargo, aún existe controversia en torno a su origen geográfico. Algunos autores afirman que

dicho proceso se inició en la zona este de Estados Unidos (Arkansas, Missouri, Illinois y Tennessee), respaldando esta aseveración con restos arqueológicos hallados en el sitio de Hayes (Tennessee) (Harter y col., 2004; Heiser, 2008). Por otra parte, Lentz y col. (2008) encontraron restos arqueológicos de semillas (fruto constituido por la pepa y el pericarpio o cáscara) de girasol en los sitios mexicanos de San Andrés (Tabasco) y Cueva del Gallo (Morelos). Estos autores demostraron que las culturas precolombinas denominaban a este cultivo con vocablos propios (“*chimalacatl*” y “*dä nukhä*”, entre otros) y empleaban las plantas de girasol con fines ornamentales y religiosos (en templos y cementerios), mientras que sus semillas les servían como alimento (semillas frescas o tostadas, “*atole*”, bebida obtenida con semillas molidas de girasol y agua o leche) y medicina (contra dolores estomacales o reumáticos). Asimismo, postularon la existencia de dos orígenes de domesticación independientes, Estados Unidos y México, en virtud de evidencias arqueológicas, lingüísticas y etnográficas.

Durante la conquista de América, el girasol fue llevado a Europa, donde también fue empleado con fines ornamentales, medicinales y alimenticios. La primera patente sobre extracción de aceite a partir de semillas de girasol fue otorgada a Arthu Bunyanen 1716, para usos industriales en pinturas y barnices. En 1787 aparecieron en Francia cultivos de girasol como planta oleaginosa, comenzando los tratamientos para la mejora de esta característica. En el siglo XVIII, esta especie fue introducida en Rusia, donde se expande el consumo de la semilla y la producción de aceite. En 1820 en este país, se extrae por primera vez aceite de girasol para uso alimenticio, instalándose la primera fábrica de aceite en 1833 (Melgarejo, 2003). Actualmente, el girasol domesticado es una de las fuentes más importantes en la producción de aceite vegetal comestible (Wills y Burke, 2006).

Las primeras referencias sobre el girasol en la República Argentina se remontan al siglo XIX, cuando los colonos de origen hebreo afincados en las provincias de Entre Ríos, Santa Fe y Buenos Aires realizaron las primeras introducciones de la semilla para su propio consumo. A partir del año 1900 su difusión como cultivo comenzó, en forma casi simultánea, en la Colonia Mauricio, partido de Carlos Casares, en el oeste de la provincia de Buenos Aires y en Basavilbaso, provincia de Entre Ríos, a través de agricultores inmigrantes (ASAGIR, 2008).

El ambiente agroecológico sumamente favorable que presenta nuestro país para el cultivo de esta oleaginosa permitió su expansión a partir de la década del 30 (Franco, 2002), el cual se extiende entre los 24 y 38 grados de longitud sur, abarcando una amplia gama de ambientes, que involucra a una extensa región donde el girasol constituye una alternativa importante para los productores, como puede observarse en el mapa de la **Figura 1.4**.

La Bolsa de Cereales ha informado que la superficie sembrada en Argentina con girasol durante la campaña 2013/14 cubrirá 1,9 mill.ha. Los núcleos girasoleros más importantes de nuestro país se ubican en el NEA, el Sudeste de Buenos Aires y el Sudoeste de Buenos Aires - Sur de La Pampa. Las otras regiones que participan de forma significativa, aunque con menor superficie en comparación a las regiones recién mencionadas, son el Centro-Norte de Santa Fe y por último el Norte de La Pampa - Oeste de Buenos Aires.

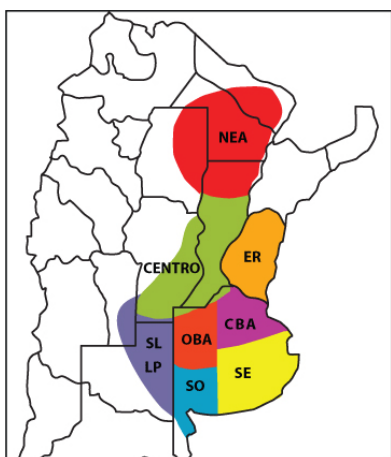


Figura 1.4. Mapa de la República Argentina donde se representan las zonas del cultivo de girasol (Fuente: <http://asagir.org.ar>)

La producción de girasol a nivel mundial tiene cuatro principales protagonistas: Ucrania, la Federación Rusa, la Unión Europea y el único país relevante en el hemisferio sur, la República Argentina.

De acuerdo a los datos aportados por la consultora Oil World, la superficie mundial destinada a la siembra del girasol en la campaña 2013/14 equivale a 25,8 mill.ha, estimándose una producción de 38,9 mill.tn, con un rendimiento promedio de 15,1 qq/ha. La República Argentina aportará el 8,5% de la producción mundial del girasol, ubicándose en el cuarto lugar, lo que muestra la importancia de esta oleaginosa para nuestro país.

Tabla 1.8. Producción mundial de girasol (mill.tn)

País	Campaña		
	2013/14	2012/13	2011/12
Ucrania	9,4	8,8	9,4
Rusia	8,6	8,0	9,5
Unión Europea	8,0	6,8	8,3
Argentina	3,3	3,2	3,8
Producción total	38,9	35,9	39,4

El 92% del grano de girasol producido en la Argentina es procesado. El 70% de ese valor se exporta como aceite crudo a granel y harina proteica y 30% restante como aceite refinado. A partir de 1 tn de girasol se extrae un 41% de aceite, 42% de subproductos y 7% de desperdicio.

Las principales firmas exportadoras de aceite de girasol en nuestro país son: Cargill, Nidera, Vicentín, Oleaginosa Moreno, Molinos Río de la Plata y Aceitera General Deheza, las cuales concentran el 98% del volumen total exportado. Entre los puertos de salida más relevantes se destacan San Lorenzo/San Martín, en Santa Fe, seguidos por Bahía Blanca y Necochea, en la provincia de Buenos Aires.

Las estimaciones realizadas prevén que Argentina producirá 3,3 millones de toneladas de semilla de girasol, con un aumento del 2,8% en el consumo interno, generando 180.000 tn adicionales de aceite para exportación. Así, la participación de nuestro país en dicho rubro de la balanza comercial podrá incrementarse del 10,9 al 12,7%. Particularmente, para el aceite de girasol, la producción y el consumo se incrementarían en 7,2 y 3,8%, respectivamente (Ingaramo, 2013).

1.2.2. Ubicación sistemática y características botánicas

Según la clasificación taxonómica propuesta por Linneo, la posición sistemática del girasol es la siguiente:

Reino: Vegetal o Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Subfamilia: Asteroideae

Tribu: Heliantheae

Subtribu: Helianthinae

Género: *Helianthus*

Especie: *Annus*

La familia Asteraceae (*Compositae*) es la más grande y diversificada dentro de las Angiospermas (Heywood, 1978; Funk y col., 2005) e incluye al 10% de todas las especies conocidas con flor. Las plantas dentro de esta familia se caracterizan por la presencia de numerosas inflorescencias agrupadas que presentan el aspecto de una única flor compuesta. Está dividida en tres subfamilias mayores y una subfamilia menor, siendo el girasol y el cártamo los representantes agronómicamente más importantes de las subfamilias mayores. Otra característica destacable es que presentan una gran biodiversidad abarcando los ambientes más extremos del planeta, no sólo en las zonas comprendidas entre los trópicos, como ocurre en el resto de las Angiospermas. Con excepción de la Antártida, se encuentran representantes de esta familia en todos los ambientes y continentes (Funk y col., 2005). Más de 40 especies económicamente importantes han sido domesticadas dentro de esta familia (Kesseli y Michelmore, 1997). El girasol, *Helianthus annuus* L., comprende tres subespecies principales: *Helianthus annuus ssp. lenticularis*, girasol silvestre; *Helianthus annuus ssp. annuus*, girasol maleza y *Helianthus annuus ssp. macrocarpus*, girasol cultivado por sus frutos comestibles.

Es una especie alógama y autoincompatible cuya domesticación ha permitido la autocompatibilidad y un aumento en el tamaño y en el vigor de la semilla. Esto hace que el girasol cultivado tenga varias características que facilitan el desarrollo de germoplasma autopolinizable, favoreciendo los programas de mejoramiento como el desarrollo de híbridos. El girasol cultivado puede ser cruzado sin dificultad, tiene una alta producción de semillas (aproximadamente 1.000 semillas/planta) y un tiempo generacional corto de 70 a 100 d.

El girasol es sinónimo principalmente de aceite y de proteína en segundo lugar. Su aceite ha sido por años de tipo "linoleico". Sin embargo, por razones vinculadas al cuidado de la salud y a la demanda de características especiales para usos industriales, se ha impulsado el desarrollo del girasol medio y alto oleico.

1.2.3. La planta de girasol

El nombre común -girasol- y el botánico -*Helianthus*, del griego *helios*, sol y *anthos*, flor- se deben a la capacidad que posee la planta de orientarse a lo largo del día siguiendo la dirección del sol (Burger y col., 2008). El movimiento heliotrópico de la cabeza se produce por la torsión del tallo y se denomina nutación. Al atardecer el tallo retorna lentamente a su posición erguida y el amanecer encuentra la cabeza mirando otra vez al este. Cuando la cabeza llega a la antesis, el momento en que las flores se abren, la nutación cesa y los capítulos permanecen mirando al sol.

La cabeza recibe el nombre de capítulo, formado por cientos de flores pequeñas, llamadas flores tubuladas, distribuidas en espiral. En la parte externa, al borde del capítulo, están las estructuras radiales, típicas hojas amarillas que semejan pétalos y se denominan lígulas o flores liguladas. Dichas lígulas no tienen función reproductora directa; sin embargo, sirven de atracción para las abejas y otros insectos que en la búsqueda de néctar, resultan útiles para el proceso de la polinización (**Figura 1.5**).

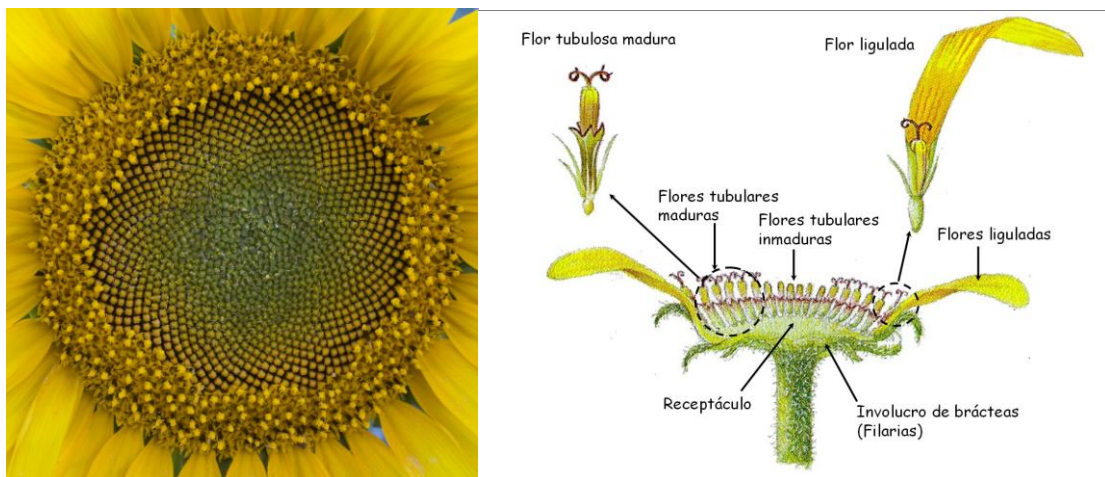


Figura 1.5. Flor fecundada donde se observa la formación de la pepa (lugar donde se formarán los tejidos que contienen el aceite con las flores tubuladas) y las liguladas (fuente: Universidad Politécnica de Valencia, 2013)

Las flores fecundadas desarrollan un fruto llamado aquenio. Un capítulo contiene al madurar entre 250 y 1500 aquenios. La mayor cantidad de aquenios se registra en las plantas de un solo capítulo, que en las plantas multiflorales (Dorrell y Vick, 1997) (**Figura 1.6**).



Figura 1.6. Corte transversal del capítulo, donde se observa la ubicación de los aquenios (izquierda) y aquenios con las flores liguladas (derecha) (fuente: Universidad Politécnica de Valencia, 2013)

El aquenio de girasol (10-15 mm de largo) está formado por un embrión (denominado semilla desde el punto de vista botánico) cubierto por el tegumento seminal y el pericarpio (cáscara) (**Figura 1.7**). En general, se utiliza el vocablo semilla para referirse al aquenio, siendo empleado de esta manera en la presente Tesis. El embrión o pepa representa el 75-80% del peso seco de la semilla y en él se encuentran dos cotiledones donde se almacenan las reservas de lípidos y de proteínas. El pericarpio (20-25% del peso seco de la semilla) es principalmente de naturaleza lignocelulósica y está formado por células alargadas y pigmentadas (Gupta, 2002; González-Pérez, 2003).

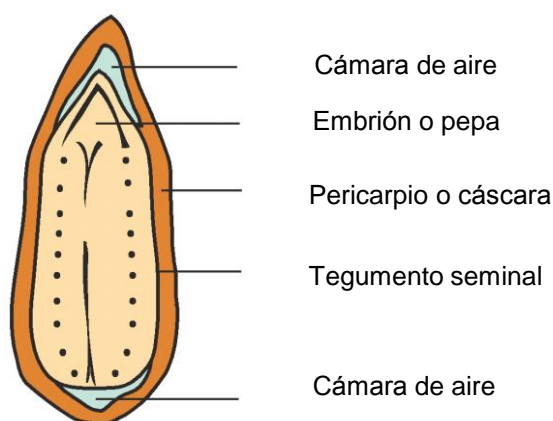


Figura 1.7. Esquema de un corte transversal de un aquenio de girasol (Melgarejo, 2003)

La semilla de girasol se cosecha cuando posee aproximadamente un 35 a 53% de aceite (el ciclo promedio del girasol varía entre 100 y 150 d). Cuando la semilla alcanza la madurez fisiológica, la parte posterior o envés de la cabeza pasa de una coloración verde a amarillenta y las brácteas toman una coloración en la gama de los marrones; esta fase se alcanza a los 30-45 d luego de la floración, es

decir, al alcanzar las semillas su máximo peso seco. Cuando los frutos tienen entre 13 y 15% de humedad se registra la madurez comercial y el cultivo es apto para la cosecha mecánica (González, 2011).

1.2.4. Composición química de las semillas de girasol

La composición de las semillas varía de acuerdo a la variedad o híbridos de girasol analizados (Earle y col., 1968). En la **Tabla 1.5** se muestra la composición química porcentual promedio de semillas de girasol completas y descascaradas. Puede apreciarse que tanto las semillas enteras de girasol como las descascaradas, son ricas en componentes lipídicos (mayoritariamente triglicéridos neutros; además, di y mono glicéridos, fosfolípidos, glicolípidos y ceras). Éstas también poseen importantes contenidos de proteínas e hidratos de carbono.

Tabla 1.5. Composición química porcentual promedio de semillas completas y descascaradas de girasol

Componente	Semilla Completa (%)	Semilla Descascarada (%)
Lípidos	34 – 55	47 – 65
Proteínas	10 – 27	20 – 40
Hidratos de Carbono	18 – 26	4 – 10
Fibra	22 – 24	8 – 12
Fenoles	1 – 4,5	0,3 – 3
Minerales	2 – 4	3 – 4

Fuente: Azcona y col. 2003 <http://www.asagir.org.ar>

1.2.5. Aceite de girasol

El aceite de Girasol (*Helianthus annuus* L.) es uno de los más consumidos en Argentina. El rendimiento industrial depende de varios factores pero puede calcularse que a partir de 1 tn de semilla con 50% de materia grasa se obtienen alrededor de 420 kg de aceite (Melgarejo, 2003). El aceite de girasol tradicional contiene > 85% de ácidos grasos insaturados, representando el ácido linoleico (ω -6) más de dos tercios del total de los ácidos grasos. Una disminución de la temperatura como de la radiación solar interceptada por la planta durante el llenado de los granos

originan un aumento de la concentración de ácido linoleico en el aceite de girasol. Por ello, modificaciones en estos factores climáticos, ya sea por cambios en fecha o zona de siembra, sanidad, etc., podrían conducir a variaciones en la composición acídica y calidad del aceite (Izquierdo y Aguirrezábal, 2008; Izquierdo y col., 2009).

El aceite obtenido a partir de los híbridos tradicionales contiene 65-70% de ácido linoleico (ω -6). En contraste, existen híbridos alto oleico (> 80% de ácido oleico y sólo 5-9% de ácido linoleico) y medio oleico (55-75% de ácido oleico y 15-35% de ácido linoleico). La **Tabla 1.6** muestra la composición acídica típica de estos tres tipos de aceites de girasol. Debido a la composición acídica de los aceites de girasol de alto y medio oleico (mayor tenor de ácido oleico y menor tenor de ácido linoleico), los valores de la estabilidad oxidativa de estos dos aceites, determinada mediante el método de oxígeno activo (AOM) según normas AOCS (1998), son más altos que los correspondientes a los aceites de girasol tradicional, refinado, blanqueado y/o desodorizado (Gupta, 2002).

Tabla 1.6. Composición de ácidos grasos de distintos aceites de girasol (% de ácidos grasos totales)

Acidos grasos	Tradicional	Alto-oleico	Medio-oleico
Saturados Totales	11 – 13	9 – 10	< 10
Ácido Oleico	20 – 30	80 – 90	55 – 75
Ácido Linoleico	60 – 70	5 – 9	15 – 35
Ácido Linolenico	< 1	< 1	< 1
AOM (h)	10 – 12	40 – 50	25 – 35
Índice de Iodo	128	79	108

Además de los compuestos mayoritarios, el aceite de girasol contiene componentes menores, que incluyen tocoferoles, esteroides y ésteres de esteroles, fosfolípidos, ceras, carotenoides, clorofila y metales traza. No obstante, algunos de dichos compuestos (fosfolípidos, tocoferoles y fitoesteroides, entre otros) son eliminados total o parcialmente durante el proceso de refinación del mismo (Gupta, 2002).

El aceite de girasol presenta un alto contenido de α -tocoferol, así como ciertos niveles de γ -tocoferol, los cuales le proporcionan protección frente a la autooxidación lipídica. Asimismo, contiene otros antioxidantes naturales tales como esteroides y ésteres de esteroles (Wang y col., 2002) asociados a avances científicos en el área de la nutrición y la salud humana (Gupta, 2002; Valenzuela y Ronco, 2004; Nolasco, 2008).

1.3. LA IMPORTANCIA DE LOS ACEITES Y GRASAS

Los aceites y grasas comestibles constituyen una fuente muy importante para la alimentación humana habiéndose incrementado su demanda en función del tiempo, dado el crecimiento de la población mundial lo que trae aparejado este tipo de necesidades y depara un desafío permanente (Autino, 2009). Su importancia radica en su alto valor energético, el cual permite el máximo almacenamiento en la menor cantidad posible de sustancia alimenticia. Además, las grasas pueden ser vehículo de las vitaminas liposolubles y fuente de ácidos grasos esenciales, los cuales son indispensables para el organismo (Bockisch, 1998).

Las grasas proporcionan una consistencia suave y cremosa, incidiendo en la palatabilidad de los alimentos, lo cual se traduce en una agradable sensación bucal. El mejoramiento del sabor es el motivo principal por el cual los aceites y grasas han sido apreciados durante largo tiempo. Sin embargo, sólo desde el comienzo del siglo XX ha sido posible proveer a la población de cantidades de grasas suficientes a precios razonables.

Los aceites y grasas de origen vegetal están presentes en organelas celulares de frutos o granos oleaginosos, llamados cuerpos lipídicos, los cuales deben romperse para su liberación. Normalmente, el aceite de frutos como la palma y la oliva se extrae por prensado mecánico en frío o en caliente, dependiendo de las características del aceite a producir o bien de la calidad inicial de la materia prima. Cuando se obtiene por prensado en frío y no se refina, el aceite es apreciado por el aroma y sabor del fruto original (Regitano-d'Arce y Ferreira, 2009).

Los aceites vegetales están compuestos, mayoritariamente, por triglicéridos, es decir, glicerol esterificado con tres moléculas de ácidos grasos. Además, pequeñas cantidades de componentes no triglicéridos, como los fosfolípidos, esteroides, tocoferoles, carotenoides, clorofilas, mono y diglicéridos y ácidos grasos

libres pueden estar presentes en diferentes cantidades conforme las características y calidad de la materia prima de origen. Los fosfolípidos son ésteres de ácido fosfórico con mono o diglicéridos asociados a la etanolamina, colina o inositol, los cuales pueden ser separados durante la refinación y empleados en la industria de alimentos como emulsificantes (lecitinas).

La refinación de los aceites crudos tiene la finalidad principal de remover los componentes no triglicéridicos indeseables del aceite crudo, tanto para garantizar su aceptación en el mercado, en virtud de los patrones de calidad establecidos, como para alcanzar un producto de aceptable estabilidad oxidativa, aumentando su vida útil.

1.3.1. Procesamiento de los aceites vegetales

La producción y obtención de aceites vegetales de alta calidad comienza desde la cosecha de las semillas en el campo. El traslado de las mismas se realiza en camiones, recomendándose el control de la temperatura y la humedad. En las plantas procesadoras de aceite se eliminan las impurezas de las semillas mediante zarandas y ciclones con el fin de mantener la calidad de las mismas durante su almacenamiento en silos, provistos de sistemas de aireación y sensores de temperatura (González, 2011). Contenidos de humedad en las semillas superiores a los recomendados (8–10% para girasol) (Nolasco y col., 2002) pueden originar mayores riesgos de contaminación por hongos, provocando un aumento de temperatura por respiración, así como condiciones favorables para el ataque de insectos. Asimismo, la calidad del aceite puede verse afectada y evidenciar un aumento de la acidez lo que puede favorecer el desarrollo de procesos oxidativos.

1.3.1.1. Acondicionamiento previo a la extracción

Todas las semillas oleaginosas tienen que ser acondicionadas previo al proceso de extracción del aceite. Las operaciones requeridas dependen de la clase de semilla y de la tecnología seleccionada. La preparación consiste en una serie de tratamientos mecánicos y físicos con el objetivo de optimizar la posterior obtención del aceite, ya sea a través del prensado mecánico y/o la extracción sólido-líquido. La finalidad del acondicionamiento es la de calentar el grano para darle plasticidad o bien romper los tejidos que envuelven el glóbulo graso a fin de favorecer el laminado o prensado de la semilla (Autino, 2009).

A continuación, se mencionan las distintas operaciones de acondicionamiento.

I) Limpieza. Consiste en la separación de partículas indeseables que aún permanezcan en las semillas, tales como hojas, tallos, metales, piedras, entre otros, mediante zarandas tamizadoras, con aspiración y separadores magnéticos.

II) Descascarado y reducción de tamaño. El descascarado de las semillas oleaginosas se realiza mediante rodillos (compresión y cizalla) o sistemas centrífugos que provocan la ruptura de la cáscara por impacto. Posteriormente, se separa el material parcialmente descascarado de las cáscaras mediante zarandas y corriente de aire (aspiración). El material descascarado se reduce en tamaño mediante molinos quebrantadores o trituradores. Si bien es posible someter a extracción la semilla entera, su descascarado parcial permite obtener aceites de mejor calidad (menor contenido de pigmentos y ceras presentes en la cáscara) y también harinas residuales de calidad superior (mayor contenido de proteínas por reducción del porcentaje de fibras provenientes de la cáscara) (Bockisch, 1998).

III) Laminado. Consiste en someter las partículas a la acción del molino laminador, con la finalidad de producir la rotura de las células oleíferas y facilitar la liberación del aceite, durante el proceso de extracción por solventes o bien por prensado (Autino, 2009). En esta etapa se forman láminas delgadas para aumentar la superficie interfacial, lo cual facilita la transferencia de calor y de masa y permite mejorar el rendimiento de los procesos de obtención del aceite.

IV) Cocción y/o acondicionamiento de laminillas. El propósito de esta operación puede sintetizarse en los siguientes aspectos, producir la ruptura de las células grasas, coagular las proteínas del grano, incrementar su plasticidad por incremento de la fluidez del aceite, esterilizar los granos destruyendo bacterias y otros microorganismos, desactivar enzimas termosensibles, destruir sustancias tóxicas.

1.3.1.2. Extracción de aceite por prensado en frío

En la mayoría de los molinos aceiteros, la extracción mecánica del aceite se realiza mediante prensas hidráulicas o prensas de tornillos sin fin, como paso previo a la extracción con solventes o directamente como único proceso (Bockisch, 1998).

En esta etapa, las semillas pretratadas son sometidas a una elevada presión de compresión lográndose la separación del aceite, el cual escurre a través del barril de la prensa. El material residual que sale de la prensa con un bajo contenido de aceite residual (6-7%) se denomina torta o “expeller” (Autino, 2009).

El proceso de extracción por prensado es afectado por varios parámetros, tales como el contenido de humedad de la semilla, la capacidad de la prensa y la potencia aplicada (Bockisch, 1998). Durante esta etapa es importante el control de la temperatura y la presión de la prensa para el logro de una buena eficiencia de extracción de aceite y al mismo tiempo, disminuir los procesos oxidativos del aceite, especialmente por el efecto del incremento de los pigmentos clorofílicos.

El aceite extraído, denominado aceite crudo de prensa, se encuentra en condiciones de ser refinado para eliminar las impurezas. Por otra parte, la torta o “expeller”, que aún contiene un alto porcentaje de aceite, es sometida a una segunda extracción utilizando como solvente hexano (Harispe, 2000).

1.3.1.3. Extracción sólido-líquido de aceite

Esta etapa es efectuada para extraer aproximadamente el resto del aceite que no pudo alcanzarse por medios mecánicos o bien para extraer el aceite crudo a partir de semillas con bajos niveles, previamente a su adecuado acondicionamiento (Demarco, 2009). Se debe respetar lo establecido por el Código Alimentario Argentino (CAA, 2008), Art. 526, en cuanto a las características del solvente. La torta procedente del prensado o las semillas pretratadas ingresan al extractor, en el cual mediante el agregado de solvente (generalmente hexano) se extrae el aceite, hasta valores residuales de aproximadamente el 1% de aceite en la torta. Se utilizan diferentes diseños de equipos extractores, los cuales pueden operar por inmersión y/o percolación (González, 2011).

La mezcla de solvente más aceite, llamada miscela, es procesada mediante destilación por vacío o evaporación a fin de obtener el aceite crudo de extracción y, por otra parte, el solvente para ser reutilizado. Posteriormente, se eliminan los finos (residuos de harina) del aceite crudo mediante filtración o decantación centrífuga (clarificación). Ambos aceites de prensa y de extracción pueden mezclarse para posteriormente ingresar en las etapas de refinado (Demarco, 2009; González, 2011).

1.3.1.4. Refinación de los aceites crudos

La refinación de los aceites crudos de origen vegetal permite aumentar la estabilidad, palatabilidad y calidad del producto final, así como contribuir a la obtención de un producto con características organolépticas aceptables, tales como sabor y olor suaves, aspecto límpido, color claro. Este proceso involucra también la remoción de ciertos compuestos minoritarios que pueden ser nocivos para la salud del consumidor (iones metálicos, productos de oxidación, impurezas sólidas) y retiene componentes importantes para su fisiología y nutrición (vitaminas, ácidos grasos esenciales) (List y col., 1992; Harispe, 2000).

La **Figura 1.8** muestra las principales etapas de un proceso de refinación química de aceites vegetales



Figura 1.8. Diagrama de flujo de un proceso de refinación de aceites vegetales

I) Degomado

Consiste en la remoción de sustancias proteicas, coloides o partículas pequeñas en emulsión, fosfolípidos, ceras mucilaginosas, gomas, etc., que con el

tiempo pueden polimerizar y/o precipitar, disminuyendo el rendimiento en las etapas subsiguientes y su calidad final (Dijkstra y van Opstal., 1989). Se efectúa mediante la hidratación de los fosfolípidos y material mucilaginoso con el propósito de reducir su solubilidad en el aceite y en consecuencia, facilitar su remoción con la fase acuosa. Asimismo, se adicionan pequeñas cantidades (0,1-0,2%) de ácidos fosfórico o cítrico para convertir los restantes fosfolípidos no hidratables (sales de Ca y Mg) en fosfolípidos hidratables y así poder extraerlos de la matriz, mediante centrifugación.

Existen en la actualidad varias metodologías de degomado utilizadas a nivel industrial. Entre los más comunes se encuentran el degomado con agua, el degomado ácido, el unidegomado, el degomado total, el llamado “soft” y el degomado enzimático (List, 1989).

Cabe destacar la posibilidad de obtener lecitina comercial a partir de las gomas purificadas como un subproducto valioso para la industria alimentaria (Haraldsson, 1983).

II) Neutralización

Consiste en agregar un ligero exceso de una solución de hidróxido de sodio a fin de neutralizar los ácidos grasos libres (responsables de la acidez del aceite). El material resultante pasa por centrífugas y allí se separan el aceite neutro y las “borras de neutralización” (Harispe, 2000).

III) Blanqueado

Esta etapa permite adsorber la clorofila que es un poderoso pro oxidante del aceite, destruir los hidroperóxidos, adsorber algunos de los productos secundarios de oxidación y parte de los compuestos coloreados, mediante la utilización de tierras minerales naturales (neutras) o activadas con ácidos, obteniéndose por filtración un aceite de características organolépticas aceptables (Villa Salinas, 2009). Asimismo, otros compuestos remanentes de etapas anteriores (fosfolípidos, trazas de metales, jabones) también pueden ser eliminados. Las tierras de blanqueo utilizadas son selectivas para el tipo de compuesto a remover, utilizándose generalmente arcillas tipo “supreme” y dióxido de silicio.

Los parámetros de operación más empleados son agitación (100 a 200 rpm), temperatura (95 a 120°C), tiempo de contacto (20 a 30 min), presión (60 a 100 mm Hg) y tierra de blanqueo (0,7 a 0,9% respecto del contenido de aceite).

IV) Desodorización

Esta etapa tiene como finalidad la remoción de los compuestos volátiles, principalmente aldehídos y cetonas. Se trata fundamentalmente de un proceso de destilación con arrastre con vapor, llevado a cabo a bajas presiones a fin de modificar las presiones parciales de los componentes volátiles destilándolos con mayor facilidad. La desodorización mejora el aspecto, sabor, color y la estabilidad oxidativa del aceite por la remoción de los ácidos grasos libres (FFA) remanentes, otros componentes volátiles, así como la destrucción térmica de peróxidos. Paralelamente, pueden eliminarse parcialmente tocoferoles y fitoesteroles.

La desodorización se realiza, dependiendo del tipo de aceite, a una temperatura entre 180 y 270°C y a una presión de 2 a 6 mbar. El tiempo de residencia dentro del desodorizador varía de 15 a 80 min, siendo lo más usual 45 a 60 min. El tiempo de desodorización es importante para la eliminación máxima de las sustancias volátiles, así como para la reducción del color. El color en los aceites es provocado por los carotenoides que se descomponen por la acción de la temperatura en cadenas cortas y consecuentemente volátiles. En la desodorización se observa una gran reducción del color del aceite (Dudrow, 1983; Dorsa, 2009).

V) Winterizado (descerado)

La presencia de ceras en aceites vegetales puede traducirse en una apariencia turbia en el aceite a temperatura ambiente (Gunstone, 2002), lo cual es un atributo no deseable para el consumidor. Esta etapa de la refinación consiste en la insolubilización de ceras (cristalización), las cuales son ésteres de ácidos grasos y alcoholes de alto peso molecular (entre 36 y 48 átomos de carbono) y otros compuestos, mediante una reducción considerable de la temperatura.

El proceso se realiza mediante la inducción de la nucleación y el crecimiento de los cristales de cera lo cual debe ser optimizado mediante la adecuada selección de las condiciones operativas (Temperaturas inicial y final, velocidad de enfriamiento, condiciones de agitación, características del cristizador) a fin de lograr un tamaño de partículas que puedan ser separadas mediante filtración o centrifugación. Luego de dicha etapa y durante su vida útil, el aceite no debe poseer turbidez aún a bajas temperaturas (Carelli y col., 2002). En caso de ser necesario, se realiza el pulido, el cual es una etapa opcional que permite eliminar sustancias que

pueden otorgarle opacidad al aceite (González, 2011). Las condiciones de trabajo más utilizadas son, temperatura (9 a 14°C) y tiempo de residencia aproximado en el madurador (12 h).

1.3.2. Oxidación lipídica

Los lípidos insaturados pueden sufrir procesos de deterioro durante el procesamiento, almacenamiento y/o manipulación de alimentos. Estos procesos pueden dar origen a compuestos tóxicos o indeseables desde el punto de vista de la calidad organoléptica del producto y afectar tanto las propiedades funcionales de sus componentes, como su valor nutricional (Tironi, 2005).

Las reacciones de autooxidación pueden dividirse en tres etapas principales: iniciación, propagación y terminación (**Figura 1.9**). La oxidación lipídica es auto-catalítica; una vez iniciada, la reacción se autopropaga y autoacelera. Pequeñas cantidades de compuestos prooxidantes y antioxidantes causan cambios significativos en la velocidad de reacción (Shaich, 2005).

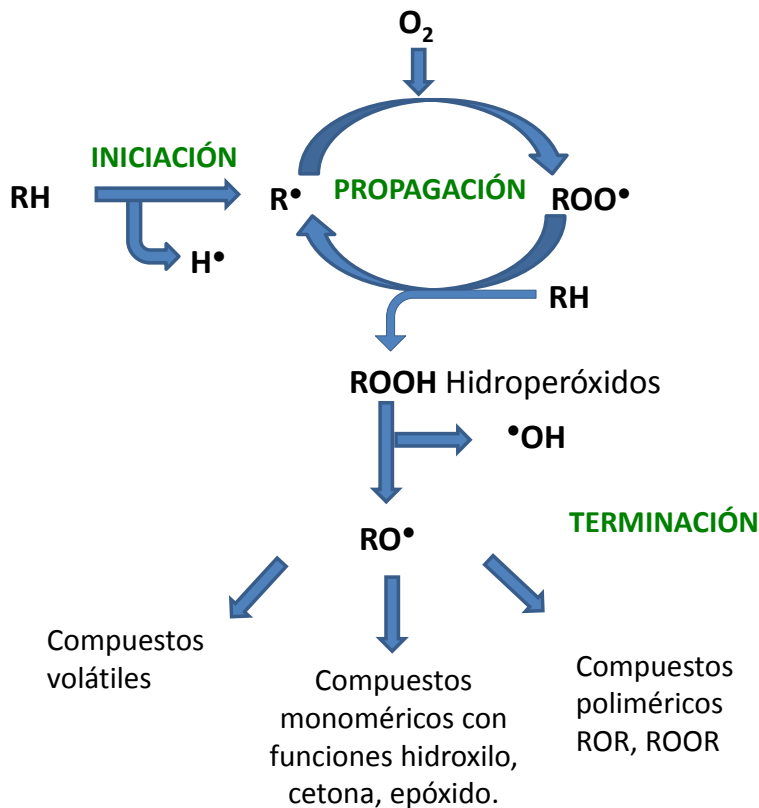
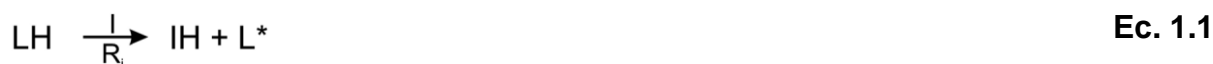


Figura 1.9. Etapas de la oxidación lipídica (Márquez-Ruiz, 2008)

Iniciación

La oxidación directa de los lípidos insaturados por el oxígeno triplete (la forma más estable del oxígeno) es termodinámicamente desfavorable, dado que los dobles enlaces de los ácidos grasos se encuentran en estado singulete y tal reacción no cumpliría con la regla de la conservación del spin. En función de ello, la producción de los primeros radicales debe ser catalizada. En presencia de factores de iniciación o iniciadores (I), los lípidos insaturados (LH) pierden un radical hidrógeno (H^\bullet) de la posición α con respecto a los dobles enlaces del ácido graso para formar un radical libre lipídico (L^\bullet) según la reacción **Ec. 1.1**.



Los iniciadores pueden producir radicales por disociación térmica de los hidroperóxidos presentes tales como impurezas o por descomposición de hidroperóxidos catalizada por metales o exposición a la luz.

Por otra parte, el oxígeno singulete puede reaccionar con los ácidos grasos insaturados con mucha mayor velocidad que el oxígeno triplete generando hidroperóxidos, los cuales pueden servir como iniciadores de las reacciones anteriores. La vía más común de generación del oxígeno singulete es la fotosensibilización de los pigmentos naturales presentes en los alimentos, tales como clorofila, hemoglobina y mioglobina (Frankel, 2005).

Propagación

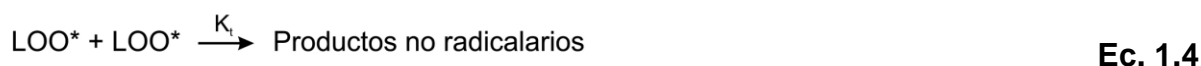
El radical libre lipídico (L^\bullet) reacciona muy rápidamente con el oxígeno molecular para formar radicales peroxilo (LOO^\bullet) (**Ec. 1.2**). Esta reacción es mucho más rápida que la siguiente, en la cual se transfiere un hidrógeno de otra molécula lipídica LH para dar un hidroperóxido LOOH y otro radical L^\bullet (**Ec. 1.3**).



La susceptibilidad de los lípidos a la autooxidación depende de la disponibilidad y de la relativa facilidad de los hidrógenos alílicos para reaccionar con los radicales peroxilo. Debido a la estabilización por resonancia de las especies L^{\bullet} , pueden formarse hidroperóxidos isoméricos. Los hidroperóxidos son los productos primarios fundamentales de la oxidación lipídica, dado que son relativamente inestables y participan en numerosas reacciones posteriores. En los primeros estadios de la autooxidación, su velocidad de formación excede a la velocidad de descomposición; mientras que en los últimos se registra la relación inversa (Frankel, 2005).

Terminación

En esta etapa del proceso oxidativo, luego de alcanzar un máximo, la velocidad disminuye, los radicales peroxilo reaccionan unos con otros formando productos no radicalarios tales como cetonas, epóxidos, alcoholes, monómeros, dímeros y polímeros, conocidos como compuestos secundarios (**Ec. 1.4**).



Los hidroperóxidos pueden sufrir reacciones tales como la homólisis catalizada por metales o calor, generando radicales peroxilo y alcoxilo que pueden continuar la cadena amplificando el proceso de oxidación, o bien formar productos finales no radicalarios (Tironi, 2005).

Otras reacciones de terminación involucran la condensación de radicales peroxilo (LOO^*), alcoxilo (LO^*) o alquilo (L^*), siendo dependientes de la presión de oxígeno y de la temperatura. Algunas de estas reacciones se muestran a continuación:



Descomposición de los hidroperóxidos

Los hidroperóxidos generados por el mecanismo de radicales libres sufren una posterior descomposición mediante rutas de reacción complejas que conducen a la formación de una mezcla de sustancias monoméricas, poliméricas y volátiles de bajo peso molecular (productos secundarios) (Nawar, 1996). Cada hidroperóxido produce un conjunto de productos de degradación típicos y específicos, dependiendo de la posición del grupo peróxido en la molécula. Estos productos pueden a su vez sufrir posteriores oxidaciones y descomposiciones, contribuyendo a un gran “pool” de radicales libres (Frankel, 2005).

1.3.2.1. Factores que afectan la velocidad de autooxidación lipídica

Diversos factores relacionados con los ácidos grasos presentes, las características físicas y químicas del alimento así como también la presencia de otros componentes tienen efecto sobre el proceso de oxidación lipídica. A continuación se enumeran y describen los principales factores involucrados.

I) Composición de los ácidos grasos

El número, posición y geometría de los dobles enlaces afecta la velocidad de oxidación. Las menores energías de disociación asociadas a hidrógenos unidos a carbonos se encuentran entre dobles enlaces adyacentes (Nawar, 1996). Por lo tanto, éstos son los sitios más favorecidos termodinámicamente para ser atacados por los radicales peroxilo, por ello a mayor grado de insaturación la velocidad de oxidación es mayor. Por otra parte, los isómeros *cis* se oxidan más rápidamente que los *trans*, la longitud de la cadena del ácido graso no tiene efecto aparente en la velocidad o extensión de la formación de radicales y los ácidos grasos libres se oxidan a mayor velocidad que los esterificados.

II) Concentración de oxígeno

En condiciones de alta concentración de oxígeno (condiciones atmosféricas), la velocidad de oxidación es independiente de la misma; pero a muy bajas concentraciones, la velocidad es aproximadamente proporcional a esta variable (Davidovich y col., 1980).

III) Temperatura

La velocidad de las reacciones asociadas con la oxidación lipídica aumenta en función del aumento de la temperatura. La temperatura ejerce un efecto sobre la presión parcial de oxígeno así como también actúa disminuyendo la solubilidad del oxígeno (Tironi, 2005).

IV) Área superficial

La velocidad de oxidación se incrementa proporcionalmente al área superficial expuesta de los lípidos (Tironi, 2005).

V) Humedad

En alimentos con muy baja actividad acuosa ($a_w < 0,1$) la oxidación ocurre a una elevada velocidad. Luego, a medida que la a_w aumenta hasta aproximadamente 0,3, la velocidad disminuye alcanzando un mínimo, para incrementarse nuevamente a mayores valores de a_w (Labuza y col., 1972).

VI) Agentes prooxidantes

La presencia de trazas de metales de transición, tales como el cobre y el hierro, producen un efecto de catálisis sobre el proceso de oxidación lipídica, favoreciendo la formación de radicales libres (Frankel, 2005).

VII) Energía radiante

Tanto la radiación visible, ultravioleta como gamma son promotoras de la oxidación lipídica (Frankel, 2005).

VIII) Agentes antioxidantes

Los antioxidantes son un extenso grupo de compuestos químicos que tienen la capacidad de inhibir o retrasar los procesos de oxidación. Estos compuestos pueden clasificarse en dos grandes grupos: sintéticos y naturales.

Los antioxidantes sintéticos han sido empleados durante muchos años por la industria de alimentos aunque en la actualidad son cuestionados por razones de índole toxicológica. Este hecho ha originado una tendencia de sustitución progresiva de los mismos por antioxidantes naturales (Frankel, 2005).

Los antioxidantes pueden actuar mediante distintos mecanismos de reacción con respecto a la secuencia de reacciones del proceso de oxidación lipídica: a)

disminuyendo la concentración de oxígeno, b) interceptando al oxígeno singulete, c) atrapando (“scavenging”) radicales libres tales como los radicales hidroxilo (OH^\bullet), d) por unión con metales (agentes prooxidantes), e) favoreciendo la descomposición de productos primarios a compuestos no radicalarios, f) por interrupción de la cadena de iniciación o propagación transfiriendo átomos de hidrógeno a los radicales lipídicos (L^\bullet) y peroxilo (LOO^\bullet) (Shahidi, 1997; Frankel, 2005).

1.4. LECITINA

En 1846-47 el químico francés Maurice Gobley realizó el aislamiento de una sustancia de color naranja de la yema de huevo. En 1850, le dio a este material el nombre de “lecitina”, término derivado del griego 'lekithos' (yema de huevo). Una característica importante de este material es su contenido de fósforo, unido orgánicamente a una estructura de tipo lipídica (Wendel, 2001).

Posteriormente, otros científicos observaron que los productos químicos aislados no tenían una estructura química uniforme y comprendían un grupo de componentes químicos similares claramente diferenciados, siendo clasificados como fosfolípidos o fosfátidos. También encontraron que esta clase de compuestos está presente en todos los tejidos orgánicos ya sean de origen vegetal, animal o humano (van Nieuwenhuyzen y Tomás, 2008a).

La principal fuente de la lecitina ha sido la yema de huevo, su costo era elevado y su disponibilidad baja para aplicaciones industriales. En consecuencia, fue necesaria la búsqueda de fuentes alternativas, tal como la soja (*Glycine max* L.), cuyo aceite presentaba una tendencia a tornarse opalescente. Para prevenir este fenómeno, se implementó un tratamiento de degomado sobre el aceite crudo, el cual generó el subproducto denominado lecitina de soja. En los EEUU, la lecitina se desarrolló como producto comercial en distintas formas (polvo, fluida), principalmente para uso en el área comestible (Wendel, 2001).

Así, la lecitina es considerada actualmente como un subproducto del proceso de refinación de los aceites vegetales y en algunas compañías representa un co-producto principal. Las concentraciones más altas de lecitina, además de la yema de huevo, se encuentran en las semillas oleaginosas tales como la soja, el girasol, la colza y otros. Las características químicas y el rendimiento bruto de la lecitina son variables entre los distintos tipos de oleaginosas, siendo la lecitina de soja la más

comercializada. En la **Tabla 1.7** se pueden observar diferentes fuentes de lecitina, rendimientos y algunas propiedades tales como color y apariencia (Dashiell, 2001).

Tabla 1.7. Rendimiento y características de lecitinas de diversos aceites crudos

Fuente	Rendimiento (%)	Color	Apariencia
Maíz	2.0	14+	Fluido oscuro
Algodón	2.4	18+	Sólido oscuro
Soja	2.9	10+	Pastoso ámbar
Cártamo	1.4	12+	Pastoso marrón
Girasol	0.7	11+	Fluido marrón
Canola	1.9	13+	Pastoso marrón

En la **Tabla 1.7** se observa que el rendimiento de lecitina de girasol es menor al 1%. La revalorización de este subproducto es importante en aquellos países que producen aceite de girasol a gran escala (Holló y col., 1993). El mercado mundial de las lecitinas comerciales se encuentra liderado por la lecitina de soja, estimándose su volumen de producción en 150.000 –170.000 tn por año. No obstante, países que presentan cultivos de girasol destinados a la producción de aceite como Argentina, Hungría, Ucrania y Francia, han comenzado a fomentar la industrialización de las lecitinas de esta fuente oleaginosa (van Nieuwenhuyzen y Tomás, 2008a), la cual se encuentra en permanente incremento. Las principales compañías argentinas dedicadas a producir y exportar lecitinas de soja y de girasol son Solae Argentina (DuPont), Emulgrain, SG Lecitinas SRL, SL Natural SRL y Compte y Rivera S.A. En 2012 se registraron exportaciones argentinas por 28.402 tn de lecitina de origen vegetal. Los principales destinos fueron Holanda (51,8%), Chile (24,6%), Tailandia (11,8%) y España (2,3%), entre otros (Risso, 2012).

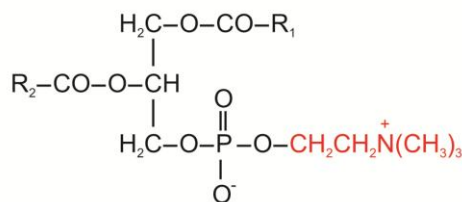
1.4.1. Estructura molecular de las lecitinas (fosfolípidos)

Las lecitinas de origen vegetal son una mezcla de fosfolípidos constituida principalmente por fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilinositol (PI), y en menor proporción por ácido fosfatídico (PA) y otras sustancias (triglicéridos, carbohidratos, etc), pudiendo variar su composición original según el

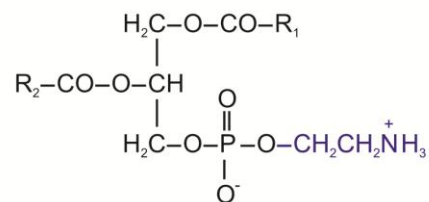
tipo y procedencia de las semillas, condiciones de maduración y almacenamiento postcosecha, transporte, etc (List y col., 1992; Cabezas, 2010).

Los fosfolípidos son análogos a los triglicéridos pero tienen sólo dos ácidos grasos esterificados en el glicerol. La mayor diferencia es que la tercera posición de la fracción del glicerol está fosforilada y dicho grupo puede presentar diferentes sustituyentes, lo que contribuye a la funcionalidad de la lecitina (Cabezas, 2010).

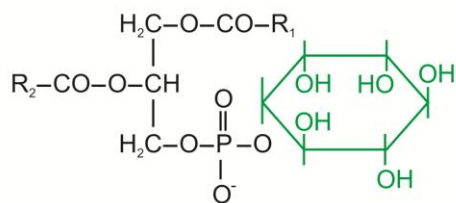
Los glicerofosfolípidos o fosfolípidos son anfipáticos, es decir contienen a la vez una región polar (grupos hidrofílicos) o grupo de la cabeza, constituido por el fosfato cargado y por las sustituciones sobre el mismo y una cola no polar (con grupos hidrofóbicos) de cadenas hidrocarbonadas correspondientes a las porciones de ácidos grasos. El 1,2-diacilglicerol 3-fosfato o ácido fosfatídico, es el compuesto origen de una serie de glicerofosfolípidos, en los que los diferentes compuestos que contienen hidroxilos están esterificados con el grupo fosfato. Estos compuestos pueden diferenciarse en amino alcoholes (colina, etanolamina) y compuestos polihidroxilos (glicerol, inositol) (Devlin, 2004). En las lecitinas de origen vegetal, los principales compuestos unidos por el enlace fosfodiéster al glicerol son colina, etanolamina e inositol (**Figura 1.10**).



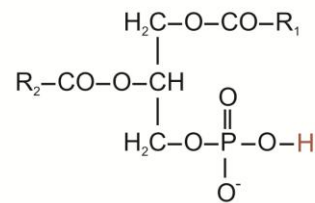
Fosfatidilcolina (PC)



Fosfatidiletanolamina (PE)



Fosfatidilinositol (PI)



Acido fosfatídico (PA)

R_1 y R_2 = Ácidos Grasos (saturados o insaturados)

Figura 1.10. Estructura molecular de los principales fosfolípidos

La **Tabla 1.8** muestra la composición de diferentes extractos de fosfolípidos libres de aceites en productos de origen vegetal (Bueschelberger, 2004), es decir, la mezcla de fosfolípidos obtenidos por el degomado acuoso del aceite crudo. Dado que este proceso de degomado no elimina todos los fosfátidos del aceite, la **Tabla 1.8** no refleja la composición de los fosfolípidos en el aceite crudo.

Tabla 1.8. Composición de diferentes extractos de fosfolípidos libres de aceites en productos de origen vegetal

Fosfolípidos (%)	Soja	Girasol	Canola	Maíz
Fosfatidilcolina	24	25	25	30
Fosfatidiletanolamina	22	11	22	3
Fosfatidilinositol	15	19	15	16
Ácido fosfatídico	7	3	-	9
Lisofosfolípidos	3	-	5	5
Otros fosfolípidos	5	-	19	-

La distribución de los componentes principales de fosfolípidos de la lecitina de girasol, es similar a la de la lecitina de soja. La actividad superficial de la lecitina de girasol, generalmente no se considera diferente de la de soja, por lo que la misma puede llegar a ser utilizada como un aditivo alimentario, después de su purificación (Holló y col., 1993).

En general, la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos refleja la composición de ácidos grasos del aceite en el que se encuentran estos fosfátidos, pero tiende a tener un mayor contenido de ácido palmítico e inferior de ácido oleico respecto a dicho aceite, como se ilustra en la **Tabla 1.9** (Dijkstra, 2011).

Tabla 1.9. Composición de ácidos grasos de lecitinas y aceites vegetales

Acidos grasos	Soja		Girasol		Canola	
	Lecitina	Aceite	Lecitina	Aceite	Lecitina	Aceite
C16:0	16	11	11	7	7	4
C18:0	4	4	4	5	1	2
C18:1	17	23	18	29	56	61
C18:2	55	54	63	58	25	22
C18:3	7	8	0	0	6	10
Otros	1	0	4	1	5	1

1.4.2. Producción de lecitinas vegetales

El aceite crudo es un sistema multicomponente en el que coexisten en una matriz de triglicéridos, fosfolípidos y otras sustancias minoritarias. A fin de estabilizar los aceites vegetales, los fosfolípidos y glicolípidos deben ser eliminados durante el proceso de refinación en la etapa de degomado tal como se mencionó anteriormente en la sección **3.1.4 a)** (Bueschelberger, 2004).

Los mecanismos que gobiernan la extracción de los fosfolípidos son complejos y han sido estudiados principalmente en sistemas modelo. Ahora bien, el proceso de degomado se fundamenta principalmente en la propiedad de los fosfolípidos de formar estructuras ordenadas en medio acuoso tales como estructuras lamelares (micela, bicapa), hexagonales directa o reversa las cuales tienen un peso específico mayor que el aceite, lo que facilita su separación. La fosfatidilcolina (PC) tiende a formar bicapas cerradas concéntricas (vesículas), las cuales pueden contener en determinadas condiciones, fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilinositol (PI), y en menor proporción ácido fosfatídico (PA). Además, estas bicapas estarían separadas de la contigua por agua (“swelling” de los fosfolípidos) (Larsson, 1994).

El degomado con agua (**Figura 1.11**) se realiza a través de un tratamiento térmico del aceite con agua (1-3%) aplicando una agitación vigorosa entre 10 a 60 min, dependiendo del proceso empleado. Durante el mismo, la temperatura del aceite debe controlarse entre 60-80°C, ya que las altas temperaturas favorecen la solubilidad de los fosfolípidos y en cambio, las bajas temperaturas incrementan la viscosidad, dificultando la separación (O’Brien, 1998). La adición de agua posibilita

la hidratación de los lípidos polares presentes en el aceite, haciéndolos insolubles. Los fosfolípidos hidratados forman una goma con una densidad específica mayor que la del aceite (van Nieuwenhuyzen y Tomás, 2008a).

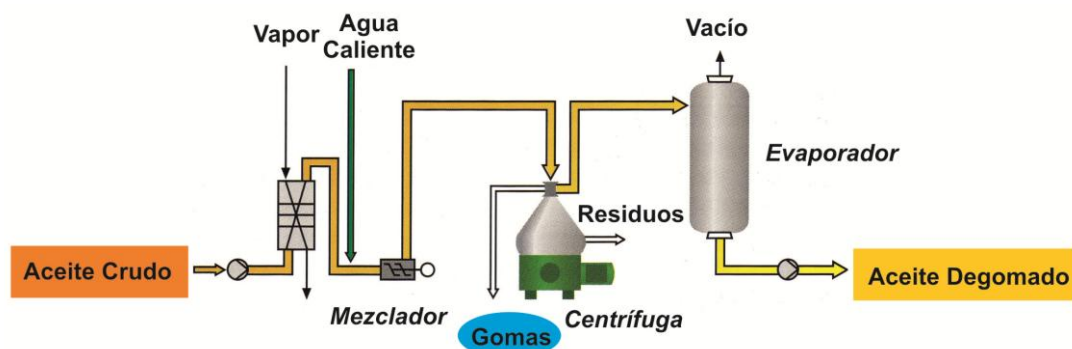


Figura 1.11. Proceso de degomado con agua (Harispe, 2000)

Los fosfolípidos que son completamente extraídos mediante el degomado acuoso son aquellos que se denominan hidratables, tales como PC y PI, mientras que PE y PA son fosfátidos no hidratables y no pueden ser extraídos en su totalidad mediante este proceso. La presencia de iones Ca^{+2} varía considerablemente la capacidad de hidratación de los fosfolípidos, por ello la dureza del agua es un factor que debe ser tenido en cuenta (Al-Kahtani, 1984). En la **Tabla 1.8** se observan los valores de hidratabilidad para los diferentes fosfolípidos extraídos a 80°C durante el degomado de aceite crudo de soja (Gibon y Tirtiaux, 1998).

Tabla 1.8. Tasa de hidratación relativa a 80°C en aceite de soja (Gibon y Tirtiaux, 1998)

Fosfolípido	Tasa de Hidratación
PC	100,0
PI	44,0
PI(Ca^{+2})	24,0
PE	16,0
PE (Ca^{+2})	0,9
PA	8,5
PA (Ca^{+2})	0,6

El adecuado almacenamiento de las semillas y un descascarado eficiente antes de la molienda mantienen baja la actividad de la enzima fosfolipasa, lo que evita la hidrólisis de PC en PA. Por lo general, con el degomado acuoso se obtiene

un aceite degomado con 50-100 ppm de fósforo residual. Los fosfátidos no hidratables restantes (PE, PA) pueden convertirse en hidratables en una segunda etapa con ácidos cítrico o fosfórico o bien degomado enzimático con diversas fosfolipasas. Estos procesos dan como resultado aceites con 5-10 ppm de P residual, compatible con un proceso de refinación física, económicamente eficiente. Mayormente, las gomas de lecitina a partir de la segunda etapa no se utilizan para la producción de lecitina, por razones económicas y técnicas (van Nieuwenhuyzen y Tomás, 2008b).

Las gomas, mezcla de fosfolípidos hidratados, después de un período en reposo de hasta 60 min son separadas del aceite mediante centrífugas continuas (Flider, 1985). Este subproducto del proceso de degomado puede contener hasta 50% de agua, 33% de fosfolípidos y de glicolípidos y alrededor de 17% de aceite (Ziegelitz, 1995).

La lecitina vegetal en bruto se obtiene mediante un adecuado proceso de secado hasta un contenido de humedad del 1%, logrando así una estabilidad microbiana, calidad y vida útil (Bueschelberger, 2004; van Nieuwenhuyzen y Tomás, 2008a). Para el secado de lecitinas de forma continua o discontinua se utilizan evaporadores de película. El enfriamiento de la lecitina a 50°C es necesario para evitar el post-oscurecimiento. Por lo tanto, se aconseja el uso de un intercambiador de calor justo después de la secadora. Para el almacenamiento a granel, se recomienda una temperatura de alrededor de 40°C en un lugar seco y el uso adecuado de tanques con agitación, a fin de mantener la homogeneidad de la lecitina almacenada. La lecitina puede ser fácilmente almacenada durante más de un año a 20-30°C, sin cambios significativos en la calidad del producto y en sus propiedades funcionales (van Nieuwenhuyzen y Tomás, 2008a).

La lecitina natural tiene un color marrón el cual puede ser atribuido a componentes tales como carotenoides, melanoïdes y porfirinas. Una leve decoloración de las gomas preferentemente antes del secado con una solución de H₂O₂ 35% es posible, debiendo cumplir con la normativa de la UE aditivo E322 apto para usos alimentarios, como la especificación legal de los valores de peróxido (PV) (máximo 10 meq O₂/kg aceite). La industria alimentaria puede incluso requerir un menor valor de peróxido a fin de lograr una mayor vida útil de los alimentos procesados. Por lo tanto, el efecto del blanqueado sobre el color es limitado, aunque

tiene un impacto positivo en el contenido microbiológico (van Nieuwenhuyzen y Tomás, 2008b).

1.4.3. Aspectos de calidad y análisis de las lecitinas

Las especificaciones que deben cumplir las lecitinas para ser consideradas de grado alimentario se encuentran reguladas por el *Codex Alimentarius* de la FAO/OMS, la Unión Europea bajo el código E322 y el *Food Chemical Codex* de la FDA, estando enmarcada en la lista de sustancias generalmente reconocidas como seguras (GRAS), sin limitación en lo que respecta a la ingestión diaria admisible (Cabezas, 2010).

Con el nombre de lecitina se conoce comúnmente a la mezcla de lípidos polares constituida fundamentalmente por fosfolípidos.

La definición principal de lecitina dada bajo el código E-322 por la Unión Europea es:

Las lecitinas son mezclas o fracciones de fosfolípidos obtenidas por medio de procedimientos físicos a partir de sustancias alimenticias animales o vegetales; incluyen asimismo los productos hidrolizados obtenidos por utilización de enzimas adecuadas e inocuas. El producto final no debe mostrar actividad enzimática residual.

Las lecitinas pueden ser blanqueadas ligeramente en medio acuoso por medio de peróxido de hidrógeno, pero dicha oxidación no debe afectar químicamente a los fosfolípidos (Bueschelberger, 2004).

Varios métodos son utilizados habitualmente para la determinación de las especificaciones durante la producción, control de calidad y la comercialización de lecitinas. A continuación se describen brevemente las determinaciones asociadas a la calidad, su significado e implicancias.

I) Sustancias insolubles en acetona (IAc)

La cantidad de materia insoluble en acetona (% IAc) brinda información sobre la cantidad aproximada de fosfolípidos, glicolípidos e hidratos de carbono, ya que el aceite y los ácidos grasos se disuelven en acetona. El contenido de IAc (%) no debe ser inferior al 60%. En la lecitina cruda IAc es sinónimo de actividad, es decir de sus propiedades funcionales o nutricionales. La abreviatura 'IAc' también puede ser

referido a ingredientes activos (Bueschelberger, 2004; van Nieuwenhuyzen y Tomás, 2008b).

II) Sustancia insolubles en Hexano (IH)

El nivel de materia insoluble en hexano (IH) es una medida de la pureza de la lecitina. La materia IH por lo general está formada de fibra residual, pero a veces partículas contaminantes pueden introducirse durante el proceso (ej. auxiliares de filtración). El nivel de materia IH en la lecitina cruda no debe exceder el 0,3% y rara vez supera el 0,1%. La materia IH de lecitina es perjudicial para la claridad y la facilidad de uso en algunas aplicaciones específicas. En Europa, frecuentemente es usado el método similar de Insoluble en tolueno (IT).

III) Índice de acidez (IA)

En el caso que las semillas oleaginosas utilizadas como fuente de materia prima no hayan sido adecuadamente almacenadas, ciertos compuestos lipídicos pueden degradarse (hidrólisis) y los ácidos grasos libres pasar a la lecitina cruda. El valor de acidez (IA) expresa la acidez de la lecitina en mg de KOH/g de muestra. Los valores deben ser menores a 35 mg de KOH/g. La lecitina hidrolizada a menudo contiene ácidos grasos libres provenientes del proceso de hidrólisis. Además, la lecitina presenta un valor de pH neutro en medios acuosos (Bueschelberger, 2004; van Nieuwenhuyzen y Tomás, 2008b).

IV) Valor de Peróxido (PV)

Conjuntamente con las pruebas organolépticas, el valor de peróxido proporciona un criterio para evaluar los niveles de deterioro de las lecitinas. El PV de la lecitina producida a partir de granos frescos o almacenados de manera óptima, está por lo general por debajo de 2 meq O₂/kg aceite. El PV en la lecitina es resultado principalmente del peróxido de hidrógeno residual del blanqueo (Bueschelberger, 2004; van Nieuwenhuyzen y Tomás, 2008b)

V) Humedad

Las lecitinas son sustancias anfífilas, por lo que habitualmente contienen pequeñas cantidades de agua. Dado que el crecimiento microbiano depende del agua, el contenido está restringido a un máximo de 2,0%, siendo generalmente inferior al 1,0%, por lo que los productos con lecitina tienen muy bajo nivel de

actividad de agua. La humedad es determinada por el método de Karl Fisher (Bueschelberger, 2004; van Nieuwenhuyzen y Tomás, 2008b).

VI) Color

El color de la lecitina es fundamentalmente una norma estética de calidad. Los consumidores generalmente no prefieren los ingredientes de color oscuro. De acuerdo a especificaciones internacionales, los tonos de color ámbar de la lecitina se miden en la escala de color Gardner. La gama de colores claros de la mayoría de las lecitinas está generalmente en el rango de 9-17 Gardner en forma diluida, de acuerdo con el método AOCS Ja 9-87. Si la lecitina es turbia, el color puede ser determinado en una dilución filtrada en hexano o tolueno, usualmente en una proporción de 1:10, que siempre debe ser informado en el certificado de análisis (Bueschelberger, 2004; van Nieuwenhuyzen y Tomás, 2008b).

VII) Consistencia

Las lecitinas están disponibles en forma líquida, como pastas y plásticas (sólidas). Las lecitinas líquidas generalmente tienen características de un fluido newtoniano. El perfil de la viscosidad de las lecitinas es una función compleja del contenido de insolubles en acetona, humedad, contenido de minerales, índice de acidez y una combinación de los efectos de una variedad de aditivos, como los aceites vegetales y los surfactantes (tensioactivos) (van Nieuwenhuyzen y Tomás, 2008b).

VIII) Transparencia

En algunas plantas de procesamiento, los niveles de materia insoluble en hexano (IH) son elevados, este material lípido insoluble puede causar turbidez en lecitinas fluidas. Con las técnicas modernas de micelas y de filtración del aceite, pueden ser producidas lecitinas límpidas, visualmente transparentes, con muy bajo o incluso sin contenido de IH. Así mismo, un nivel de humedad superior al 1% puede contribuir también a la falta de claridad. La falta de transparencia, además de ser un problema estético, si es causado por el material IH, puede estar asociado a la presencia de sedimentos en función del tiempo.

IX) Aspectos microbiológicos

Las lecitinas con un bajo recuento microbiológico son requeridas para su uso en alimentos y en productos farmacéuticos. La producción de lecitina debe realizarse en un sistema cerrado que cumpla con las normas HACCP y GMP, pudiendo así obtener lecitinas de grado alimentario. La pequeña adición de peróxido de hidrógeno, puede reducir el contenido microbiológico total (van Nieuwenhuyzen y Tomás, 2008b).

1.4.4. Procesos de modificación de lecitinas

La introducción de cambios en la concentración relativa original de la lecitina o en su estructura química puede dar lugar a la obtención de lecitinas modificadas: lecitinas en polvo, fracciones enriquecidas en un determinado fosfolípido o bien lisoderivados (mezcla de lisofosfolípidos y fosfolípidos) es decir, lecitinas con distintas propiedades fisicoquímicas y funcionales respecto a la de origen, aplicables en el desarrollo de diversos productos (productos de panadería, margarinas, chocolates) (Schneider, 1989; van Nieuwenhuyzen, 1999; van Nieuwenhuyzen y Tomás, 2008b).

Para este propósito, los ácidos grasos o el grupo de cabeza pueden ser modificados mediante modificación con solventes, agentes enzimáticos y químicos (Tabla 1.9) (Cabezas, 2010).

Tabla. 1.9. Métodos de modificación de las lecitinas

Modificación	Método	Producto final
Fraccionamiento con Solventes	- Separación con acetona - Fraccionamiento con etanol	- Lecitina “deoiled” o en polvo - Fracciones enriquecidas en un determinado PL (PC, PI, PE)
Enzimática	- Fosfolipasas (A ₁ ; A ₂ ; B, C y D)	- Lecitinas hidrolizadas o lisofosfolípidos
Química	- Acilación - Hidroxilación - Hidrogenación	- Lecitina acetilada - Lecitina hidroxilada - Lecitina hidrogenada

1.4.4.1. Fraccionamiento

Remoción del aceite residual con acetona (“Deoiling”)

Las lecitinas vegetales fluidas contienen alrededor de 30-40% de lípidos neutros, principalmente triglicéridos. A fin de mejorar las características de procesamiento de estos materiales de elevado nivel de viscosidad, así como sus propiedades de dispersabilidad, la industria tiene en cuenta que los lípidos polares (fosfolípidos y glicolípidos) son significativamente insolubles en acetona mientras que los lípidos neutros se disuelven en ella (Gober y col., 1995). En este sentido, la acetona es el solvente más usado en la industria para la separación de glicéridos y fosfolípidos (Sipos y Szuhaj, 1996). La extracción con acetona conduce a la obtención de productos en polvo o granulados ligeramente higroscópicos, los que contienen 2-3% de lípidos neutros residuales.

Un inconveniente en la utilización de acetona como solvente es la formación de ciertos productos de reacción como el óxido de mesitilo. La formación de este compuesto es fuertemente dependiente del tiempo de contacto entre la acetona y los fosfolípidos (Schneider, 2008). Otros problemas relacionados con el uso de acetona para la extracción de aceite presente en la lecitina, es su tendencia para formar aductos tipo base de Schiff con fosfolípidos que poseen grupos amino, tales como la fosfatidiletanolamina (Kuksis y col., 2005).

Los fosfolípidos presentan grupos hidrofílicos, lo cual facilita su separación de los triglicéridos apolares. Las lecitinas en polvo o granuladas presentan ventajas frente a las lecitinas nativas especialmente durante la operación de dosificación en los diferentes procesos industriales (van Nieuwenhuyzen y Tomás, 2008b).

Los triglicéridos se disuelven en acetona en contraste con otros compuestos más polares (fosfolípidos y glicolípidos) presentes en las lecitinas vegetales nativas. La cantidad de materia insoluble en acetona de las diferentes lecitinas es utilizada como parámetro de calidad de las mismas en el marco regulatorio de organismos de referencia como la American Oil Chemists’ Society (AOCS, Ja 4-46) y la German Society for Fat Science (DFG, F-I 5). Un esquema de este proceso de fraccionamiento puede observarse en la **Figura 1.12** (Schneider, 1989).

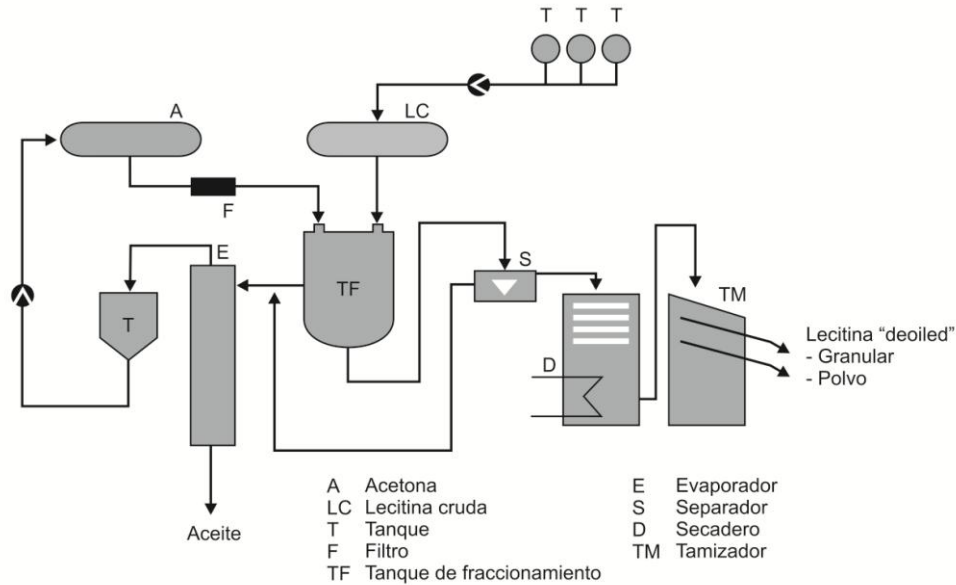


Figura 1.12. Proceso de fraccionamiento para separación de lípidos polares y neutros con acetona (Schneider, 1989)

Las lecitinas conteniendo aceite se bombean al tanque de fraccionamiento con la cantidad adecuada de acetona y se les aplica una agitación vigorosa. Esta mezcla puede separarse en una fase insoluble compuesta principalmente por lípidos polares, los cuales que precipitan como un sedimento y una solución de acetona conteniendo triglicéridos. La separación puede realizarse a partir de un proceso de centrifugación o por filtración. Para asegurar una extracción eficiente este proceso se repite varias veces.

En la etapa de secado son utilizados ampliamente secadores de lecho fluidizado. La efectividad que brinde el secador presenta una gran relevancia sobre la calidad de la lecitina obtenida, ya que la presencia de restos de acetona ocasionarían la formación de “off-flavors”, particularmente óxido de mesitilo (van Nieuwenhuyzen y Tomás, 2008b). Tipos sofisticados de secadores de cintas y de lecho fluidizado han mostrado tener buenos resultados. La aplicación de N_2 es generalmente utilizada para prevenir la oxidación. La adición de 0,1 – 0,2% de tocoferoles durante la etapa de disolución aumenta significativamente la vida útil. El desengrasado produce lecitinas con solo 2-5% de aceite residual y son comercializadas con un mínimo de 95% de materia insoluble en acetona. El bajo contenido de aceite es necesario para mejorar las propiedades de fluidez de la lecitina en polvo.

Fraccionamiento con etanol

Las bases del fraccionamiento aplicando solventes se remontan al año 1884. Los primeros datos publicados sobre este tipo de metodología fueron expuestos en una patente alemana desarrollada por Thudichum (Schneider, 1989). La producción de fracciones con características diferenciadas a nivel composicional -con respecto al material de partida- se realiza principalmente mediante el uso de etanol o mezclas de etanol-agua. El proceso de fraccionamiento se fundamenta en la solubilidad diferencial de los fosfolípidos individuales cuando son tratados con diferentes solventes.

La fosfatidilcolina se disuelve con mayor facilidad en etanol o soluciones etanólicas en comparación a los otros fosfolípidos mayoritarios. Esta característica permite fraccionar las lecitinas nativas en fracciones solubles (enriquecidas en PC) e insolubles (enriquecidas en PI) en etanol (Wu y Wang, 2003, 2004; Cabezas y col., 2009a, 2009b). Ambas fracciones son de gran interés en la industria alimentaria debido a sus propiedades tecnológicas, la fracción soluble mejora la capacidad de emulsificación en emulsiones aceite en agua (O/W), mientras que la fracción insoluble se utiliza en emulsión de agua en aceite (W/O).

El proceso de fraccionamiento con alcohol se puede utilizar para modificar la composición de lecitinas nativas y modificadas. El mismo, puede ir acompañado de un proceso cromatográfico para obtener una mayor pureza en determinados fosfolípidos. Las fracciones de fosfatidilcolina de alta pureza (98%) son producidas casi exclusivamente para su aplicación en la industria farmacéutica, su alto costo de obtención hace que su uso como emulsificante a gran escala sea prohibitivo para la industria alimentaria. No obstante, estas fracciones son utilizadas para la formación de liposomas en el encapsulamiento de componentes de alto valor en los alimentos como antioxidantes o componentes del flavor (van Nieuwenhuyzen y Tomás, 2008a).

El análisis de las diferentes condiciones operativas permite obtener las condiciones óptimas relacionadas, por ejemplo para obtener rendimientos específicos de extracción y selectividad en la relación PC/PE. Las fracciones solubles en etanol contienen altas proporciones de PC/PE mientras que para las fracciones insolubles en etanol dicha relación es baja.

1.4.5. Propiedades funcionales de las lecitinas

Los fosfolípidos presentan una estructura molecular anfifílica compuesta por una región lipofílica constituida por los dos ácidos grasos y una región hidrofílica formada por un ácido fosfórico esterificado con las sustituciones sobre el mismo. Debido a este carácter anfifílico, estos compuestos presentan una tendencia a organizarse en estructuras ordenadas como la bicapa lipídica o las micelas, tratando de alinearse en interfases hidrofílicas/ lipofílicas, con las cadenas de ácidos grasos orientadas hacia la fase lipofílica y los grupos polares de la cabeza orientados a la fase acuosa. Esta característica permite su aplicación como ingredientes multifuncionales en alimentos, cosméticos, productos farmacéuticos y además, le otorga la capacidad de encapsular diversas sustancias dentro de estructuras más complejas denominadas liposomas (van Nieuwenhuyzen, 1981; Wendel, 2000). Es común su utilización como agentes emulsificantes, estabilizantes, controladores de cristalización, modificadores de viscosidad, antioxidantes o bien de reducción o sustitución de materia grasa (Prosise, 1985). De esta manera, pueden incidir en la apariencia, sabor, consistencia y textura de diversos alimentos. La adición de estos compuestos se encuentra generalmente en concentraciones comprendidas en un rango de 0,2 a 1,0% (Hernández y Quezada, 2008).

Las lecitinas/fosfolípidos se "dispersan" en el agua con la formación de un número de mesofases altamente ordenadas de cristal líquido. La formación y la estructura de estas fases están relacionadas con la concentración, la temperatura y también son inducidas por los cambios de pH (Bueschelberger, 2004).

Los fosfolípidos en soluciones acuosas tienden a maximizar la hidratación de los grupos polares y a minimizar el contacto con el agua de las cadenas hidrocarbonadas. Esta capacidad espontánea del sistema para evolucionar desde un estado desordenado a estructuras definidas y ordenadas, responde a la necesidad de disminuir la función G (energía libre de Gibbs) para el sistema planteado y resulta de gran importancia durante el proceso de degomado y en la formulación de emulsiones (Larsson, 1994).

En la **Figura 1.13** pueden observarse las distintas formas y distribución espacial de sustancias anfipáticas como los fosfolípidos cuando se encuentran en un medio líquido. El tamaño del grupo polar influye en la distribución y empaquetamiento de las moléculas (Penci, 2009).

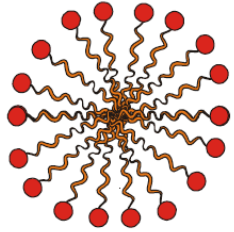
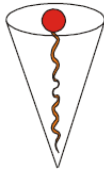
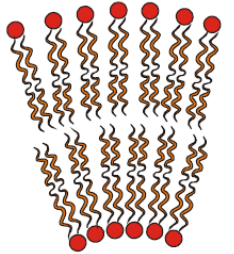
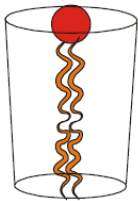
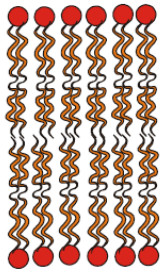
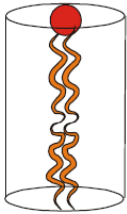
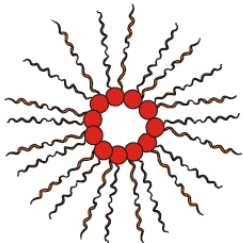
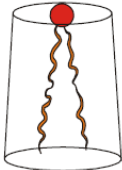
Organización	Forma	Estructura y Fases
	 Cono	Moléculas anfipáticas de cadena simple con un grupo polar grande. Fase: Micelas Hexagonal H _I
	 Cono Truncado	Moléculas anfipáticas de cadena simple con un grupo polar pequeño o de doble cadena con un grupo polar grande. Fase: Laminar Flexible
	 Cilindro	Moléculas anfipáticas de doble cadena con un grupo polar pequeño. Fase: Laminar Cúbica
	 Cono Truncado Invertido	Moléculas anfipáticas de doble cadena con un grupo polar pequeño, o anfipáticas no iónicas, con cadenas poliinsaturadas. Fase: Micelas Inversas Hexagonal H _{II}

Figura 1.13. Estructura y comportamiento de moléculas anfipáticas (Penci, 2009)

Tal como se ha descrito previamente, la estructura de los fosfolípidos determinará el tipo de agregado que formarán en la interfase. Por lo tanto, la modificación de la molécula, ya sea en sus grupos polares o en la zona no polar, podría provocar un cambio en la organización de los fosfolípidos. El PI, al igual que la PC, forma estructuras lamelares muy ordenadas (**Figura 1.13**, cono truncado y/o cilindro), favorecidas por la escasa repulsión de sus grupos polares. Particularmente, la PC forma estructuras muy útiles en la fabricación de liposomas (Carlsson, 2008). La PE, PS y ocasionalmente PA (dependiendo del pH del medio) son fosfolípidos

con una alta repulsión en sus grupos polares, forman estructuras H_{II} (Hexagonal invertida) (**Figura 1.13**, como truncado invertido) y presentan sensibilidad a los cambios de pH y a la presencia de metales mono y divalentes (Penci, 2009).

Los fosfolípidos son compuestos zwitteriónicos que tienen la capacidad de ser ionizados por lo tanto, el nivel de pH puede incidir en su comportamiento a nivel interfacial (McClements, 1999).

1.5. EMULSIONES

1.5.1. Características generales

Una emulsión consiste en dos líquidos inmiscibles (agua y aceite), uno de los cuales se encuentra disperso en forma de pequeñas gotas (fase dispersa o interna) en el otro (fase continua o externa). En la mayoría de los alimentos, los diámetros de las gotas suelen ser de 0,1 a 100 μm (Dickinson y Stainsby, 1982; Dickinson, 1992; Walstra, 1996). Las emulsiones pueden ser clasificadas de acuerdo con la distribución de las fases oleosa y acuosa. Un sistema en el que hay gotas de aceite dispersas en una fase acuosa se denomina emulsión aceite en agua o emulsión O/W, como por ejemplo mayonesas, leche, cremas, salsas (**Figura 1.14.a**). Un sistema que consiste en gotas de agua dispersas en una fase oleosa se conoce como emulsión agua en aceite o emulsión W/O, como por ejemplo, la margarina o la manteca (**Figura 1.14.b**). Además, existen emulsiones múltiples, llamadas así por contener en la fase dispersa una emulsión (O/W/O o W/O/W).

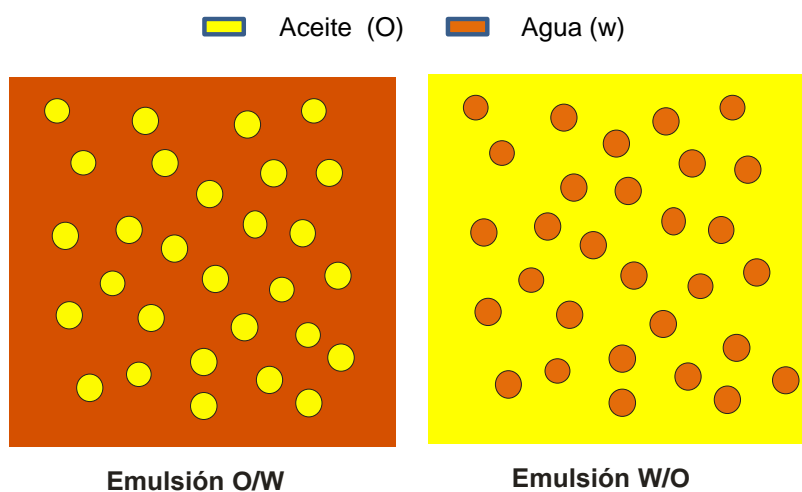


Figura 1.14. Representación esquemática de diferentes tipos de emulsiones: emulsión aceite en agua (O/W) y emulsión agua en aceite (W/O)

La concentración de las gotas en una emulsión se describe usualmente en términos de *fracción en volumen de la fase dispersa* (ϕ_m). El proceso por el cual dos líquidos inmiscibles pasan a formar una emulsión se denomina homogeneización, mientras que el dispositivo diseñado para llevar a cabo este proceso recibe el nombre de homogeneizador, los cuales someten a los líquidos a una intensa agitación mecánica. Así, es posible formar una emulsión mediante la homogeneización de aceite y agua, aunque las dos fases se separarán rápidamente originando un sistema con dos capas: una superior, de aceite de menor densidad y otra inferior, de agua de mayor densidad.

Este fenómeno se debe a que las gotas tienden a la agregación cuando chocan entre sí, lo que conlleva una completa separación de fases. La fuerza impulsora de este proceso es el hecho que el contacto entre las moléculas de aceite y el agua es energéticamente desfavorable (Israelachvili, 1992), por lo que las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables. Sin embargo, es posible formar emulsiones cinéticamente estables (metaestables) durante un periodo de tiempo razonable mediante la incorporación de sustancias conocidas como agentes emulsificantes previo a la homogeneización. Los agentes emulsificantes son moléculas superficialmente activas ya que se adsorben en la superficie de las gotas originadas durante la homogeneización, formando una membrana protectora que previene la agregación de las mismas. La mayoría de los agentes emulsificantes son moléculas anfifílicas es decir, tienen regiones polares y no polares en la misma molécula. Los agentes emulsificantes más comunes en la industria alimentaria son proteínas anfifílicas, agentes tensioactivos de bajo peso molecular y fosfolípidos, entre otros.

La formación de gotas en una emulsión es un proceso que requiere energía, la que es suministrada por el homogeneizador. Durante la formación de las gotas a partir de la interfase entre dos líquidos el área interfacial (**A**) aumenta considerablemente, de manera que la energía libre superficial del sistema se incrementa en una cantidad $\gamma \Delta A$, donde γ es la tensión interfacial. Sin embargo la formación de gotas no es el único proceso que tiene lugar durante la preparación de una emulsión. Se pueden distinguir tres procesos críticos: formación y ruptura de las gotas de la fase dispersa, adsorción del agente emulsificante en la interfase y coalescencia de las gotas (McClements, 1999).

1.5.2. Principios físicos de la emulsificación

El tamaño de las gotas producidas durante la emulsificación depende de un balance entre dos procesos físicos opuestos: ruptura y coalescencia de gotas. Durante el proceso de homogeneización, la interfase entre las dos fases líquidas inmiscibles se deforma en tal extensión que comienzan a producirse gotas -en su mayoría- de tamaño muy grande. Estas gotas deben deformarse y romperse para formar gotas de menor tamaño, por fuerzas de ruptura. Las gotas de un líquido en otro que es inmiscible, tienden a adoptar una forma esférica para minimizar la energía libre interfacial (Palazolo, 2006).

La fuerza interfacial responsable de la forma esférica está dada por la ecuación de Laplace (**Ec. 1.8**):

$$\Delta P_L = \frac{4 \cdot \gamma}{D} \quad \text{Ec. 1.8}$$

donde ΔP_L es la diferencia entre el interior y el exterior de la gota, γ es la tensión interfacial y D es el diámetro de la gota. Las fuerzas interfaciales ejercen una presión hacia el interior, siendo mayor cuanto menor es el diámetro de las gotas y mayor la tensión interfacial.

A fin de dividir una gota durante la emulsificación, es necesario aplicar una fuerza externa que sea significativamente superior a la fuerza interfacial (Walstra, 1996) y que la misma se aplique durante el tiempo necesario para deformar y producir la ruptura (Karbsteins y Schubert, 1995). Las fuerzas de ruptura que actúan sobre una gota durante la emulsificación dependen de las condiciones de flujo durante el proceso y del tipo de homogeneizador usado (Walstra, 1993).

La susceptibilidad de las gotas de la emulsión a la ruptura se caracteriza por el número de Weber (We), el cual corresponde al cociente entre las fuerzas de ruptura y las fuerzas interfaciales (Walstra, 1983). Las gotas se rompen cuando el número de Weber excede un valor crítico (~ 1), el cual depende de las características físicas de ambas fases.

1.5.3. Variables que influyen en la emulsificación

A fin de analizar el efecto de las variables sobre la emulsificación, puede realizarse un control sobre una serie de parámetros, que determinan las propiedades

de las emulsiones. Entre ellos se consideran el tamaño y la distribución de tamaños de gota de la emulsión resultante (Halling, 1981).

Las principales variables relacionadas con el proceso de emulsificación son:

I) Tipo y geometría del homogeneizador. Existen numerosos tipos de homogeneizadores, cada uno más adecuado para una serie de aplicaciones y un rango de sistemas determinados, en función, especialmente, de la viscosidad de ambas fases. El tipo de homogeneizador empleado determina principalmente el tamaño y la distribución de tamaños de gota de las emulsiones (McClements, 1999). Por otra parte, la geometría de las turbinas o agitadores afecta a la eficiencia en la ruptura de las gotas de aceite durante la emulsificación (Sánchez y col., 1998).

II) Concentración y tipo de agente emulsificante. La presencia de agentes emulsificantes en el medio durante el proceso de emulsificación favorece la ruptura de las gotas y conduce generalmente a una disminución del tamaño de gota de las emulsiones -desciende la tensión interfacial- y previene la recoalescencia de las gotas. Estos fenómenos están determinados por las características y el tipo de agente emulsificante empleado. La efectividad de un agente emulsificante en reducir el tamaño de gota está determinada fundamentalmente por dos propiedades: su velocidad de adsorción en la interfase (Schubert y Armbruster, 1992) y la resistencia a la coalescencia de la capa interfacial que forma, la cual depende de sus propiedades estructurales y físicoquímicas (Walstra, 1983; McClements, 1999). Por otra parte, el proceso de adsorción en la interfase consta de dos etapas, difusión en el medio continuo y adsorción. Cada una de estas etapas está gobernada por una cinética distinta (Dagorn-Scaviner y col., 1987).

III) Propiedades y composición de ambas fases. La composición y las propiedades físicoquímicas de las fases acuosa y oleosa influyen en el tamaño de gota obtenido durante la emulsificación (Phipps, 1985). Modificaciones en el tipo de aceite o de la fase acuosa alteran la relación de viscosidades entre las fases dispersa y continua, de la que depende el tamaño mínimo de gota que puede alcanzarse en condiciones estacionarias (Braginsky y Belevitzkaya, 1996). Por otra parte, la tensión interfacial depende tanto del tipo de aceite -ya que éste puede contener diferentes tipos de compuestos con actividad superficial o diferente estructura molecular- como de la composición de la fase acuosa, la cual puede

contener una amplia variedad de componentes tales como minerales, ácidos, bases, azúcares, sales, burbujas de gas (Walstra, 1983).

IV) Fracción en volumen de fase dispersa. Una gran fracción de fase dispersa necesita más energía para reducir el tamaño de gota. No obstante, aunque este parámetro ejerce una cierta influencia en el proceso de emulsificación y en las propiedades de la emulsión formada, la relación entre la concentración de emulsificante y la fracción en volumen de fase dispersa es la que influye más significativamente sobre la misma (Halling, 1981).

V) Energía aplicada. En general, un aumento de la energía aplicada al sistema produce un descenso del tamaño de gota, asociado a un aumento de la viscosidad de la emulsión y de sus propiedades viscoelásticas, lo que se traduce en una mayor estabilidad (Halling, 1981; Franco y col., 1995). Sin embargo, existen ocasiones en que un incremento de la energía aplicada sobre un valor crítico puede producir el efecto contrario, debido a un excesivo calentamiento o exposición del sistema a elevadas presiones. Este hecho es particularmente relevante en emulsiones estabilizadas por proteínas y agentes tensioactivos de bajo peso molecular, los que tienden a formar una estructura tipo gel en el medio continuo, donde una agitación excesiva puede conducir a una destrucción de la estructura (Gallegos y col., 1996). Por otra parte, al incrementar excesivamente la energía de emulsificación, se favorece en mayor grado el proceso de coalescencia que tiene lugar durante la emulsificación, simultáneamente a la ruptura de las gotas (Franco y col., 1995).

VI) Temperatura de emulsificación. La temperatura influye en el proceso de emulsificación de diferentes formas. En principio, el uso de elevadas temperaturas genera tamaños de partículas menores al aumentar la solubilidad del emulsificante y provocar una reducción en la tensión interfacial, aunque también puede producir el efecto contrario, al favorecer la recoalescencia de gotas ya formadas (Sánchez y col., 2001), beneficiada por una disminución de la viscosidad de ambas fases (Gallegos y col., 1996) y un aumento de la movilidad de las gotas.

VII) Tiempo de emulsificación. Un aumento de la duración de la emulsificación en operaciones discontinuas o del número de recirculaciones, en operaciones continuas, provoca un descenso del tamaño de gota, así como de la polidispersión de la distribución (Franco y col., 1995), pero la velocidad con que esto

ocurre descendiendo rápidamente. Este hecho se debe a que bajo determinadas condiciones de emulsificación, existe un cierto tamaño de gota que no puede reducirse, por lo que prolongar el proceso de emulsificación durante más tiempo, además de costoso, puede no ser eficaz, ya que la película interfacial puede deteriorarse, provocando un descenso en la estabilidad de la emulsión recién formada. Además, un tiempo de emulsificación excesivo puede conducir a un calentamiento de la emulsión.

VIII) Protocolo de preparación. La forma de adición de las fases y el agente emulsificante influyen en el proceso de emulsificación. Por lo tanto, la optimización del proceso de emulsificación debería realizarse en tres etapas. En primer lugar la selección del equipo, el cual determina el mecanismo de ruptura de las gotas. En segundo lugar, la elección del agente emulsificante adecuado y su concentración óptima y finalmente, optimizar las condiciones de proceso, tales como tiempo de residencia, velocidad de agitación o temperatura (Bengoechea Ruiz, 2006).

1.5.4. Tipos de homogeneizadores

Existen diferentes tipos de homogeneizadores para la producción de emulsiones alimentarias. La elección de un homogeneizador en particular depende del volumen de emulsión que se desea preparar, la naturaleza de los materiales de partida, el tamaño de gota deseado y el costo (McClements, 1999).

A continuación, se muestran los homogeneizadores más empleados en la industria alimentaria

I) Homogeneizadores de baja y alta velocidad. Los homogeneizadores de baja (≈ 3000 rpm) y de alta velocidad (hasta 25.000 rpm) son adecuados para producir emulsiones a partir de las fases líquidas separadas. El mecanismo de ruptura es un efecto combinado de fuerzas viscosas bajo un régimen de flujo laminar y turbulento. Este tipo de homogeneizadores al tener baja densidad de energía (ϵ) producen emulsiones de tamaño de gota relativamente grande. Los homogeneizadores que tienen diseño rotor/estator de alta velocidad (Ultraturrax) son más efectivos que los de diseño a cuchilla. Debido al elevado número de revoluciones del rotor, las fases líquidas a procesar se aspiran axialmente y se

presionan a través de las estrechas ranuras del conjunto rotor/estator, produciendo el esfuerzo de corte responsable de la ruptura de las gotas (Palazolo, 2006).

II) Molinos coloidales. Los molinos coloidales se utilizan ampliamente en la industria alimentaria para homogeneizar líquidos de viscosidad media a alta. Generalmente se utilizan para reducir el tamaño de gota de una emulsión ya formada, mediante la agitación intensa a elevadas velocidades. La emulsión es alimentada al molino y fluye a través de un estrecho hueco a través de dos discos: un disco rotatorio (rotor) y otro estático (estator). La rápida rotación del rotor genera un esfuerzo de cizalla que provoca la ruptura de las gotas en otras de menor tamaño (Pandolfe, 1995).

III) Homogeneizadores a válvula de alta presión. Estos homogeneizadores disponen de una bomba que suministra la presión requerida y una válvula especial provista de un resorte que constituye un orificio por el que se hace pasar la pre-emulsión a elevada presión (10-50 MPa). Al atravesar la válvula, la emulsión inicial experimenta una combinación de intensa cizalla y condiciones de flujo cavitacional y turbulento, lo que provoca la ruptura de las gotas de gran tamaño en otras menores (Phipps, 1985). Para ello, se ha diseñado una gran variedad de válvulas para diferentes aplicaciones.

IV) Homogeneizadores ultrasónicos. Este tipo de homogeneizadores emplea ondas ultrasónicas de elevada energía que genera intensos gradientes de cizalla y presión dentro del material, lo que produce deformación y ruptura de las gotas, debido principalmente a efectos cavitacionales. Existen diferentes formas de generar ondas ultrasónicas, sistemas mecánicos, osciladores magnetostrictivos y osciladores de cristal piezoeléctrico. Generalmente, sólo se utilizan los sistemas mecánicos para generar emulsiones, los cuales se emplean frecuentemente en estudios de laboratorio aunque los resultados son poco reproducibles a escala superior (Walstra, 1983).

V) Inyectores. En estos dispositivos, la fase interna se inyecta directamente en la fase continua a través de un orificio cilíndrico donde se rompen las gotas. Existen dos variantes, inyección a presión o sin ella y suelen emplearse a escala laboratorio. En este caso, el tamaño y la distribución de tamaños de gota dependen de la velocidad de inyección, del tamaño y el diseño de la boquilla

dispersante, de la viscosidad de ambas fases y de la tensión superficial (Bengoechea Ruiz, 2006).

1.5.5. Estabilidad de las emulsiones

El término estabilidad en una emulsión se refiere a la capacidad de la misma para resistir los cambios en sus propiedades a través del tiempo; cuando más estable es una emulsión, más lento es el proceso de cambio en sus propiedades (McClements, 1999). Una emulsión puede desestabilizarse a través de diferentes procesos físicoquímicos. La desestabilización física consiste en una alteración en la distribución espacial o en la organización estructural de las moléculas, como el cremado, la floculación, la coalescencia, la inversión de fases o la maduración de Ostwald; mientras que la oxidación o la hidrólisis son ejemplos de desestabilización química. Para que una emulsión sea cinéticamente estable en función del tiempo, debe tener una energía de activación significativamente mayor que la energía térmica del sistema.

Tal como se comentara anteriormente, si el agua y el aceite puros fueran agitados conjuntamente, se formaría temporalmente una emulsión, evolucionando rápidamente hacia dos fases separadas. Esto se debe a que la energía de activación entre el estado emulsionado y el no emulsionado es muy pequeña. Por ello, para crear una emulsión cinéticamente estable durante un periodo de tiempo razonablemente largo, es necesaria la presencia de un agente emulsificante que origine una energía de activación suficientemente grande para prevenir la desestabilización (Bengoechea Ruiz, 2006).

1.5.5.1. Fuerzas que actúan entre las partículas

I) **Movimiento browniano.** Este término hace referencia a un movimiento traslacional y rotacional caótico, provocado por la agitación térmica, inherente a las partículas. Conduce a una distribución al azar de las partículas y puede originar choques entre ellas, debido a los sucesivos acercamientos y alejamientos que desencadena.

II) **Fuerzas gravitacionales.** Debido a la diferencia de densidad entre ambas fases y mediante la acción de fuerzas gravitacionales, se produce un movimiento ascendente de la fase de menor densidad, generándose un gradiente de concentración de esta fase a lo largo de la muestra, lo que provoca finalmente la

ruptura de la emulsión mediante un proceso de desestabilización que se conoce como *cremado*.

III) Fuerzas hidrodinámicas. Para que dos gotas vecinas se acerquen y se unan, deben superar la resistencia del fluido que las rodea. Dicho fluido debe excluirse del hueco entre las gotas, venciendo la fricción con la superficie de éstas, lo que hace que el coeficiente de difusión efectivo de las gotas en el medio continuo sea menor (Davis y col., 1989).

IV) Interacciones de van der Waals. Las interacciones intermoleculares de van der Waals tienen su origen en la atracción entre moléculas que han sido polarizadas electrónicamente o por orientación. Además de actuar entre moléculas individuales, éstas también puedan actuar entre cuerpos macroscópicos que contengan un gran número de moléculas, tales como las gotas de una emulsión (Hiemenz, 1986).

V) Interacciones hidrofóbicas. Las interacciones hidrofóbicas se manifiestan cuando la superficie de las gotas tiene un cierto grado de carácter no polar, ya sea porque no estén cubiertas totalmente por emulsificantes o porque el emulsificante tenga algunas zonas no polares expuestas en la fase acuosa. Consecuentemente, debido a que la interacción entre sustancias no polares y el agua es termodinámicamente desfavorable, el sistema intenta minimizar esta área de contacto mediante la agregación de las gotas (Israelachvili y Wennerström, 1996).

VI) Fuerzas electrostáticas interparticulares. Las gotas de muchas emulsiones tienen superficies cargadas eléctricamente, debido a la adsorción de agentes emulsificantes iónicos o que son susceptibles de ser ionizados (proteínas, polisacáridos, fosfolípidos). Las partículas también pueden adquirir carga eléctrica por la adsorción en la interfase de pequeños iones o por fricción (Alexander y Johnson, 1949). Normalmente, en una emulsión todas las gotas de la fase dispersa están estabilizadas por el mismo tipo de emulsificante, por lo que tienen la misma carga eléctrica. Consecuentemente, las interacciones electrostáticas entre gotas son repulsivas, por lo que juegan un papel importante en la prevención del acercamiento de gotas y la desestabilización de las emulsiones.

Helmholtz (1879) introdujo el concepto de doble capa eléctrica, suponiendo que la carga en las partículas de un coloide se debía a una distribución desigual de

los iones en la interfase partícula-agua. Si la partícula posee carga, los iones de carga opuesta existentes en un medio polar se alinean paralelamente formando una doble capa eléctrica.

VII) Interacciones estéricas. Las emulsiones pueden estabilizarse mediante moléculas de agentes emulsificantes no cargadas superficialmente (Dickinson y col., 1992). Este es el caso de emulsiones que contienen moléculas de naturaleza polimérica adsorbidas en la interfase, en las que las interacciones estéricas modifican la cinética de floculación (Heller y Pugh, 1954).

1.5.5.2. Mecanismos de desestabilización de emulsiones

Las emulsiones, si bien son termodinámicamente inestables, son sistemas que pueden adquirir una cierta estabilidad cinética cuando se controlan los procesos de desestabilización física, los cuales pueden ser: separación gravitacional (cremado), floculación, coalescencia, coalescencia parcial, desproporción e inversión de fases, los que se describen a continuación (**Figura 1.15**). Los mecanismos de desestabilización no son independientes (Wagner, 2000).

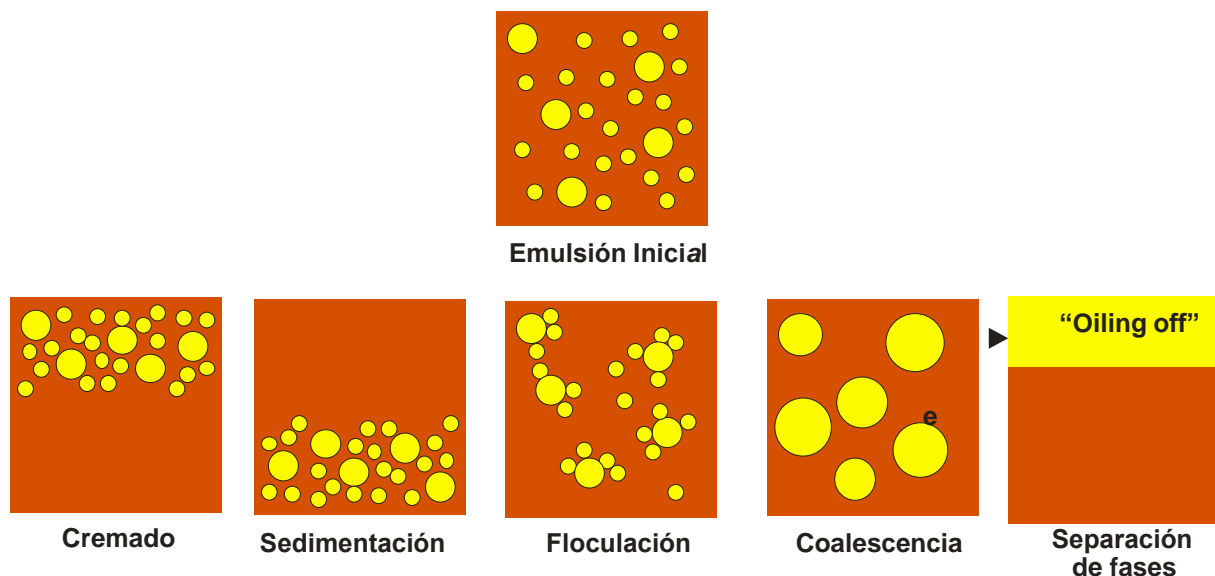


Figura 1.15. Mecanismos de desestabilización más importantes de una emulsión aceite en agua (O/W).

I) Separación gravitacional (cremado/sedimentación). En general, las gotas (fase dispersa) de una emulsión tienen diferente densidad que el líquido que actúa como fase continua, por lo que existe una fuerza gravitacional neta sobre las mismas. Si las gotas tienen una menor densidad que la fase continua, tendrán tendencia a ascender. Este proceso, conocido como cremado, ocurre en las

emulsiones O/W (**Figura 1.15**). En contraste, si las gotas tienen una mayor densidad que la fase continua tienden a descender, conociéndose el proceso como sedimentación. Éste es el caso de las emulsiones W/O (Walstra, 1996).

De acuerdo con la ley de Stokes, la velocidad de cremado en una emulsión es directamente proporcional al tamaño de la gota de la fase dispersa y a la diferencia de densidades de las fases dispersa y continua e inversamente proporcional a la viscosidad de la fase continua (McClements, 1999).

II) Floculación. Es el proceso en el cual dos o más gotas se unen para formar un agregado (flóculo) en el cual cada una de ellas retiene su identidad, sin fusionarse, llevando a una disminución en el número de partículas presentes en la emulsión (**Figura 1.15**). Dicho proceso puede ser reversible o irreversible de acuerdo a las fuerzas que mantienen unidas a las gotas.

Existen varios mecanismos que pueden provocar el encuentro de dos partículas: el movimiento browniano, la separación gravitacional y esfuerzos de cizalla que se producen durante el flujo de la emulsión en las etapas de procesamiento o su transporte (Melik y Fogler, 1988; McClements, 1999)

Este proceso está controlado por un equilibrio global entre las fuerzas de atracción (electrostáticas, de van der Waals, hidrofóbicas y por depleción) y de repulsión (electrostáticas, estéricas y de hidratación). El grado de floculación alcanzado depende de dos factores, la frecuencia de las colisiones (número de encuentros entre gotas por unidad de tiempo y por unidad de volumen de emulsión) y la eficiencia de las colisiones (fracción efectiva de colisiones que llevan a la agregación) (McClements, 1999).

En una emulsión diluida, la floculación conduce generalmente a un aumento del cremado, ya que los flóculos grandes se mueven más rápidamente bajo la influencia de la gravedad que las gotas dispersas individuales. En una emulsión concentrada se puede producir una floculación extensiva de gotas, formando una red particular tipo gel débil, que puede eliminar el cremado por completo (Cao y col., 1990). Sin embargo, en este caso es posible que se produzca el proceso de sinéresis, que en algunos productos alimenticios es incluso más negativo que el cremado normal por gravedad (Dickinson y col., 1989).

III) Coalescencia. Es un proceso irreversible por el cual dos o más gotas

se unen entre sí para formar una única gota de mayor tamaño lo que conduce a la reducción del área interfacial (**Figura 1.15**). Es el principal mecanismo por el que una emulsión se mueve hacia su estado termodinámico más estable, porque lleva consigo una disminución del área de contacto entre las fases acuosa y oleosa. La ocurrencia de este proceso de desestabilización depende de la frecuencia, la energía y eficiencia de colisión entre las gotas así como de la resistencia y la viscoelasticidad de la película que rodea a las mismas. La coalescencia produce una desestabilización de la emulsión más rápida al aumentar el tamaño de partículas. En emulsiones O/W, la coalescencia conduce a la formación de una capa oleosa en la parte superior de la emulsión (“oiling off”) (**Figura 1.15**), mientras que en emulsiones W/O conduce a la acumulación de agua en la parte inferior del sistema (McClements, 1999).

Existen dos etapas relacionadas con la coalescencia de un par de gotas, el drenado de la fase continua de la delgada película de líquido que se encuentra entre las gotas hasta que ésta alcanza un espesor crítico, seguido de una ruptura de la capa interfacial debido a alguna fluctuación o perturbación local (Dickinson y col., 1989). Una vez que se ha formado un hueco en la interfase, el líquido del interior de la gota fluye rápidamente a través del hueco y las gotas se unen formando una sola gota de mayor tamaño. La velocidad de coalescencia depende por tanto, de la probabilidad que se produzcan dichos huecos. Esto puede ocurrir de diferentes formas, dependiendo del tipo de agente emulsificante utilizado y de las condiciones del medio. Por ejemplo, se pueden distorsionar espontáneamente monocapas de emulsificante debido a fluctuaciones térmicas o bien se puede producir la ruptura química del emulsificante o su desplazamiento de la superficie interfacial, por otro agente emulsificante más activo a nivel superficial, pero menos resistente a la ruptura. El mecanismo que cobra más relevancia -en cada caso- depende de las condiciones de pH, fuerza iónica, interacciones entre los componentes, temperatura, agitación mecánica (McClements, 1999).

IV) Maduración de Ostwald. Es el proceso por el que gotas de gran tamaño crecen a expensas de otras más pequeñas, debido al transporte de masa de la fase dispersa desde una gota a otra a través de la fase continua (Kabalnov y Shchukin, 1992; Taylor, 1995). En contraste con lo que sucede con otros procesos de desestabilización, la velocidad a la que se produce la maduración de Ostwald

aumenta al disminuir el tamaño de gota (Kabalnov y Shchukin, 1992). Sin embargo, hay que considerar que un aumento del tamaño de gota lleva asociado una aceleración de otros procesos de desestabilización, tales como el cremado. Este proceso también se favorece por un elevado grado de polidispersión de tamaños de gota.

V) Inversión de fases. Es el proceso por el que un sistema pasa de ser una emulsión O/W a una W/O o viceversa. Se puede producir por una elevada fracción volumétrica de la fase dispersa, por efecto de trabajo mecánico o de la temperatura (Campbell y col., 1996; McClements, 1999).

VI) Estabilidad química y bioquímica. Una de las formas más comunes de inestabilidad de los alimentos que contienen grasas es la oxidación lipídica (Nawar, 1996). La oxidación de lípidos conlleva la aparición de olores desagradables (“off-flavors”) y productos de reacción potencialmente tóxicos. Se han desarrollado estrategias para retardar la oxidación de los lípidos tales como la incorporación de antioxidantes y la adecuada selección de las condiciones de almacenamiento (Dalglish, 1996).

1.5.6. Balance Hidrofílico-Lipofílico (HLB)

El concepto del Balance Hidrofílico-Lipofílico tiene sus bases en un método semiempírico ampliamente usado en la clasificación de surfactantes (Davis, 1994). El HLB se asocia a un valor numérico que brinda información sobre la afinidad relativa de la molécula del surfactante por las fases acuosa y oleosa. A cada surfactante se le asigna este valor en relación a su estructura química. Una molécula con un alto HLB presenta una mayor concentración de grupos hidrofílicos que lipofílicos y viceversa. El HLB puede calcularse conociendo el tipo y número de los grupos hidrofílicos y lipofílicos presentes en la molécula o estimarse experimentalmente a partir de su “cloud point” (McClements, 1999). La forma semiempírica de medir el HLB se presenta en la **Ecuación 1.9** (Davis, 1994):

$$\text{HLB} = 7 + \Sigma(\text{Número del grupo hidrofílico}) - \Sigma(\text{Número del grupo lipofílico}) \quad \text{Ec. 1.9}$$

Los números de diferentes grupos se presentan en la **Tabla 1.11**.

Tabla 1.11. Números de grupos para el cálculo de HLB (Davis, 1994)

Grupo hidrofílico	Número	Grupo lipofílico	Número
-SO ₄ Na ⁺	38,7	-CH-	0,475
-COOH ⁺	21,2	-CH ₂ -	0,475
Amina terciaria	9,4	-CH ₃ -	0,475
Anillo Sorbitan	6,8		
-COOH	2,1		
-O-	1,3		

Un agente emulsificante con un bajo HLB (3-6) es predominantemente lipofílico, se disuelve preferentemente en la fase oleosa, estabiliza emulsiones W/O y forma micelas reversas en aceite. En cambio un emulsificante con un elevado HLB (8-18) es predominantemente hidrofílico, es decir se disuelve preferentemente en agua formando micelas y estabiliza emulsiones O/W. Las moléculas que posean HLB intermedios (6-8) no poseen una afinidad preferencial hacia ninguna de las dos fases y aquéllas con un HLB inferior a 3 o superior a 18 no presentan actividad emulsificante, ya que se disuelven totalmente en alguna de las fases y no migran hacia la interfase agua-aceite (McClements, 1999).

1.5.7. Distribución de tamaño de partículas

Propiedades de gran importancia en las emulsiones tales como la estabilidad a largo plazo, la apariencia y la textura están íntimamente ligadas al tamaño de las gotas que contienen. Las emulsiones alimentarias son generalmente polidispersas es decir, el tamaño de las gotas varía dentro de un rango definido entre un valor mínimo y uno máximo. Por lo tanto, para el análisis del tamaño de gota de las emulsiones alimentarias es conveniente referirse en términos de una *distribución de tamaño de partículas*. En una emulsión monodispersa este concepto carece de sentido, dado que el tamaño de las gotas esféricas puede caracterizarse de manera completa e inequívoca a través de un parámetro sólo, el radio (R) o el diámetro (D).

La distribución de tamaño de partículas puede representarse como una curva continua, la función de distribución $F(D_i)$. La función de distribución en número $F_n(D_i)$ se genera de manera tal que el área bajo la curva en el rango de dos diámetros D_i y $D_i + dD_i$ es igual al número de partículas en dicho rango, n_i , de manera tal que $n_i = F(D_i) \cdot dD_i$. A partir del mismo razonamiento pueden generarse las correspondientes

funciones de distribución en superficie $F_s(D_i)$ (**Ec. 1.10**) y en volumen $F_v(D_i)$, (**Ec. 1.11**), asumiendo que las emulsiones están formadas por gotas esféricas (Rawle, 2005).

$$F_v(D_i) = (1/6) \cdot \pi \cdot D_i^3 \cdot F_n(D_i) \quad \text{Ec. 1.10}$$

$$F_s(D_i) = \pi \cdot D_i^2 \cdot F_n(D_i) \quad \text{Ec. 1.11}$$

La **Figura 1.16** muestra un ejemplo de distribuciones en número, superficie y volumen para una emulsión O/W.

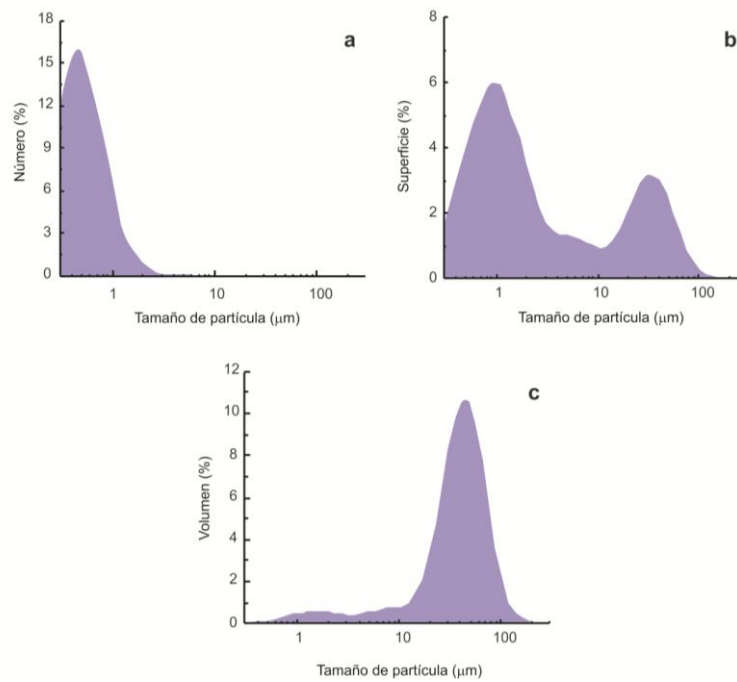


Figura 1.16. Distribuciones de tamaño de partículas para una emulsión aceite en agua (O/W): a) en número, b) en superficie y c) en volumen

A partir de las funciones de distribución pueden calcularse los distintos diámetros promedio:

$$D_{1,0} = \frac{\sum n_i \cdot x D_i}{\sum n_i} = \frac{\sum n_i \cdot x D_i}{N} \quad \text{Ec. 1.12}$$

$$D_{2,0} = \frac{\sum n_i \cdot x D_i^2}{\sum n_i} = \frac{\sum n_i \cdot x D_i^2}{N} \quad \text{Ec. 1.13}$$

$$D_{3,0} = \frac{\sum n_i \cdot x D_i^3}{\sum n_i} = \frac{\sum n_i \cdot x D_i^3}{N} \quad \text{Ec. 1.14}$$

$$D_{3,2} = \frac{\sum n_i x D_i^3}{\sum n_i x D_i^2} \quad \text{Ec. 1.15}$$

$$D_{4,3} = \frac{\sum n_i x D_i^4}{\sum n_i x D_i^3} \quad \text{Ec. 1.16}$$

La determinación de los diámetros promedio $D_{1,0}$ (en número) (**Ec. 1.12**), $D_{2,0}$ (en superficie) (**Ec. 1.13**) y $D_{3,0}$ (en volumen) (**Ec. 1.14**) requieren el conocimiento del número total de gotas. Se puede prescindir de dicho dato mediante la utilización del *diámetro promedio De Sauter* ($D_{[3,2]}$) (**Ec. 1.15**) y del *diámetro promedio de De Brouker* ($D_{[4,3]}$) (**Ec. 1.16**), cuyas fórmulas no contienen el número total de gotas. $D_{[3,2]}$ y $D_{[4,3]}$ se relacionan con las distribuciones en superficie y volumen, respectivamente. Estos diámetros se conocen como “moment diameters” e introducen otro término lineal en el diámetro, de manera que en el numerador el término superficial tiene una dependencia con D^3 y el volumen con D^4 (Walstra, 1983; Rawle, 2005). El diámetro promedio $D_{[3,2]}$ se puede relacionar con el área interfacial específica (AIE, en m^2/mL de emulsión) a partir de la siguiente expresión (Walstra, 1983):

$$\text{AIE} = 6\phi_m / D_{[3,2]} \quad \text{Ec. 1.17}$$

donde ϕ_m es la fracción másica de fase dispersa

Las emulsiones polidispersas también pueden caracterizarse mediante los *percentiles* ($D_{x,y}$) donde $x = n, s$ o v , dependiendo si se trata de la distribución en número, superficie o volumen, siendo un número cualquiera comprendido entre 0 y 1. El percentil 0,5 o del 50% ($D_{x,0,5}$) es el más común y se denomina *mediana de la distribución*. La mediana es el valor de tamaño de partícula que divide a la población de gotas de la emulsión en dos partes iguales, es decir 50% por encima y 50% por debajo. Los percentiles 0,1 (10%) y 0,9 (90%) también se utilizan para dar un parámetro relacionado con la polidispersidad (P) de la emulsión:

$$P = [(D_{x,0,9} - D_{x,0,1}) / D_{x,0,5}] \quad \text{Ec. 1.18}$$

De manera que, la emulsión es más polidispersa cuanto mayor es el valor de P. Los percentiles $D_{x,y}$ pueden calcularse fácilmente a partir de las funciones acumulativas.

La determinación del tamaño de partículas debe hacerse en condiciones de alta dilución ($\phi_m < 0,05$) con agitación, para que las gotas se distribuyan de manera uniforme. Así, un volumen pequeño de la emulsión se coloca en un recipiente con agua y un haz de radiación láser incide sobre una cubeta interna transparente por donde recircula la emulsión diluida. La luz dispersada en distintos ángulos por gotas de diferente tamaño pasa por un complejo sistema óptico e incide posteriormente sobre un arreglo de detectores obteniendo un patrón angular de luz dispersada. El “software” incorporado en el equipo permite traducir este patrón en la correspondiente distribución de tamaño de partículas (McClements, 1999).

1.6. OBJETIVOS

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

Objetivo general

➤ Evaluar la aplicación de subproductos de girasol (aceite, lecitinas modificadas por fraccionamiento, “deoiling”) y de chía (aceite, mucílago) en alimentos

Objetivos específicos

➤ Obtener y caracterizar lecitinas modificadas a partir de lecitina de girasol (nativa) estudiando el efecto del pH del solvente de extracción (mezclas etanol:agua) como variable operativa del proceso de fraccionamiento a escala laboratorio

➤ Evaluar la funcionalidad y la aplicación de las lecitinas modificadas de girasol en la industria alimentaria (fraccionamiento, “deoiling”)

➤ Desarrollar aceites mezcla girasol-chía con una relación de ácidos grasos omega 6 - omega 3 acorde a las recomendaciones de la FAO/OMS

➤ Evaluar la influencia de diferentes parámetros sobre la estabilidad físicoquímica de aceites mezcla girasol-chía (temperatura y tiempo de almacenamiento, adición de antioxidantes)

➤ Evaluar la aplicación potencial de aceites mezcla girasol-chía, fibra soluble de chía (mucílago) y lecitinas modificadas de girasol -enriquecidas en fosfatidilcolina (FPC) y lecitina “deoiled” (LGD) en emulsiones alimentarias funcionales O/W

Capítulo II

***FRACCIONAMIENTO DE LECITINAS DE GIRASOL.
CARACTERIZACIÓN Y PROPIEDADES
EMULSIFICANTES DE FRACCIONES
ENRIQUECIDAS EN FOSFATIDILCOLINA (FPC)***

2.1. INTRODUCCIÓN

El reciente interés de la industria aceitera en el aprovechamiento y comercialización de lecitinas de girasol se encuentra relacionado con el importante volumen de aceite crudo disponible en nuestro país y el hecho de poder satisfacer las preferencias de ciertos consumidores en los mercados internacionales al incorporar un producto no GMO (organismo genéticamente modificado) en diversos alimentos (Franco, 2008; Cabezas y col., 2012).

La aplicación más difundida de las lecitinas dentro de la industria de alimentos está asociada a su rol como agente emulsificante, en la formulación de emulsiones o dispersiones estables. Dicha funcionalidad es utilizada en la obtención de emulsiones W/O y O/W. Ejemplos típicos de emulsiones O/W estabilizadas por lecitinas son la mayonesa y los aderezos y en el caso de emulsiones W/O, la margarina, manteca (Hernández y Quezada, 2008).

Como se mencionó previamente en el **Capítulo I**, los fosfolípidos pueden ser modificados en su estructura o concentración original para mejorar sus propiedades funcionales. Para este propósito, los ácidos grasos o el grupo de cabeza pueden ser modificados mediante agentes físicos, químicos y/o procesos enzimáticos (Cabezas, 2010).

La industria alimentaria dedicada a la obtención de fracciones de lecitina vegetales utiliza principalmente sistemas constituidos por etanol o etanol/agua. Las fracciones enriquecidas en fosfatidilcolina concentran su atención debido a sus beneficios a nivel fisiológico y funcional así como en su utilización como aditivo de uso industrial, principalmente como agente emulsificante O/W (Kullenberg, 1989; Cabezas y col., 2009b).

Cabe señalar que la fosfatidilcolina se disuelve con mayor facilidad en soluciones etanólicas en comparación con los demás fosfolípidos mayoritarios presentes en la lecitina. Esta característica es el principio en que se basa el fraccionamiento de las lecitinas nativas con etanol. A partir de este proceso pueden obtenerse fracciones solubles (enriquecidas en PC) e insolubles (enriquecidas en PI) (Wu y Wang, 2003, 2004; Cabezas y col., 2009a, 2009b). Por otra parte, la distribución de fosfolípidos de cada fracción enriquecida es fuertemente dependiente del pH del disolvente de extracción (Dijkstra y De Kock, 1993).

Los fosfolípidos son zwitteriónicos, es decir, contienen una carga negativa y otra positiva en la misma molécula. A veces se hace referencia a los fosfolípidos como sustancias anfóteras, dado que pueden ser catiónicos, aniónicos o zwitteriónicos dependiendo del pH. La protonación/desprotonación de los grupos de cabeza de los fosfolípidos causados por el cambio de pH en el medio acuoso tiene un gran impacto sobre las propiedades físicas de dichos compuestos. El cambio en la carga eléctrica en función del pH puede influir en su conformación molecular, y por lo tanto, en el parámetro de empaquetamiento molecular y la polaridad. A su vez, esto puede afectar por ejemplo, transiciones de fase, hidratabilidad (“swelling”), interacciones con iones y otros solutos –péptidos, proteínas- y la estabilidad coloidal de las dispersiones acuosas. Un cambio en el pH puede también influir en la estabilidad hidrolítica de los fosfolípidos, siendo más rápida la hidrólisis a niveles altos de pH (Carlsson, 2008).

En lo que se refiere al proceso de fraccionamiento, la selección de las condiciones operativas permite optimizar el mismo. Por ejemplo la obtención de fracciones enriquecidas en un determinado fosfolípido o una mayor selectividad en la relación PC/PE. Diferentes investigaciones sobre el fraccionamiento etanólico de lecitinas nativas de soja y girasol han sido realizadas (Wu y Wang, 2003, 2004; Cabezas y col., 2009a, 2009b).

Cabezas y col. (2009b) estudiaron la influencia de la temperatura, el tiempo de extracción, la relación solvente:lecitina, la concentración de etanol absoluto y sus interacciones sobre el grado de enriquecimiento de PC en las fracciones solubles y de PI en las fracciones insolubles luego del fraccionamiento etanólico de lecitina de girasol. No obstante, es escasa la información existente acerca del efecto del sistema de solventes de extracción y el nivel de pH de su porción acuosa sobre el fraccionamiento de lecitina nativa de girasol.

Los fosfolípidos mayoritarios (PC, PE, PI) han sido determinados habitualmente mediante cromatografía de capa delgada (TLC). La intensidad y el tamaño de las manchas coloreadas en la cromatografía permitían también su utilización como un método de determinación semicuantitativa (AOCS Official Method Ja 7-86) (1998).

Actualmente las metodologías más utilizadas en este sentido son HPLC-UV y HPLC-ELSD (Evaporative Light Scattering Detector), aunque la técnica más sensible es la de ^{31}P NMR (Diehl y Ockels, 1995; van Nieuwenhuyzen y Tomás, 2008a).

La carencia de grupos cromóforos en los analitos a detectar ha sido una restricción para el empleo de detección UV. Diferentes estudios han utilizado la derivatización química para lograr que estos compuestos absorban radiación ultravioleta o sean capaces de emitir fluorescencia (Penci, 2009). Además, es necesario tener en cuenta como desventaja para el empleo del detector UV, la absorbancia considerable que presentan los solventes habitualmente empleados en la disolución de compuestos lipídicos en esa región espectral (Diehl y Ockels, 1995). Este hecho no permitiría obtener una adecuada relación señal/línea de base, lo cual constituye una interferencia en la determinación analítica.

Otro detector utilizado con frecuencia en la resolución de mezclas complejas de lípidos (fosfolípidos y lisofosfolípidos) es el ELSD. El uso de HPLC-ELSD ha brindado una mayor reproducibilidad en comparación con el HPLC-UV en pruebas realizadas entre otros por la ILPS (International Lecithin and Phospholipid Society). El detector de "light scattering" surgió como una herramienta muy eficaz en el análisis cuali-cuantitativo de los fosfolípidos presentes en lecitinas nativas, si bien en lecitinas de composición más compleja, como las tratadas química (acetilada o hidrogenada) o enzimáticamente (hidrolizadas), registra limitaciones de resolución considerables (Diehl, 2001).

El desarrollo del análisis mediante ^{31}P NMR surgió como respuesta a la demanda de una metodología de alta selectividad en la detección de los diferentes fosfolípidos evitando un tratamiento previo de separación que además, fuera efectivo en la cuantificación de los mismos. El fundamento de esta metodología se basa en la interacción de radiofrecuencias (10-600 MHz) con cierto tipo de núcleos atómicos que presentan una elevada homogeneidad de su campo magnético durante los ensayos. La absorción de energía por parte de esos núcleos, al ser sometidos a un campo magnético, cambia la orientación del mismo. Aunque no todos los núcleos son factibles de ser utilizados en el análisis de NMR, los existentes son de gran importancia dentro de la química orgánica (^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P) (Diehl, 2001).

La frecuencia de resonancia del ^{31}P depende sensiblemente del entorno químico de la molécula. La exposición a un campo magnético de 7,05 Tesla produce

una frecuencia de resonancia en el fósforo de 121,44 MHz. Esta frecuencia es subdividida en ppm (partes por millón) para formar una escala donde 1 ppm represente 121,44 MHz, siendo el equipo capaz de analizar este estrecho rango de diferencia. Esta precisión hace posible que no sea necesario un proceso previo de separación debido a que cada fosfolípido presenta una frecuencia de resonancia particular relacionada con su estructura química característica (Diehl, 2001).

Los resultados experimentales obtenidos mediante ^{31}P NMR se presentan en forma análoga a las de un cromatograma (**Figura 2.1**). El análisis cuantitativo es registrado en cantidades molares, por lo que para obtener los porcentajes en peso son necesarios los pesos moleculares de cada especie de fosfolípido.

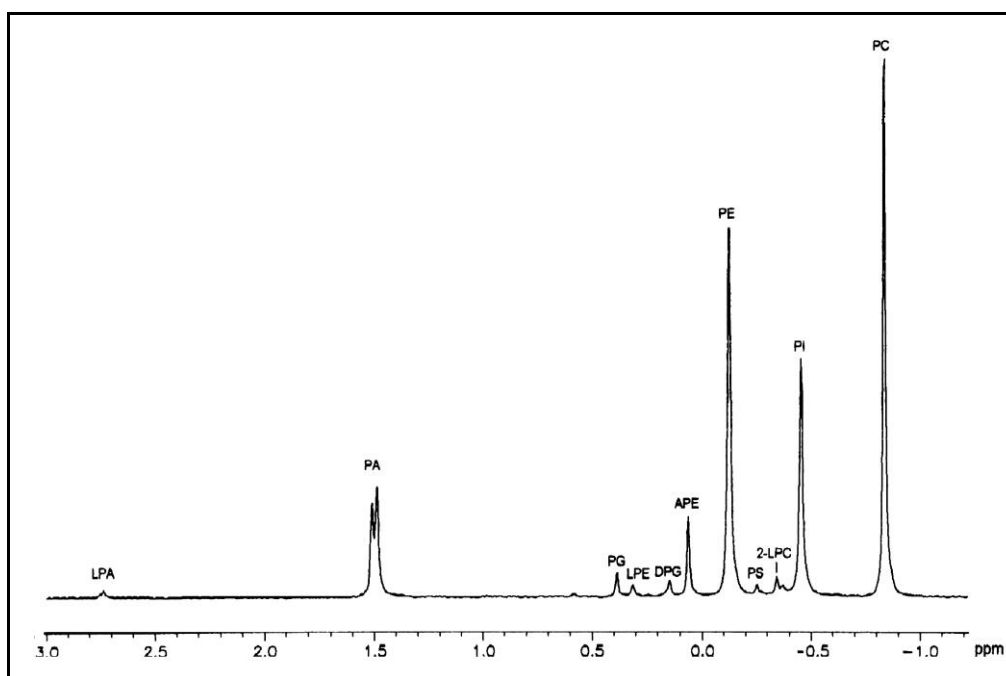


Figura 2.1. Espectro de una mezcla de fosfolípidos mediante ^{31}P NMR

La técnica de ^{31}P NMR a diferencia de las de origen cromatográfico previamente descritas, permite analizar diferentes tipos de lecitinas tanto de origen animal como vegetal (yema de huevo, soja, girasol, nabo) y diferentes sustancias medicinales conteniendo fosfolípidos independientemente de la formulación utilizada (tabletas, geles encapsulados, liposomas líquidos, etc.) (Diehl, 2001). En virtud de ello, la metodología de ^{31}P NMR ha sido utilizada en el análisis de la composición de fosfolípidos de las diferentes fracciones de lecitinas de la presente Tesis.

Con respecto a los procesos de modificación, se aplicaron dos metodologías de fraccionamiento a escala laboratorio: el fraccionamiento con sistemas etanol-

agua a diferentes niveles de pH y el proceso de “deoiling” sobre lecitina nativa de girasol.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Materiales

El proceso de fraccionamiento se llevó a cabo a partir de lecitina nativa de girasol, la cual fue provista por la industria aceitera local Vicentin S.A.I.C.

2.2.2. Proceso de fraccionamiento

2.2.2.1. Fraccionamiento de lecitina de girasol con mezclas etanol absoluto:agua a diferentes niveles de pH

Las variables operativas y niveles seleccionados para realizar el proceso de fraccionamiento se basaron en estudios previos llevados a cabo por Cabezas (2010) sobre este tipo de lecitina, con el objetivo de obtener la mayor concentración de PC en la fracción soluble.

La **Figura 2.2** muestra el proceso de fraccionamiento llevado a cabo utilizando mezclas de etanol absoluto con dos niveles porcentuales de agua 4 y 10% (v/v) como solvente de extracción, ajustando el pH de los mismos mediante ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido de amonio para cubrir el rango de pHs estudiados (3,3 – 10,0). Se utilizaron muestras de 30 g de lecitina nativa de girasol sobre las cuales se adicionó el solvente de extracción en una relación de solvente:lecitina 3:1. Luego las muestras fueron incubadas en un baño de agua a 65°C con agitación durante 90 min. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 1880 g, 10 min, 10°C. Después de la separación de los extractos etanólicos correspondientes y los residuos sólidos bajo cada condición, el etanol fue eliminado por evaporación bajo vacío, obteniéndose -en cada caso- el correspondiente extracto etanólico y un residuo. El aceite residual de ambas muestras se eliminó mediante un proceso de “deoiling”, el cual se describe a continuación.

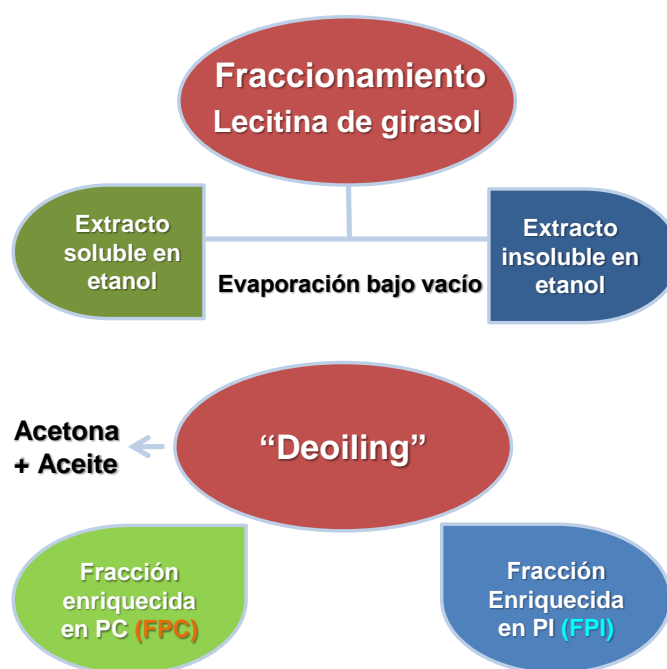


Figura 2.2. Diagrama de los procesos de fraccionamiento y “deoilng” de lecitina de girasol

2.2.2.2. Eliminación del aceite residual (“deoilng”)

La eliminación de aceite se llevó a cabo mediante un tratamiento con acetona. Este procedimiento estuvo de acuerdo al detallado en AOCS Official Method Ja 4-46, procedimientos 1-5 (AOCS, 1998). Mediante la aplicación del mismo, se obtuvieron fracciones enriquecidas en fosfatidilcolina (FPC) a partir de los diferentes extractos etanólicos y fracciones enriquecidas en fosfatidilinositol (FPI) a partir de los correspondientes residuos. Las fracciones resultantes se secaron bajo vacío y almacenaron a 0°C en envases herméticamente cerrados en atmósfera de N₂ para evitar el posible deterioro de tipo oxidativo.

Estas fracciones así obtenidas, fueron utilizadas en la formulación de emulsiones aceite en agua (O/W), evaluándose su capacidad como agentes emulsificante en cada caso.

2.2.2.3. Composición fosfolipídica de las fracciones mediante ³¹P NMR

Las determinaciones de la composición fosfolipídica de las fracciones enriquecidas en fosfatidilcolina (FPC) y fosfatidilinositol (FPI) se llevaron a cabo en colaboración con investigadores de Spectral Service (Colonia, Alemania). Las muestras fueron analizadas en un espectrómetro automático Bruker Avance 300 MHz (UK) utilizando trifenilfosfato como estandar interno (Diehl, 1997, 2001). Las

mismas se prepararon diluyendo 100 mg de las diferentes lecitinas en 1 mL de cloroformo deuterado, 1 mL de metanol y 1 mL Cs-EDTA. Luego de 15 min de centrifugación se separó la fase orgánica, la cual fue utilizada para el respectivo análisis.

2.2.2.4. Rendimiento másico porcentual

Los rendimientos asociados a cada fracción fueron calculados de acuerdo a la **Ecuación 2.1**:

$$\text{Rendimiento fracción enriquecida (\%)} = \frac{\text{Peso fracción obtenida (g)}}{\text{Peso lecitina de girasol inicial (g)}} \cdot 100 \quad \text{Ec. 2.1}$$

Además, debe considerarse:

$$\text{Rendimiento FPC (\%)} + \text{Rendimiento FPI (\%)} + \% \text{ aceite} = 100\% \quad \text{Ec. 2.2}$$

2.2.2.5. Coeficientes de extracción

El fraccionamiento diferencial de cada fosfolípido en presencia de las mezclas etanol:agua empleadas fue monitoreado a partir de los correspondientes coeficientes de extracción $\%E_{PL}$ ($\%E_{PC}$, $\%E_{PE}$ y $\%E_{PI}$) para ambos tipos de fracciones enriquecidas (Cabezas y col., 2009a, 2009b). Estos valores representan la contribución porcentual de cada fosfolípido en esa fracción, de acuerdo a la **Ecuación 2.3**:

$$E_{PL} (\text{fracción PC}) = \frac{m_{PL}(\text{fracción PC})}{m_{PL}(\text{fracción PC}) + m_{PL}(\text{fracción PI})} \cdot 100 \quad \text{Ec. 2.3}$$

donde:

PL: PC, PE o PI

$$m_{PL}(\text{fracción PC}) = \text{Rendimiento fracción PC \%} \times \% \text{ PL (fracción PC)} \quad \text{Ec. 2.4}$$

$$m_{PL}(\text{fracción PI}) = \text{Rendimiento fracción PI \%} \times \% \text{ PL (fracción PI)} \quad \text{Ec. 2.5}$$

Además, debe considerarse:

$$E_{PL} (\text{fracción PC}) + E_{PL} (\text{fracción PI}) = 100\% \quad \text{Ec. 2.6}$$

2.2.3. Evaluación de propiedades emulsificantes

2.2.3.1. Preparación de emulsiones O/W

Emulsiones O/W (Φ_m 0,30) fueron preparadas utilizando las diferentes fracciones enriquecidas en fosfatidilcolina (FPC) como agentes emulsificantes, en un rango de concentraciones entre 0,1- 2,0% p/p con respecto a la fase acuosa. Como fase oleosa se empleó aceite refinado de girasol (Molinos Río de la Plata S.A., Argentina). Dichas emulsiones se obtuvieron mediante homogeneización en un equipo Ultraturrax T25 (Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Alemania), a 10.000 rpm durante 1 min.

2.2.3.2. Estabilidad de las emulsiones (QuickScan)

La estabilidad física de las emulsiones O/W (Φ_m 0,30) fue determinada mediante la evolución del porcentaje de “Back-Scattering” (%BS) en función de la longitud de la celda de muestra (65 mm) durante 60 min, con un analizador óptico vertical de barrido QuickScan (Beckman Coulter; Fullerton, USA).

Las características de dicho equipo son las siguientes: la muestra a ser analizada está contenida en un tubo o celda de vidrio, colocado cerca de una cabeza lectora compuesta por una fuente de luz IR-cercano ($\lambda = 850$ nm) y dos detectores sincrónicos (**Figura 2.3**). El detector de transmisión recibe la luz que atraviesa la muestra ($\approx 0^\circ$), mientras que el detector de “Back-Scattering”, la luz dispersada por la misma ($\approx 135^\circ$). La cabeza lectora móvil del QuickScan realiza un barrido a lo largo de toda la longitud del tubo de muestra (65 mm, aproximadamente), adquiriendo los datos de transmisión y “Back-Scattering” o luz dispersada (%BS) cada 40 μm . De esta manera, es posible obtener las correspondientes curvas con los porcentajes de luz transmitida y dispersada, relativo a estándares externos, en función de la altura de la muestra en mm. El equipo permite hacer varias mediciones en diferentes instantes, obteniéndose una serie de perfiles en función del tiempo (Pan y col., 2002). El principio de medición del analizador óptico vertical de barrido ha sido exhaustivamente estudiado por Mengual y col. (1999).

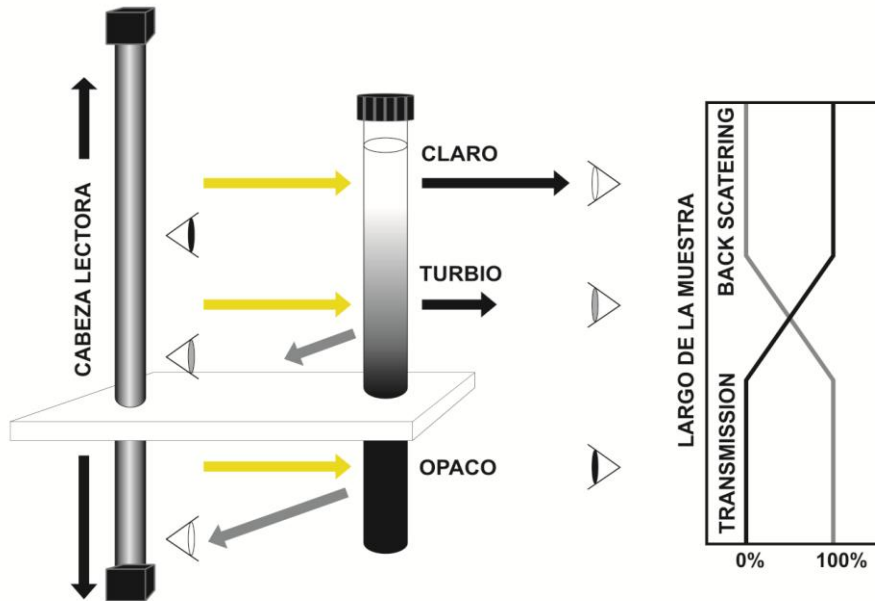


Figura 2.3. Esquema del analizador vertical de barrido (QuickScan). Fuente, cortesía Beckman Coulter

El %BS da una estimación relativa del número de gotas de una emulsión. Cuanto mayor es este valor la cantidad de luz dispersada también es mayor, así como la turbidez de la muestra. Ahora bien, si a medida que pasa el tiempo el %BS disminuye a lo largo de toda la muestra, esto estará relacionado con una disminución del número de partículas (las cuales aumentaron su tamaño), e indica que está ocurriendo un proceso de coalescencia (**Figura 2.4.a**). Si el %BS disminuye sólo en una parte de la celda de muestra y el perfil se desplaza hacia la parte superior del tubo, este comportamiento puede asociarse a un proceso de cremado (**Figura 2.4.b**). Este hecho se debe a que el desplazamiento de las gotas produce una disminución del porcentaje de luz dispersada en dicha zona. Asimismo, ambos procesos pueden ocurrir en forma simultánea (Márquez, 2009).

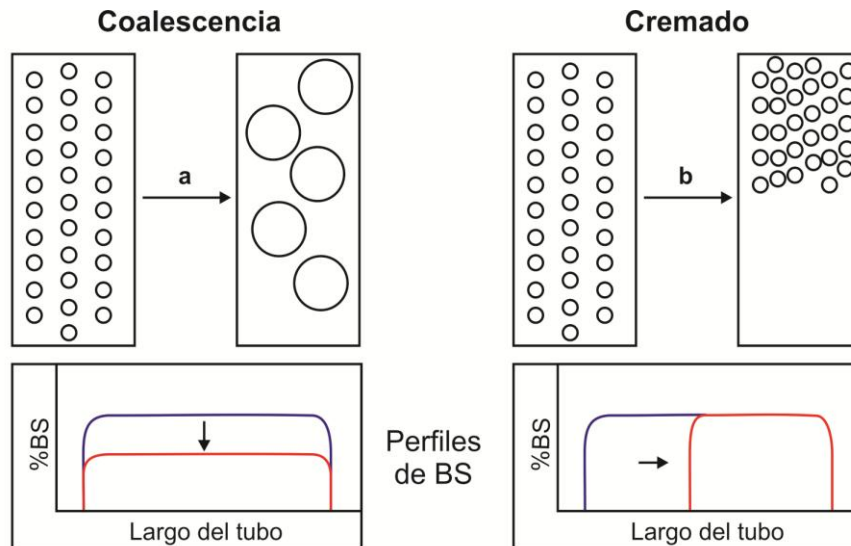


Figura 2.4. Representación esquemática de los cambios ocurridos en los procesos de **a)** coalescencia y **b)** cremado y sus efectos en los perfiles de “Back-Scattering” (Márquez, 2009)

La evolución de los perfiles diferenciales de barrido (%BS) en función del tiempo fue determinada en las zonas inferior del tubo (zona I, 10-15 mm) para analizar un posible proceso de cremado y en la superior (zona II, 50-55 mm) para estudiar la estabilidad de la fase crema formada con respecto a su desestabilización posterior por posible coalescencia, respectivamente.

2.2.3.3. Análisis del tamaño de partículas

Alícuotas de emulsiones se analizaron mediante un analizador de tamaño de partículas Malvern Mastersizer 2000E (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) con un Sistema de dispersión Hydro 2000MU. El diámetro medio de gota en volumen denominado De Brouker ($D [4,3]$) fue determinado inmediatamente después de la homogeneización. Las emulsiones O/W en cada caso se diluyeron en el baño de agua del sistema de dispersión con una velocidad de 2.000 rpm. Esta determinación se llevó a cabo por duplicado en cada caso.

2.2.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA), considerando diferencias significativas a $p \leq 0,05$ con el software SYSTAT 12[®] (2007).

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Lecitina nativa de girasol

La lecitina nativa de girasol utilizada como material de partida presentó una concentración de fosfolípidos del 45,3% (PC 16,4%, PI 17,1%, PE 6,3%, fosfolípidos minoritarios 5,5%), 19,1% de otros compuestos (glicolípidos y carbohidratos complejos) y 35,6% de aceite. La relación PC/PE fue de 2,6.

2.3.1.1. Rendimiento de las fracciones

El proceso de “deoiling” realizado a los extractos etanólicos y los respectivos residuos ha permitido la obtención de fracciones enriquecidas en fosfatidilcolina (FPC) y en fosfatidilinositol (FPI). El rendimiento másico porcentual correspondiente a las FPC y FPI obtenidas mediante el proceso de fraccionamiento de la lecitina nativa de girasol con mezclas etanol absoluto:agua (90:10; 96:4 v/v) a diferentes niveles de pH (3,3; 7,5; 10,0) se presentan en la **Tabla 2.1**. En la misma es posible observar un incremento significativo ($p \leq 0,05$) en el rendimiento de la FPC (soluble en alcohol) en función del aumento del contenido de etanol absoluto presente en el solvente de extracción. Un comportamiento opuesto fue evidenciado por la FPI. Estos resultados pueden relacionarse con la solubilidad limitada que exhiben los fosfolípidos en agua y en soluciones acuosas (Carlsson, 2008) por lo que con el aumento en el contenido de etanol absoluto, el rendimiento de la FPC es mayor.

Tabla 2.1. Rendimiento másico porcentual de las fracciones enriquecidas en fosfatidilcolina (FPC) y en fosfatidilinositol (FPI) (%) obtenidas durante el proceso de fraccionamiento de lecitina nativa de girasol en función del pH y composición del solvente de extracción

Etanol absoluto:agua(v/v)	pH	FPC (%)	FPI (%)
90:10	3,3	12,5 ^a	51,9 ^b
	7,5	12,7 ^a	51,5 ^b
	10,0	13,8 ^a	50,9 ^b
96:4	3,3	15,6 ^b	49,0 ^a
	7,5	15,5 ^b	49,3 ^a
	10,0	15,2 ^b	48,3 ^a

Valores promedio (n=2). Diferentes superíndices en cada columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

El incremento de la concentración de etanol absoluto en el solvente de extracción produjo un aumento del rendimiento másico de la FPC desde 12,5 (90:10; pH 3,3) a 15,6% (96:4; pH 3,3), mientras que la FPI disminuyó desde 51,9 (90:10; pH 3,3) a 48,3% (96:4; pH 10,0). Estos resultados fueron similares a los obtenidos en estudios previos (Cabezas, 2010). Asimismo, los rendimientos másicos porcentuales obtenidos como una función del pH del solvente de extracción no presentaron diferencias significativas ($p \geq 0,05$).

2.3.1.2. Composición de fosfolípidos

La distribución de los fosfolípidos en ambas fracciones -soluble e insoluble- es gobernada por la composición de la lecitina, la temperatura y composición del solvente de extracción, especialmente su contenido de agua. La composición de fosfolípidos correspondiente a las fracciones enriquecidas en fosfatidilcolina (FPC) y en fosfatidilinositol (FPI) se presenta en la **Tabla 2.2**, donde puede observarse la eficiencia del proceso de fraccionamiento previamente descrito.

Tabla 2.2. Composición de fosfolípidos correspondiente a las fracciones enriquecidas en fosfatidilcolina (FPC) y en fosfatidilinositol (FPI) (g/100g lecitina) determinado por ^{31}P RMN

Etanol absoluto:agua (v/v)	pH	FPC			FPI		
		%PC	%PI	%PE	%PC	%PI	%PE
90:10	3,3	46,2 ^a	4,1 ^c	6,2 ^b	14,7 ^c	30,4 ^a	9,4 ^b
	7,5	46,0 ^a	3,8 ^c	6,2 ^b	14,2 ^{bc}	30,0 ^a	9,6 ^b
	10,0	46,0 ^a	4,0 ^c	6,1 ^b	13,5 ^b	30,2 ^a	9,5 ^b
96:4	3,3	44,8 ^a	2,6 ^b	5,6 ^a	11,6 ^a	33,0 ^{bc}	7,6 ^a
	7,5	45,5 ^a	1,7 ^a	5,3 ^a	12,1 ^a	33,8 ^c	7,7 ^a
	10,0	45,0 ^a	3,1 ^b	6,4 ^b	11,7 ^a	32,3 ^b	9,6 ^b

Valores promedio (n=2). Diferentes superíndices en cada columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Los resultados experimentales obtenidos muestran que las FPC obtenidas con diferentes solventes de extracción contienen elevados niveles de PC y bajos tenores de PI, lo cual está asociado al fundamento del proceso de fraccionamiento basado en la solubilidad diferencial de los fosfolípidos individuales. Así, la

fosfatidilcolina (PC) es muy soluble en etanol, la fosfatidiletanolamina (PE) se distribuye más o menos uniformemente entre las fases soluble e insoluble y fosfolípidos más ácidos como el fosfatidilinositol (PI), son prácticamente insolubles (Schneider, 2008).

Efecto de la composición del solvente de extracción

Se evidenció una elevada solubilidad de PC para ambos sistemas de solvente de extracción ensayados, con concentraciones promedio de PC $\geq 45\%$, mientras que los niveles de PI se incrementaron significativamente ($p \leq 0,05$) al utilizar el sistema etanol absoluto:agua 90:10 (v/v) respecto de etanol absoluto:agua 96:4 (v/v).

En contraste, las fracciones enriquecidas en PI exhibieron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en la composición de fosfolípidos, mostrando un mayor enriquecimiento de PI en función del incremento de la concentración de etanol absoluto. La composición de las FPI presentaron una concentración promedio de PI de 33,0% con solventes de extracción 96:4, mientras que el fraccionamiento con un menor contenido de etanol absoluto (90:10) registró un rendimiento promedio de 30,2%. Por otra parte, los contenidos de PC y PE fueron mayores al realizar el fraccionamiento con mezclas etanol absoluto:agua 90:10 (14,1 y 9,5%; respectivamente), mientras que con mezclas 96:4 se obtuvieron valores promedio de 11,8 y 7,9%, respectivamente.

El análisis de la composición de fosfolípidos de la FPI ha permitido observar que el empleo de un mayor contenido de etanol absoluto en el solvente de extracción se traduce en un mayor tenor de PI y un menor tenor de PC.

Las fracciones solubles en etanol mostraron una alta relación PC/PE ($\geq 7,0$); la fracción enriquecida en PC obtenida mediante fraccionamiento a pH 7,5 con una mezcla de etanol absoluto:agua 96:4 (v/v) presentó la más alta relación PC/PE (8,6), mientras que las fracciones insolubles tuvieron muy bajos niveles de este parámetro ($\leq 1,6$) (**Tabla 2.3**). Estos resultados muestran una marcada diferencia en la composición de fosfolípidos entre las FPC y FPI respecto a la lecitina nativa de girasol de partida, la cual presenta una relación PC/PE de 2,6.

Tabla 2.3. Relación fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina (PC/PE) correspondientes a las fracciones enriquecidas en fosfatidilcolina (FPC) y en fosfatidilinositol (FPI)

Etanol absoluto:agua (v/v)	pH	FPC	FPI
90:10	3,3	7,4 ^{ab}	1,6 ^c
	7,5	7,4 ^{ab}	1,5 ^{bc}
	10,0	7,5 ^{ab}	1,4 ^b
96:4	3,3	7,9 ^b	1,5 ^{bc}
	7,5	8,6 ^c	1,6 ^c
	10,0	7,0 ^a	1,2 ^a

Valores promedio (n=2). En cada columna los diferentes superíndices indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Los fosfolípidos PC y PE pueden presentar distintos arreglos en la interfase. Esta característica le otorga a la relación PC/PE, la posibilidad de ser utilizada como un parámetro relacionado en forma directa con la potencial actividad como agente emulsificante en diversos tipos de emulsiones, tanto en el caso de lecitinas nativas como modificadas (van Nieuwenhuyzen y Szuhaj, 1998).

Efecto del pH del solvente de extracción

Dijkstra y De Kock (1993) han sugerido que la distribución de fosfolípidos en cada fracción enriquecida es afectada por cambios en el nivel de pH del solvente de extracción. Estos autores observaron que la solubilidad de fosfatidilcolina (PC) puede ser ligeramente mayor cuando se modifica el pH. Por otra parte, la fosfatidiletanolamina (PE) a pH neutro presenta una solubilidad considerablemente menor que PC, mientras que la misma decrece ligeramente con la disminución del pH, y aumenta considerablemente cuando el mismo se eleva. En el caso del fosfatidilinositol (PI), este fosfolípido muestra una baja solubilidad cualquiera sea el nivel del pH del solvente de extracción.

En el presente estudio, podemos observar que al realizar el fraccionamiento de la lecitina nativa de girasol con las mezclas etanol absoluto:agua 96:4 (v/v) las diferentes fracciones obtenidas presentaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en el contenido de PI y PE en función de los niveles de pH ensayados. En la **Tabla 2.2** puede visualizarse que el contenido de PI en la FPC fue significativamente menor ($p \leq 0,05$) a pH 7,5. Por otra parte, el contenido de PE aumentó significativamente al

realizar el proceso de fraccionamiento con solvente de extracción a pH 10,0 en ambas fracciones ($p \leq 0,05$). Por lo tanto, diferentes niveles de pH en los sistemas etanol absoluto-agua pueden ejercer influencia en la composición fosfolipídica de las diferentes fracciones.

En contraste, las fracciones obtenidas con las mezclas etanol absoluto:agua 90:10 (v/v) no presentaron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) en su composición fosfolipídica, lo cual puede estar asociado a la elevada influencia asociada al mayor contenido de agua del solvente de extracción.

2.3.1.3. Coeficientes de extracción

Los coeficientes de extracción %E_{PL} (%E_{PC}, %E_{PE} y %E_{PI}) fueron calculados a partir de los rendimientos máxicos porcentuales y de la composición fosfolipídica de las FPC y FPI obtenidas con diferentes solventes de extracción, lo cual puede observarse en la **Tabla 2.4**.

Tabla 2.4. Coeficientes de extracción (%E_{PL}) correspondientes a las fracciones enriquecidas en fosfatidilcolina (FPC) y en fosfatidilinositol (FPI) obtenidas mediante el fraccionamiento de lecitina nativa de girasol en función de la composición y el pH del solvente de extracción

Etanol absoluto:agua (v/v)	pH	FPC			FPI		
		%E _{PC}	%E _{PI}	%E _{PE}	%E _{PC}	%E _{PI}	%E _{PE}
90:10	3,3	42,9 ^a	3,2 ^c	13,7 ^a	57,1 ^c	96,8 ^a	86,3 ^c
	7,5	44,4 ^{ab}	3,0 ^{bc}	13,7 ^a	55,6 ^{bc}	97,0 ^a	86,3 ^c
	10,0	48,0 ^b	3,5 ^c	14,9 ^a	52,0 ^b	96,5 ^a	85,1 ^c
96:4	3,3	55,2 ^c	2,4 ^b	19,1 ^c	44,8 ^a	97,6 ^{ab}	80,9 ^a
	7,5	54,2 ^c	1,6 ^a	17,8 ^b	45,8 ^a	98,4 ^b	82,2 ^{ab}
	10,0	54,8 ^c	3,0 ^{bc}	17,4 ^b	45,2 ^a	97,0 ^a	82,6 ^b

Valores promedio (n=2). En cada columna diferentes superíndices indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

La eficiencia del fraccionamiento de la lecitina de girasol se determinó mediante el análisis de los valores de %E_{PL} basados en la solubilidad de los diferentes PLs en las mezclas etanol absoluto:agua. Para las FPC, los valores de %E_{PC} y %E_{PE} indicaron un aumento significativo ($p \leq 0,05$) en la solubilidad de ambos fosfolípidos (PC y PE) para la mayor concentración de etanol absoluto en el

solvente de extracción. En contraste, el %E_{PI} fue < 4,0% en todas las condiciones ensayadas, lo que indica una muy baja solubilidad de PI en los diferentes solventes de extracción ensayados.

2.3.1.4. Emulsiones con fracciones enriquecidas en fosfatidilcolina (FPC) de lecitina nativa de girasol

2.3.1.4.1. Procesos de desestabilización

La estabilidad global de las emulsiones O/W (Φ_m 0,30) conteniendo diferentes concentraciones de FPC (0,1-2,0%) estudiadas fue determinada mediante la evolución de las curvas de flujo de luz dispersada ("Back-Scattering") en función de la longitud del tubo proporcionadas por un analizador vertical de barrido (QuickScan) durante 60 min.

Los perfiles del QuickScan permitieron detectar la presencia de procesos de desestabilización que involucran la migración de partículas (cremado) y del aumento del tamaño de las mismas (coalescencia).

A modo de ejemplo, en las **Figuras 2.5 y 2.6** se muestran diferentes perfiles de emulsiones O/W formuladas con el agregado de fracciones PC obtenidas a partir del fraccionamiento con mezclas etanólicas (90:10 y 96:4 v/v) a pH 7,5.

En la zona inferior del tubo puede visualizarse el proceso de desestabilización producido por la migración de las gotas hacia la parte superior del mismo (cremado). En función del tiempo, el porcentaje de "Back-Scattering" (%BS) disminuyó y el perfil se desplazó hacia la parte superior del tubo. Estos hechos se evidencian mediante la aparición del punto isobéptico localizado entre la línea base y la curva de BS. Este punto separa una zona de BS inferior al BS inicial (izquierda) dado por la migración de las gotas de la fase dispersa hacia la zona superior del tubo y una zona de BS superior al BS inicial (derecha) correspondiente a la aparición de una fase crema con una alta concentración de gotas de aceite (Cabezas, 2010).

En la zona superior del tubo (50-55 mm) podemos observar la formación de una fase crema. En la mayoría de las emulsiones se observa un descenso del BS en función del tiempo indicando la presencia del proceso de desestabilización por coalescencia, es decir, un aumento del tamaño de las partículas con la consecuente disminución en el número de las mismas.

Las emulsiones preparadas con las FPC obtenidas con mezclas etanólicas 96:4 v/v fueron considerablemente más estables en todo el rango de concentraciones estudiado respecto a las formuladas con FPC obtenidas a partir de mezclas 90:10 v/v. Este comportamiento fue observado para todos los niveles de pH del sistema de solventes de extracción estudiados (datos no mostrados).

Puede observarse que a medida que aumenta la concentración de las FPC, las emulsiones son más estables frente al cremado y la coalescencia. Cabe señalar que para niveles de 2,0%, los perfiles de QuickScan no presentaron disminuciones notorias del BS durante el periodo estudiado en la zona superior del tubo, lo que indica una considerable estabilidad de la fase crema frente al proceso de coalescencia de las emulsiones formuladas bajo esas condiciones.

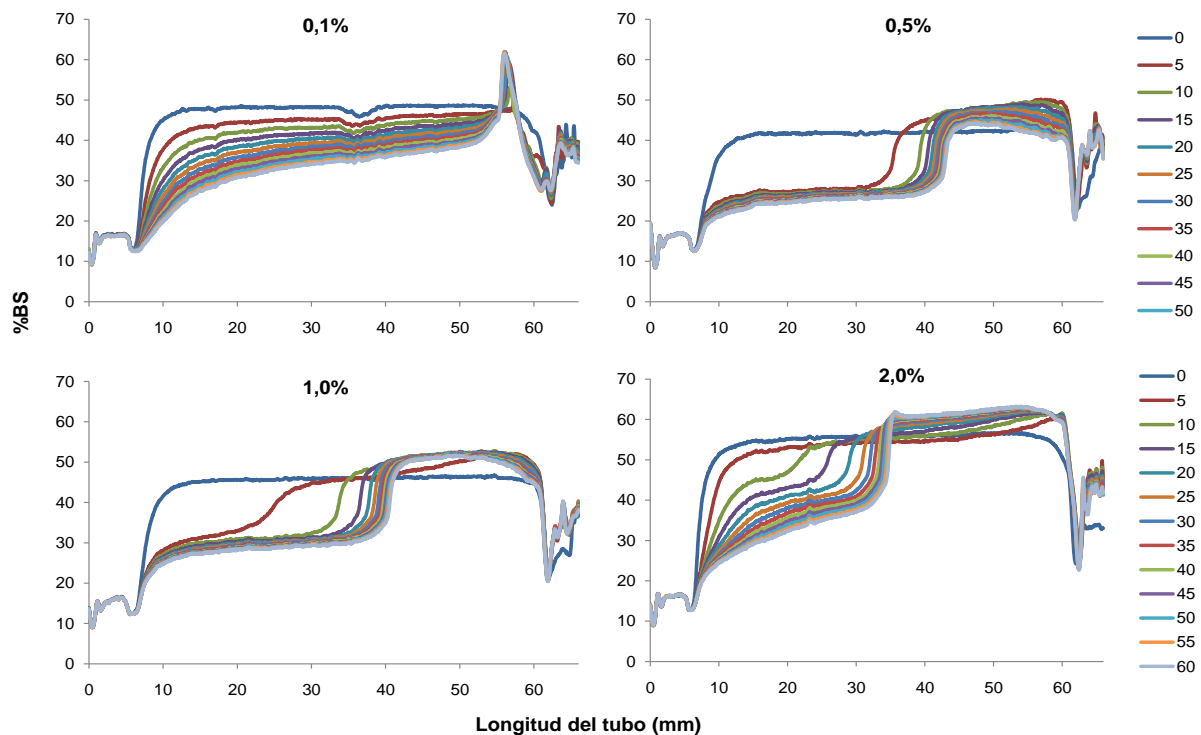


Figura 2.5. Perfiles diferenciales correspondientes a emulsiones O/W (Φ_m 0,30) formuladas con la adición de FPC obtenida con mezcla etanol absoluto:agua (90:10 v/v; pH 7,5) a diferentes concentraciones (0,1; 0,5; 1,0 y 2,0%)

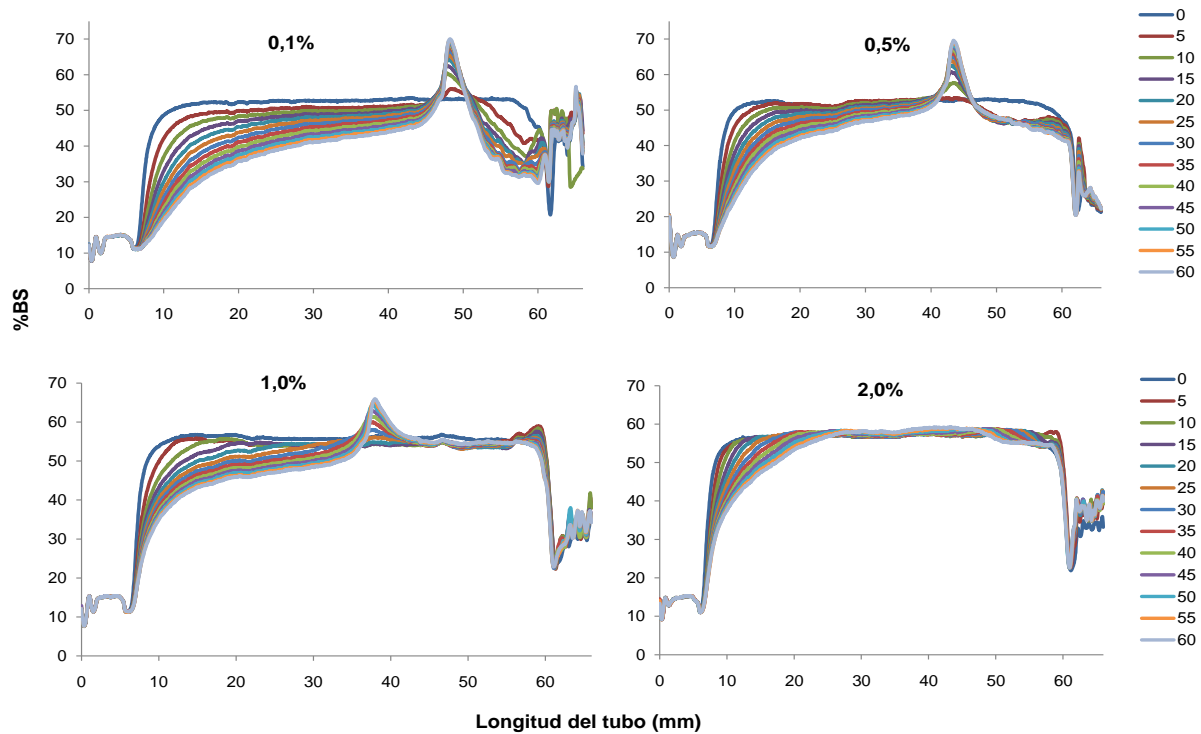


Figura 2.6. Perfiles diferenciales correspondientes a emulsiones O/W (Φ_m 0,30) con la adición de diferentes concentraciones (0,1; 0,5; 1,0 y 2,0%) de Fracción enriquecida en PC obtenida con mezcla etanol absoluto:agua (96:4 v/v; pH 7,5)

2.3.1.4.2. Cinéticas de desestabilización

El estudio de la cinética de desestabilización de las emulsiones O/W conteniendo diferentes concentraciones de FPC, extraídas con mezclas de etanol absoluto:agua 90:10 (v/v) a distintos niveles de pH, se presentan en las **Figuras 2.7 y 2.8**. La desestabilización de las emulsiones se evidencia por una rápida disminución de los valores de %BS en la base del tubo para todas las concentraciones de FPC y niveles de pH del sistema de solventes ensayados (**Figura 2.7**). En la **Figura 2.8**, la desestabilización de la fase crema a través de un proceso de coalescencia se registró a concentraciones de 0,1 y 0,5% (v/v) del agente emulsificante, lo que se tradujo en una disminución de los valores de %BS en la zona superior del tubo. Sin embargo, cuando la concentración del agente emulsificante fue de 1,0 y 2,0% (v/v), se formó una fase crema estable resistente a la coalescencia para todos los niveles de pH estudiados (**Figura 2.8**). La menor estabilidad de dicha fase crema fue observada a pH 3,3 con estas FPC.

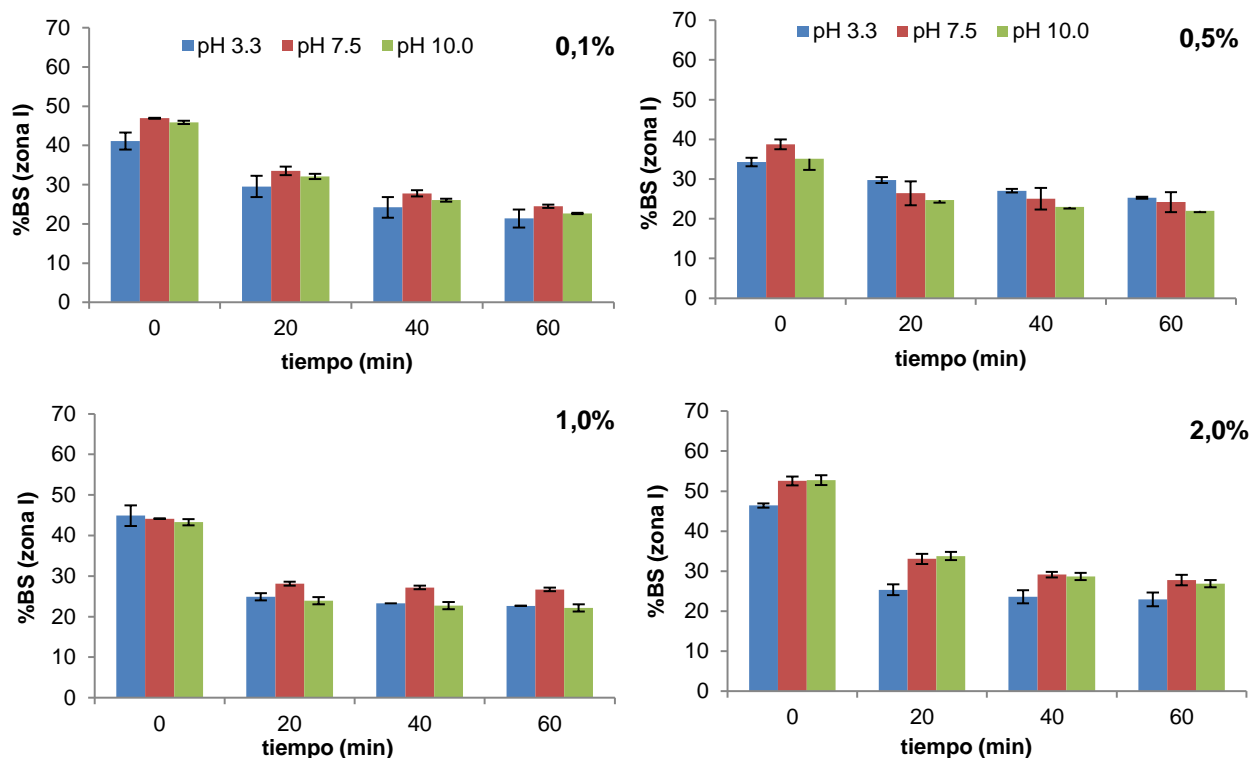


Figura 2.7. Cinética de desestabilización de emulsiones O/W (Φ_m 0,30) con FPC 90:10 a diferentes niveles de pH en un rango de 0,1 – 2,0% p/p correspondiente a la zona I (10-15 mm). Valores promedio (n=2) \pm SD

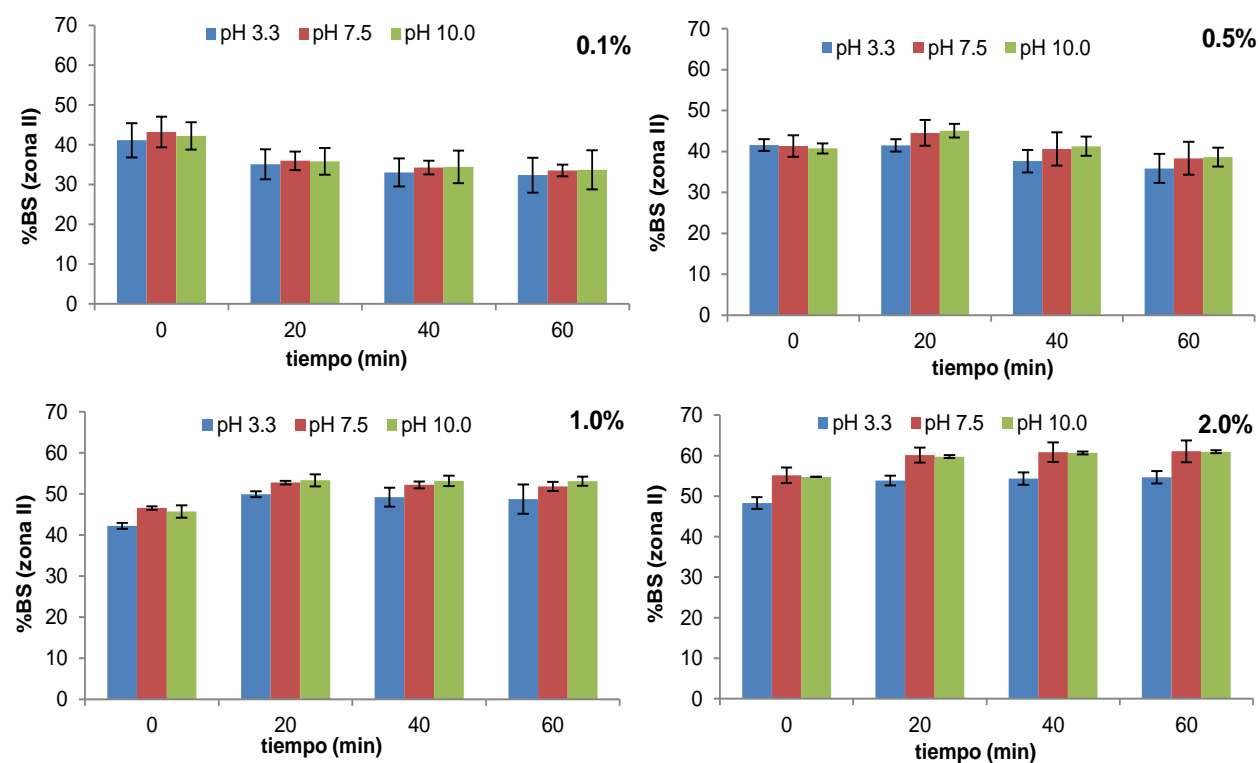


Figura 2.8. Cinética de desestabilización de emulsiones O/W (Φ_m 0,30) con FPC 90:10 a diferentes niveles de pH en un rango de 0,1 – 2,0% p/p correspondiente a la zona II (50-55 mm). Valores promedio (n=2) \pm SD

En las **Figuras 2.9 y 2.10** se visualizan las cinéticas de desestabilización de las emulsiones en función de la concentración de FPC obtenidas mediante el fraccionamiento con mezclas etanol absoluto:agua 96:4 (v/v) a diferentes niveles de pH en las zonas inferior y superior del tubo, respectivamente.

Los perfiles de QuickScan correspondientes a la zona I (**Figura 2.9**) registraron un aumento en los valores de %BS en función del incremento de la concentración de la fracción enriquecida en PC obtenida con un sistema de solvente de extracción a pH 7,5. En contraste, las FPC obtenidas a pH 3,3 y 10,0 con etanol absoluto:agua 96:4 v/v, mostraron una capacidad emulsificante baja para todas las condiciones estudiadas. Por otra parte, en la parte superior del tubo (**zona II, Figura 2.10**) se produjo una desestabilización por coalescencia de la fase crema a bajas concentraciones del agente emulsificante (0,1 y 0,5% v/v), siguiendo una tendencia similar a la registrada en emulsiones obtenidas con las FPC extraídas con una mezcla de etanol absoluto:agua 90:10 (v/v), (ver **Figura 2.8**). Sin embargo, con el aumento de la concentración del agente emulsificante a 1,0 y 2,0%, las emulsiones de FPC extraídas a pH 3,3 y 7,5 formaron una fase crema estable para ambos sistemas etanol absoluto:agua de forma tal que, la parte superior (zona II) mostró mayores niveles de %BS para ambas concentraciones de FPC que en las anteriores. Estos resultados pueden deberse a la formación de una fase crema con una menor proporción de fase continua acorde a lo informado por Palazolo, 2006.

La capacidad emulsificante más importante estuvo asociada a la fracción enriquecida en PC extraída a partir del sistema con una mayor concentración de etanol absoluto a pH 7,5, tal como se muestra en la **Figura 2.9**. Este hecho podría estar asociado a la mayor relación PC/PE de esta fracción (ver **Tabla 2.3**).

Tal como se comentaba anteriormente, los diversos grupos de cabeza de los fosfolípidos individuales le aportan diferentes polaridades y propiedades emulsificantes a las lecitinas (Hernández y Quezada, 2008), lo cual está directamente asociado con la carga neta de las moléculas (Schneider y Szuhaj, 1989). PC y PE son zwitteriónicos a pH neutro, debido a la presencia del grupo amino en la molécula, mientras que PI tiene una carga neta negativa (es aniónico) a este valor de pH (Dijkstra y De Kock, 1993; Penci, 2009). PC en una interfase agua-aceite forma una estructura laminar con monocapas y bicapas bien ordenadas; mientras que PE asume una disposición hexagonal inversa (van Nieuwenhuyzen y

Szuhaj, 1998). Debido a la mayor relación PC/PE asociada a la fracción enriquecida en PC, obtenida mediante fraccionamiento de la lecitina con etanol absoluto:agua 96:4 a pH 7,5, esta FPC podría ser considerada como un buen agente emulsificante aceite-agua (O / W).

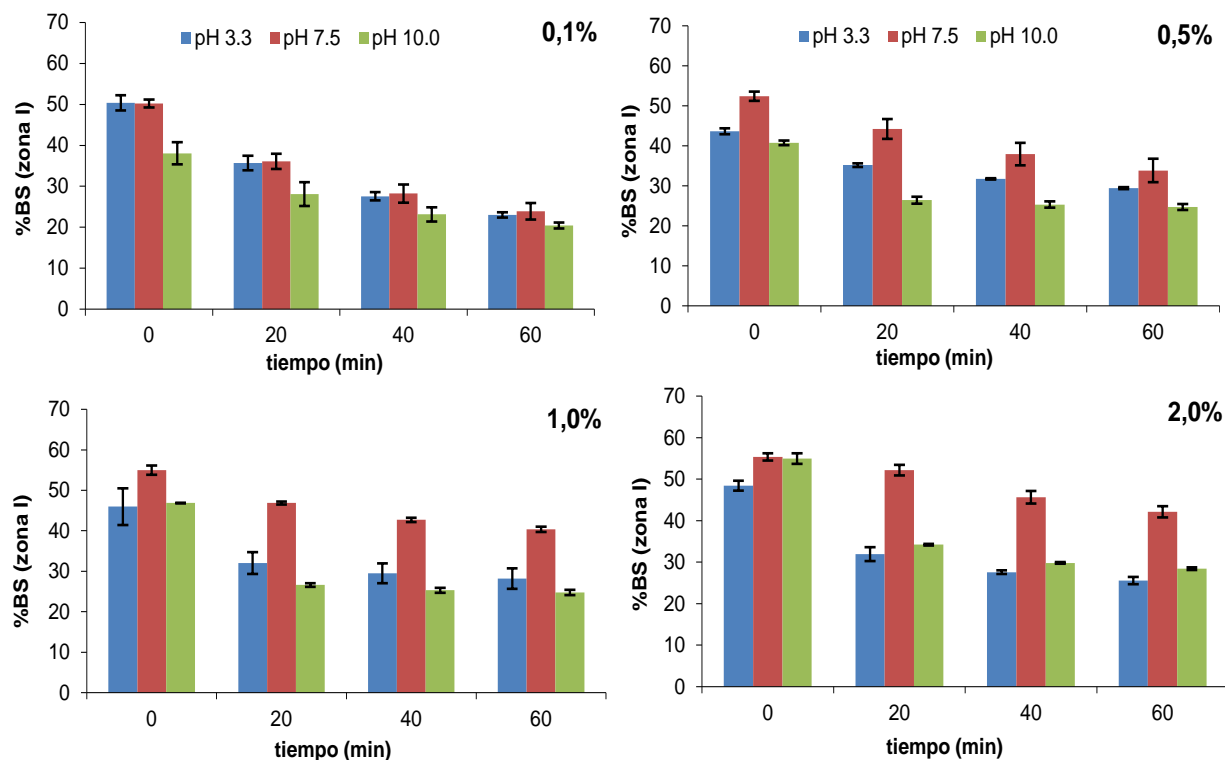


Figura 2.9. Cinética de desestabilización de emulsiones O/W (Φ_m 0,30) con FPC 96:4 a diferentes niveles de pH en un rango de 0,1 – 2,0% p/p correspondiente a la zona I (10-15 mm)

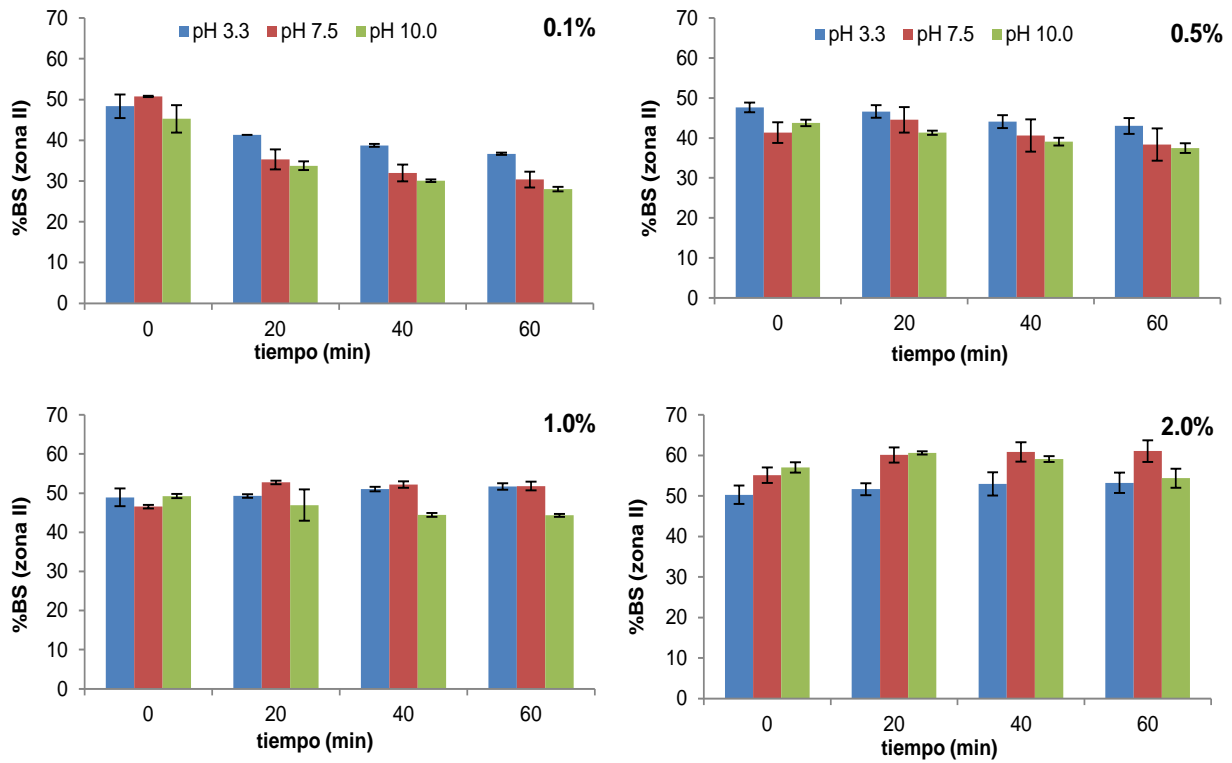


Figura 2.10. Cinética de desestabilización de emulsiones O/W (Φ_m 0,30) con FPC 96:4 a diferentes niveles de pH en un rango de 0,1 – 2,0% p/p correspondiente a la zona II (50-55 mm). Valores promedio ($n=2$) \pm SD

2.3.1.4.3. Análisis del tamaño de partículas

La **Tabla 2.5** muestra los valores correspondientes de los diámetros medio De Brouker gotas en D [4,3] de las diferentes emulsiones estudiadas. De acuerdo con Relkin y Sourdet (2005), el D [4,3] es un parámetro sensible aplicable al análisis de la agregación de las gotas de aceite producida a través de procesos de coalescencia y/o floculación.

Tabla 2.5. Diámetro medio De Brouker D [4,3] correspondientes a emulsiones O/W obtenidas con FPC en función de la composición y el nivel de pH del solvente de extracción

pH	FPC (% p/p)	D [4,3] (μm)	
		Etanol absoluto:agua 90:10 (v/v)	Etanol absoluto:agua 96:4 (v/v)
3,3	0,5	155,25 ^e	104,72 ^c
	1,0	90,22 ^c	53,15 ^b
	2,0	40,79 ^a	33,24 ^a
7,5	0,5	129,71 ^d	116,48 ^c
	1,0	60,99 ^b	66,07 ^b
	2,0	36,52 ^a	39,23 ^a
10,0	0,5	131,08 ^d	138,64 ^d
	1,0	64,69 ^b	63,86 ^b
	2,0	38,66 ^a	36,10 ^a

Valores promedio (n=2). En cada columna diferentes superíndices indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Las emulsiones con 0,1% (v/v) a FPC tienden a coalescer rápidamente debido a que la cantidad de agente emulsificante no es suficiente para recubrir completamente la superficie de las gotitas de aceite (datos no mostrados). Seguidamente, el diámetro medio D [4,3] disminuyó en forma progresiva y de manera significativa ($p \leq 0,05$) con el aumento de la concentración de FPC. Niveles superiores a 0,5% (v/v) hasta 2,0% (v/v) mostraron menores diámetros de gotas para ambas mezclas etanol absoluto:agua a diferentes niveles de pH. Estos resultados concuerdan con los perfiles del QuickScan, mostrando una mayor estabilidad asociada a las emulsiones O/W de la concentración de FPC en función del incremento. Así, las emulsiones con niveles de FPC $> 0,5\%$ v/v no mostraron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) en su estabilidad, teniendo en cuenta las diferentes condiciones de extracción, proporciones de mezclas etanol absoluto:agua o distintos niveles de pH. No obstante, la mayor estabilidad de las emulsiones estudiadas estuvo asociada a la fracción enriquecida en PC obtenida mediante etanol absoluto:agua 96:4 a pH 7,5 y estaría relacionada con una mayor relación PC/PE de la misma.

2.4. CONCLUSIONES PARCIALES

- El proceso de fraccionamiento con sistemas etanol-agua a diferentes niveles de pH sobre la lecitina nativa de girasol, permitió la obtención de fracciones notoriamente enriquecidas en fosfatidilcolina (PC) para ambas mezclas etanólicas ensayadas. Además, pudo observarse el alto grado de insolubilidad del fosfatidilinositol (PI) durante dicho proceso.
- El rendimiento másico porcentual de las fracciones enriquecidas en fosfatidilcolina (FPC) exhibió incrementos significativos ($p \leq 0,05$) al aumentar la concentración de etanol absoluto en el solvente de extracción. Asimismo, dichos rendimientos no mostraron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) según los diferentes niveles de pH estudiados.
- La presencia de agua en el solvente de extracción es un factor a tener en cuenta en el desarrollo del proceso de fraccionamiento, dada la considerable disminución del grado de extracción de fosfatidilcolina (PC) registrado a medida que aumenta el contenido acuoso.
- El pH del sistema de solventes de extracción tuvo incidencia en la composición de fosfolípidos de las diferentes FPC obtenidas, especialmente para mezclas etanol absoluto:agua 96:4 v/v. Así, se registraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en el contenido de PI y PE siendo el tenor de PI significativamente menor a pH 7,5 y el de PE mayor a pH 10,0. Asimismo, la relación PC/PE presentó variaciones en función del pH del solvente de extracción, siendo significativamente superior en las fracciones FPC obtenidas con etanol absoluto:agua 96:4 v/v, pH 7,5.
- El estudio de las cinéticas de desestabilización mostró que las FPC obtenidas con mezclas etanólicas 96:4 dieron lugar a emulsiones O/W más estables que las provenientes de mezclas etanol absoluto:agua 90:10, para todo el rango de concentraciones y niveles de pH estudiados en función del tiempo. El aumento del contenido porcentual de agua en el sistema de solventes de extracción incidió negativamente sobre las características emulsificantes de las lecitinas modificadas de girasol evaluadas.

➤ La mejor capacidad emulsificante registrada estuvo asociada a la fracción enriquecida en fosfatidilcolina (FPC) obtenida con una mezcla etanol absoluto:agua 96:4, pH 7,5. Este hecho puede relacionarse con el mayor valor de relación PC/PE correspondiente a esta fracción (FPC), lo cual se traduce en un mejor arreglo de los fosfolípidos a nivel interfacial y por ende, en mejores propiedades emulsificantes.

2.5. DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Publicaciones científicas en revistas internacionales

- ✓ “Characterization and Emulsifying Properties of Different Sunflower Phosphatidylcholine Enriched Fractions”. Guiotto Estefania N, Cabezas Dario M, Diehl Bernd W K, Tomás Mabel C. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. *European Journal of Lipid Science and Technology*, Volume 115, Issue 8, pages 865 – 873, 2013. DOI: 10.1002/ejlt.201200394

Capítulos de libro

- ✓ “Antioxidant and Emulsifying Properties of Modified Sunflower Lecithin by Fractionation with Ethanol-Water Mixtures”. Cabezas Dario M, Guiotto Estefania N, Diehl Bernd W K, Tomás Mabel C. "Food Industry". Ed. InTech, 2012. ISBN 980-953-307-860-6

Presentaciones en congresos y/o jornadas

- ✓ “Fractionation of sunflower lecithin at different processing conditions”. Guiotto Estefania N, Cabezas Dario M, Tomás Mabel C. 103rd AOCS Annual Meeting & Expo, Long Beach, USA; 29 de abril al 2 de mayo 2012
- ✓ “Efecto de las condiciones operativas sobre el fraccionamiento de lecitina de girasol”. Guiotto Estefania N, Cabezas Dario M, Diehl Bernd W K, Tomás Mabel C. XIII CONGRESO CYTAL® - AATA, Proc. Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Buenos Aires, Argentina; 19 al 21 de octubre de 2011. ISBN 978-987-22165-4-2

Capítulo III

CONSERVACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ACEITES MEZCLA GIRASOL-CHÍA

3.1. INTRODUCCIÓN

Según el Código Alimentario Argentino (CAA) en el Artículo 520, “se consideran Aceites alimenticios o Aceites comestibles, los admitidos como aptos para la alimentación por el presente y los que en el futuro sean aceptados como tales por la autoridad sanitaria nacional”.

“Los aceites alimenticios se obtendrán a partir de semillas o frutos oleaginosos mediante procesos de elaboración que se ajusten a las condiciones de higiene establecidas por el presente. Presentarán aspecto límpido a 25°C, sabor y olor agradables y contendrán solamente los componentes propios del aceite que integra la composición de las semillas o frutos que provienen y los aditivos que para el caso autoriza el presente”.

Los aceites alimenticios se clasificarán de la siguiente manera:

"Aceite de: corresponde al aceite alimenticio proveniente de *una sola especie vegetal*, se admitirá la presencia de otro aceite en carácter de contaminante en una proporción máxima del 5,0% en peso. Estos productos se rotularán: Aceite de... (llenando el espacio en blanco con el nombre del vegetal del cual procede)”.

"Aceite comestible mezcla: Es el aceite alimenticio constituido por la mezcla de 2 o más aceites alimenticios obtenidos de diferentes especies vegetales. Sólo se considerará como tal aquél cuyos aceites componentes estén presentes en una proporción superior al 5%. Este producto se rotulará: Aceite comestible mezcla pudiendo indicarse el nombre de los aceites componentes y sus respectivos porcentajes, en orden decreciente de sus proporciones”.

Los Comités Internacionales de Nutrición y Alimentación convocados por la FAO/OMS han establecido que las grasas en general, no deberían aportar más de un 30% de las calorías totales que consume un adulto. Además, recomiendan que la distribución de consumo de los distintos tipos de ácidos grasos corresponda a un aporte del 10% por parte de los ácidos grasos saturados (AGS), 10% de los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y 10% de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI). “Estos lineamientos representan una relación 1:1:1 entre AGS, AGMI y AGPI. Además, la relación de AGPI omega-6 y de AGPI omega-3 debería estar en el rango de 5:1 a 10:1 como máximo” (FAO/WHO, 1997).

Si bien los aceites disponibles en estado puro no se aproximan a esta recomendación, excepto el aceite de canola, es posible obtener mezclas de aceites con una disminución del nivel de AGS o de AGMI y adecuar el contenido de AGPI ω -6 y ω -3, disminuyendo así la relación entre éstos (Valenzuela y col., 2002).

El aceite de girasol (*Helianthus annuus* L.) es uno de los aceites vegetales más consumidos en Argentina. El aceite obtenido de los híbridos tradicionales contiene 65-70% de ácido linoleico (ω -6) (Gunstone, 2002).

El aceite proveniente de la semilla de chía (*Salvia hispanica* L.) es una fuente interesante de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), con el mayor tenor de ácido α -linolénico (~ 60%) de cualquier otra fuente vegetal conocida. Este ácido graso (FA) pertenece a la familia ω -3 y es esencial para el crecimiento y el desarrollo normal del organismo humano (Ixtaina y col., 2012). Así, aceites con relaciones ω -6/ ω -3 recomendadas por la FAO/OMS pueden lograrse mediante la mezcla de aceites vegetales con diferentes composiciones en ácidos grasos tal como el de girasol, el cual presenta una relación ω -6/ ω -3 25:1 con otro aceite de mayor contenido en AGPI omega-3, tal como el aceite de chía.

La mezcla de aceites ha sido una práctica común realizada en muchos países. Últimamente, se ha posibilitado la obtención y comercialización de aceites mezcla a partir de aceites convencionales con otros no convencionales (Ramadán y col., 2008). Los aceites vegetales mezcla pueden aumentar los niveles de lípidos bioactivos y el contenido de antioxidantes naturales. Los aspectos nutricionales asociados a la presencia de componentes minoritarios y mayoritarios juegan un papel importante en la prevención de las enfermedades y mejoras en la salud. Por ello, es importante formular mezclas de aceites vegetales con una composición adecuada a fin de potenciar su valor nutritivo y estabilidad (Frankel y Huang, 1994; Shiela y col., 2004).

La oxidación de lípidos tal como se describió en el **Capítulo I**, es uno de los procesos de deterioro más importantes para la industria alimentaria, ya que imparte sabores y aromas indeseables, compromete la calidad nutricional de los aceites y conduce a la producción de compuestos tóxicos, limitando su vida útil (Mohamed, 2013). Esto es relevante cuando los sustratos lipídicos se componen de ácidos grasos insaturados o poliinsaturados (AGPI) sensibles a la oxidación. La oxidación de las grasas y los aceites comestibles puede ser controlada por la aplicación de

antioxidantes y el uso de técnicas de procesamiento que reducen al mínimo la pérdida de tocoferoles y otros antioxidantes naturales (Miraliakbaru y Shahidi, 2008).

La eficacia de los antioxidantes depende de su reactividad química (por ej. atrapantes de radicales o quelantes de metales), la interacción con diversos componentes de los alimentos, las condiciones ambientales (pH y concentración) y la ubicación física de los antioxidantes en los sistemas alimentarios (Lucas y col., 2010).

Las semillas oleaginosas poseen sustancias con propiedades antioxidantes, dentro de las que se destacan los tocoferoles. Dichos compuestos son moléculas formadas por un grupo cromano y una cadena lateral con un grupo fitilo. En la naturaleza existen cuatro formas diferentes de tocoferoles, denominados (α -, β -, γ - y δ -tocoferol), los que difieren entre sí por el número y posición de grupos metilo (Me) en el anillo cromano (**Figura. 3.1**).

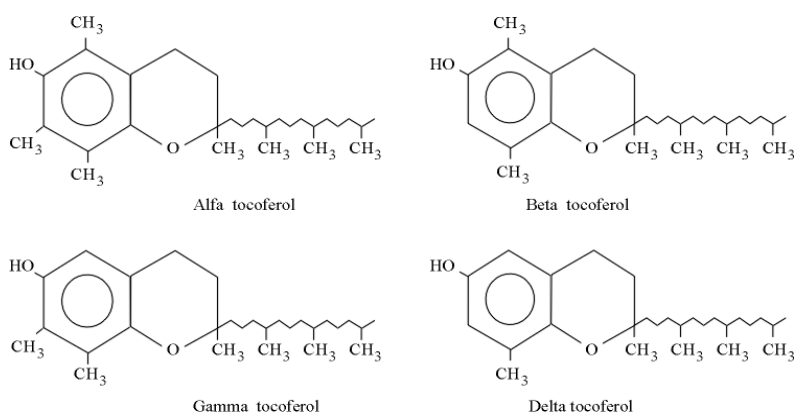


Figura 3.1. Estructura química de los tocoferoles

Debido a se trata de sustancias liposolubles, los tocoferoles presentes en las oleaginosas pasan al aceite durante el proceso de extracción, ejerciendo una doble acción antioxidante. Por un lado presentan una acción *in vitro* es decir, protegen al aceite y a los productos que lo contienen (alimentos elaborados) de la oxidación durante el almacenamiento. Por otra parte, los tocoferoles son compuestos bioactivos, con una importante capacidad antioxidante *in vivo*, la cual es conocida como actividad de vitamina E (Pongracz y col., 1995). Existen grandes diferencias entre los cuatro tipos de tocoferoles en relación con su actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo*. Así, el α -tocoferol se caracteriza por tener la máxima eficacia como antioxidante *in vivo* o vitamina E, aunque su actividad *in vitro* es baja en comparación con los demás tocoferoles. Teniendo como referencia una actividad

antioxidante de 100% para α -tocoferol, Pongracz y col. (1995) han determinado una eficiencia relativa como antioxidantes *in vivo* del 50% para el β -tocoferol, 25% para γ -tocoferol y 1% para δ -tocoferol. En contraste, la eficiencia relativa como antioxidantes *in vitro* fue de 182% para β -tocoferol, 194% para δ -tocoferol y 285% para γ -tocoferol.

La concentración total de tocoferoles en aceites de girasol correspondiente a los híbridos tradicionales es muy variable, siendo α -tocoferol el compuesto mayoritario (Gunstone, 2002). En cambio, en el aceite de chía dicha concentración es menor que la informada para los aceites de girasol, conteniendo el mismo principalmente γ -tocoferol (Ixtaina y col., 2011).

La realización de refinaciones parciales en los aceites vegetales permite mantener o dejar un remanente de la “fracción insaponificable”, la cual está compuesta por una mezcla heterogénea de esteroides, tocoferoles, carotenoides, flavonoides entre otros, los cuales aportan propiedades nutricionales al producto (Valenzuela y col., 2002).

En los últimos años el interés en los aceites obtenidos por prensado en frío se ha incrementado notoriamente ya que los mismos son una buena fuente de componentes benéficos (compuestos fenólicos antioxidantes y otros fitoquímicos) para la salud. Así, el proceso de prensado en frío se convierte en un sustituto interesante para las prácticas convencionales debido a las preferencias de los consumidores por los productos alimenticios naturales (Parry y col., 2006; Lutterodt y col., 2010).

Por otra parte, existen en el mercado varios antioxidantes de origen natural y sintético que pueden retardar o prevenir el deterioro oxidativo de los alimentos grasos. Los antioxidantes que interrumpen la reacción oxidativa en cadena (“chain-breaking”) secuestran los radicales importantes en la etapa de propagación, tales como los radicales alcoxilo ($LO\bullet$) y peroxilo ($LO_2\bullet$), inhibiendo esta etapa del proceso oxidativo. Los antioxidantes que actúan a través del mecanismo de “chain-breaking” más conocidos son las vitaminas C (ácido L-ascórbico) y E (α -tocoferol), compuestos fenólicos, entre otros (Matthäus, 2002). Los compuestos capaces de interrumpir la autooxidación pueden actuar a través de dos vías: la primera involucra la transferencia de átomos de hidrógeno (H), el radical libre capta el átomo de

hidrógeno del antioxidante, resultando en la formación de un radical estable y así se interrumpe la reacción en cadena; la segunda está basada en la transferencia de un electrón (Ou y col., 2002).

Los extractos vegetales, generalmente utilizados contienen nutrientes que junto con las vitaminas C, E y los carotenoides potencian la actividad antioxidante. Las sustancias fenólicas son los componentes más comunes en frutas y vegetales que tienen una fuerte capacidad antioxidante (Contreras-Calderón y col., 2010), la cual está asociada a los ácidos fenólicos (ácidos gálico, protocatéquico, cafeico y rosmarínico), diterpenos fenólicos (carnosol, ácido carnósico, rosmanol y rosmadial), flavonoides (quercetina, catequina, naringenina y kaempferol) y otros compuestos tales como eugenol, carvacrol, timol y mentol. Algunos pigmentos de las plantas (antocianinas y antocianidinas) pueden quelar metales y donar H. Extractos de té verde y de las semillas y hollejos de la uva contienen catequinas, epicatequinas, ácidos fenólicos, proantocianidinas y resveratrol, lo cual contribuye a su actividad antioxidante (Brewer, 2011).

A continuación, se describirán los mecanismos de acción asociados a los antioxidantes utilizados en el presente trabajo de Tesis.

El extracto de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) se obtiene a partir de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. Los antioxidantes presentes en el mismo son ácido carnósico, carnosol, rosmanol, epirosmanol e isorosmanol. Actualmente, se encuentran en el mercado extractos concentrados desodorizados, los que no imparten sabor o color a los alimentos. Estos antioxidantes son más costosos que los de origen sintético y en general pueden requerir niveles de uso mayores, pero no son cuestionados desde el punto de vista toxicológico a las dosis recomendadas.

Cabe señalar que si bien el ácido carnósico y el carnosol son los responsables de más del 90% de la actividad antioxidante del romero (Aruoma y col., 1992), es necesario tener en cuenta que el primero de dichos compuestos es relativamente inestable. Schwarz y Ternes (1992) han estudiado la estabilidad del mismo, habiendo detectado su rápida conversión a carnosol, el cual se transforma subsiguientemente en rosmanol, 7-metilepirosmanol y epirosmanol, lo cual está facilitado por la exposición al oxígeno en presencia de luz y por el calentamiento del ácido carnósico en presencia de metanol. Debido a que muchos procesos comerciales para producir extractos de romero involucran tratamientos térmicos en

presencia de solventes podría esperarse una conversión significativa del ácido carnósico a carnosol. De esta manera, si bien pueden ser deseables mayores niveles de carnosol debido a su mayor estabilidad, es necesario considerar paralelamente su menor actividad.

El palmitato de ascorbilo es un derivado sintético del ácido ascórbico (**Figura 3.2**). El mismo ha sido utilizado en sistemas que contienen grasas ya que su solubilidad en medios hidrofóbicos es superior a la que presenta el ácido ascórbico y sus sales, siendo frecuentemente empleado en combinación con tocoferoles. El palmitato de ascorbilo es considerado GRAS, en Estados Unidos no se han fijado aún restricciones sobre sus niveles de uso. Este antioxidante es hidrolizado en el sistema digestivo para proveer ácidos ascórbico y palmítico, nutricionalmente disponibles (Johnson, 1995).

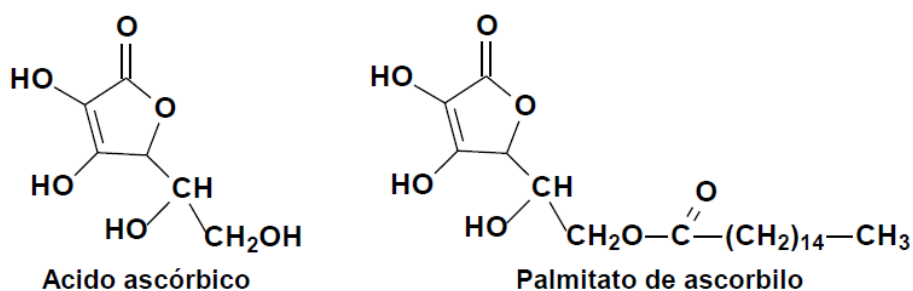


Figura 3.2. Estructura del ácido ascórbico y del palmitato de ascorbilo

El ácido ascórbico puede funcionar como dador de átomos de hidrógeno, siendo capaz de atrapar radicales libres convirtiendo directamente los hidroperóxidos en productos estables. En alimentos, el ácido ascórbico tiene múltiples funciones: puede interceptar el oxígeno singulete, desplazar el potencial redox de los sistemas alimentarios al rango reductor, actuar en forma sinérgica con agentes quelantes y regenerar antioxidantes primarios tales como el tocoferol (Reische y col., 2008). Los radicales tocoferilos son reducidos a tocoferol mediante el ácido ascórbico (**Figura 3.3**). Se ha sugerido que dicho compuesto no debe ser sometido a elevadas temperaturas ni a la exposición de la luz (Frankel, 2005).

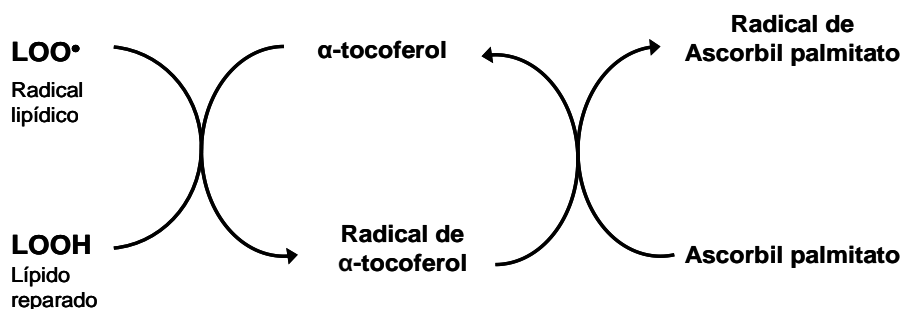


Figura 3.3. Mecanismo de regeneración de tocoferol por parte del ácido ascórbico

En virtud de las consideraciones realizadas se realizó un estudio sobre aceites mezcla, a fin de obtener un producto con un adecuado equilibrio de ácidos grasos esenciales ω -6: ω -3, utilizando diferentes proporciones de aceites de girasol y de chía. Para ello, se estudió la estabilidad oxidativa de estos aceites, con y sin la adición de los antioxidantes previamente mencionados, mediante su almacenamiento a dos niveles de temperatura normalmente utilizados, refrigeración ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$) y temperatura ambiente ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$), durante un periodo de 360 d.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Aceites y antioxidantes utilizados

Los aceites utilizados en este estudio fueron aceite de chía (Nutracéutica Sturla S.R.L., Argentina), obtenido por prensado en frío y aceite refinado de girasol (Molinos Río de la Plata S.A., Argentina)

El extracto de romero (GUARDIAN™ 08) y el palmitato de ascorbilo (GRINDOX™ 562) fueron suministrados por Danisco.

El extracto de romero utilizado (forma oleosoluble) es un antioxidante natural, compuesto por 4% (p/p) de diterpenos fenólicos y un vehículo constituido por mono- y diacilgliceroles; ésteres de ácido acético de mono y diacilgliceroles y propilenglicol. GRINDOX™ 562 es un antioxidante sintético, soluble en grasas y aceites constituido por una mezcla de 10% de palmitato de ascorbilo y 90% de un “carrier” compuesto por propilenglicol y monooleato de sorbitán como agente emulsificante.

Preparación de las muestras

Se prepararon mezclas de aceites de girasol y de chía (G-C 90:10, 80:20 p/p) mediante agitación durante 5 min para lograr su homogeneización. Posteriormente,

cada mezcla se fraccionó en tres porciones. Cada una de ellas fue adicionada con palmitato de ascorbilo (AP), extracto de romero (ER) y su mezcla AP:ER (1:1) en las siguientes concentraciones: 5000, 2000 y 2000:2000 ppm, respectivamente.

Las soluciones madre de palmitato de ascorbilo y extracto de romero se prepararon a partir de las correspondientes mezclas de aceite en una relación antioxidante:aceite 1:10. Las concentraciones previamente mencionadas fueron alcanzadas mediante el agregado de la cantidad correspondiente de solución madre en las mezclas de aceite G-C, logrando una masa final de 20 g. Dichos antioxidantes y sus concentraciones fueron seleccionados en base al estudio realizado por Ixtaina (2010) sobre la estabilidad oxidativa y la conservación del aceite de chía, teniendo en cuenta las normativas vigentes del Código Alimentario Argentino (CAA, 2008) y *Codex Alimentarius* (1999).

3.2.2. Análisis fisicoquímico de los aceites vegetales

3.2.2.1. Composición de ácidos grasos mediante cromatografía gaseosa (CG-FID)

La identificación y cuantificación de ácidos grasos (FA) de los aceites se llevó a cabo por cromatografía gaseosa, de acuerdo a los métodos IUPAC 2.301 y 2.302 (1992). Los aceites crudos (100 µL) fueron saponificados con 1 mL de solución de KOH 10% en metanol mediante reflujo a 85°C durante 45 min. El material insaponificable se extrajo con hexano. Luego de la acidificación con HCl, los ácidos grasos hidrolizados fueron extraídos de la fase metanólica con éter de petróleo y se metilaron con 1 mL de trifluoruro de boro (solución al 20% en metanol, Merck) en 1 mL de metanol a 60°C durante 45 min. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAME) se obtuvieron a partir de la fase metanólica con hexano.

Análisis por CG: la mezcla de FAME se analizó en un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard 6890, Canadá) equipado con detector de ionización de llama. La separación se realizó en una columna capilar Supelco 11090-02A Omegawax (30 m x 0.250 mm, diámetro interno 25 µm) a 175 – 220°C (3°C/min) empleando helio como gas portador (25,1 psi) y detector de llama a 260°C (Christie, 2003). El contenido de cada uno de los ácidos grasos identificados se expresó como valor porcentual en relación al contenido total de los mismos.

3.2.2.2. Determinación de Tocoferoles

El contenido de tocoferoles se determinó mediante una técnica cromatográfica basada en las normas IUPAC 2.432 (1992) y AOCS Ce8-89 (1998). La muestra de aceite se disolvió en hexano grado HPLC para su posterior separación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de fluorescencia. La concentración de tocoferoles se determinó por el método de estándar externo, utilizando α -tocoferol como referencia y se expresó en μg de tocoferol/g aceite.

La descripción del equipo y condiciones de trabajo se especifican en la **Tabla 3.1**. Los parámetros operativos se ajustaron con una solución de aceite de soja y de germen de trigo (1 g de cada uno de los aceites diluidos en 25 mL de fase móvil). Se identificaron los picos correspondientes a los tocoferoles en función de los tiempos de retención relativos y de patrones (α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol y δ -tocoferol).

Tabla 3.1. Condiciones operativas empleadas en la determinación de tocoferoles por cromatografía líquida de alta resolución

Cromatógrafo	HPLC Hewlett Packard Serie 1050 (Canadá)
Columna	Lichrosorb Si 60; 25 x 0,4 cm, 5 μm de tamaño de partícula
Detector	Fluorescencia Agilent 1100 Series; λ excitación: 290 nm; λ de emisión: 330 nm
Fase móvil	Isopropanol:hexano, 0,5:99,5 (v/v), filtrado y desgasificado
Velocidad de flujo	1,5 mL/min
Volumen de inyección	20 μl

Curva de calibración

Para la determinación de la curva de calibración se utilizó un estándar de α -tocoferol (Sigma T-3251, 95% de pureza), preparándose una solución de 10 mg de este compuesto diluidos en 100 mL de n-hexano. Para determinar la concentración real de esta solución, se tomó una alícuota de 10 mL y se colocó en un frasco color ámbar. El hexano se evaporó con una corriente de nitrógeno y al residuo resultante se le añadió 10 mL de metanol. Se midió la absorbancia a 292 nm en un espectrofotómetro UV. El valor obtenido se dividió por 0,0076, obteniendo como resultado la concentración de tocoferoles en $\mu\text{g/mL}$. A partir de la solución estándar

de α -tocoferol se prepararon disoluciones de diferentes concentraciones para realizar la curva de calibración.

Preparación y análisis de las muestras

Las muestras fueron preparadas en el momento de ser utilizadas para su análisis. Se pesaron aproximadamente 0,25 g de aceite en un matraz aforado de 5 mL y se llevó a volumen con hexano de calidad HPLC, previa homogeneización de la solución utilizando un baño ultrasónico. Los recipientes fueron envueltos con papel aluminio a fin de proteger las muestras de la luz.

Los resultados del análisis permitieron cuantificar el contenido de los tocoferoles presentes en el aceite. Este valor se expresó como μg de tocoferol/g de aceite, siendo calculado a partir de la **Ecuación 3.1**:

$$\text{Concentración de tocoferol } (\mu\text{g/g}) = [\text{Toc}] \times \frac{V}{m}$$

Ec. 3.1

donde:

Toc: concentración de tocoferol calculado a partir de la curva de calibración ($\mu\text{g/mL}$)

V: volumen de la muestra (mL)

m: peso del aceite (g)

3.2.2.3. Metales

La cuantificación del contenido de los metales calcio, magnesio, hierro y cobre fue realizada mediante espectroscopía de absorción atómica utilizando un espectrómetro GBC 902 AA (GBC Scientific Equipment, Australia). Las muestras fueron mineralizadas (550°C , 16 h) hasta obtener cenizas blancas. Las cenizas fueron diluidas en HCl concentrado y filtradas para llevarlas a medio líquido. Las muestras se analizaron por triplicado y los resultados fueron expresados en mg/kg aceite.

3.2.2.4. Ácidos grasos libres (FFA)

Se determinaron los ácidos grasos libres según la norma Ca 5a-40 AOCS (1998). Para ello se pesaron 6 g de aceite con una aproximación de 0,01 g y se colocaron en un erlenmeyer de 250 mL. El aceite se disolvió en una mezcla de 75 mL de alcohol etílico (95% v/v) caliente y se neutralizó con NaOH y 0,3 mL de solución de fenolftaleína (1% p/v). La concentración de ácidos grasos libres del

aceite se obtuvo mediante titulación de esta mezcla con una solución de NaOH 0,1 N y se expresó como porcentaje (p/p) de ácido oleico (**Ec. 3.5**).

$$\text{FFA} = \frac{V * N * 28,2}{m}$$

Ec. 3.5

donde:

V: volumen de NaOH utilizados en la titulación (mL)

N: normalidad del NaOH

m: masa de la muestra (g)

3.2.2.5. Valor de peróxido (PV)

El índice de peróxido (PV) se determinó según la norma Cd 8-53 AOCS (1998). Este método permite determinar todas aquellas sustancias que oxidan el yoduro de potasio en las condiciones del ensayo, en términos de miliequivalentes de peróxido por kg de grasa, las cuales son peróxidos o bien otros productos similares originados por la oxidación del aceite. La técnica consiste en una titulación iodométrica y se basa en la capacidad oxidante de los peróxidos para liberar yodo a partir del yoduro de potasio.

Se pesaron 5 g de aceite con una aproximación de 0,05 g y se colocaron en un erlenmeyer de 250 mL. Se agregaron 30 mL de solución de ácido acético: cloroformo (3:2 v/v) agitando vigorosamente hasta lograr su disolución. Se adicionaron 0,5 mL de solución saturada de yoduro de potasio, se agitó y luego se dejó en reposo en oscuridad durante 1 min. Posteriormente, se agregaron 30 mL de agua destilada y el yodo liberado se tituló, agitando continuamente, con solución 0,01 N de tiosulfato de sodio hasta la desaparición del color amarillo. Se adicionaron 0,5 mL de solución de almidón (1% p/v) y se continuó titulando hasta la desaparición del color azul. El índice de peróxido (expresado como miliequivalentes de peróxido/kg de aceite) se calculó en base a la siguiente ecuación:

$$PV = \frac{(S - B) * N * 1000}{PM}$$

Ec. 3.2

donde:

S: volumen de la solución de tiosulfato de sodio consumidos en la titulación de la muestra (mL)

B: volumen de la solución de tiosulfato de sodio consumidos en el blanco (mL)

N: normalidad de la solución de tiosulfato de sodio

PM: peso de la muestra (g)

3.2.2.6. Valor de *p*-anisidina (*p*-AV)

El valor de *p*-anisidina (*p*-AV) se define por convención como 100 veces la densidad óptica medida a $\lambda=350$ nm en una cubeta de 1,0 cm de solución conteniendo 1,0 g de aceite en 100 mL de mezcla de solvente y reactivo de acuerdo al método Cd 18-90 AOCS (1998). Este método determina la cantidad de aldehídos (principalmente 2-alquenal y 2,4-alcadienales) presentes en grasas animales y aceites vegetales mediante la reacción de los compuestos aldehídicos presentes en el aceite y la *p*-anisidina en una solución de ácido acético, midiendo posteriormente la absorbancia a 350 nm. Dicho valor se calcula según la **Ec. 3.3**.

$$p-AV = \frac{25 * (1,2 As - Ab)}{m}$$

Ec. 3.3

donde:

As: absorbancia de la fase lipídica después de la reacción con la *p*-anisidina

Ab: absorbancia de la fase lipídica antes de la reacción con la *p*-anisidina

m: masa de la muestra (g)

List y col. (1974) han informado una correlación altamente significativa entre el valor de *p*-anisidina y los resultados asociados a la aceptabilidad del sabor de aceites de soja para ensaladas.

Luego se calculó el valor total de oxidación (**Totox**), el cual se define como:

$$Totox = 2 * PV + p-AV$$

Ec. 3.4

Este valor brinda información sobre la historia de un aceite (reflejado a través del valor de *p*-anisidina) y de su estado presente (evidenciado mediante el PV). El

índice de peróxido permite evaluar los cambios primarios de la oxidación lipídica mientras que el valor de *p*-anisidina está asociado a los productos secundarios originados por la descomposición de los productos primarios presentes en cada sistema. Así, la determinación del valor Totox ha sido llevada a cabo extensivamente para estimar el deterioro oxidativo de diversos alimentos grasos (Rossell, 1983).

3.2.3. Estudio de la termoxidación de aceites mezcla girasol-chía mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica de análisis térmico, empleada en la determinación de temperaturas y flujos de calor asociados tanto a las transiciones de fase de la materia grasa (cristalización, fusión) como a las reacciones químicas de hidrólisis y oxidación, cuya evolución puede seguirse en función del tiempo y la temperatura. El perfil térmico de los aceites obtenidos mediante DSC está relacionado con diversas propiedades físicas y químicas de estos productos (Jiménez Márquez y col., 2007).

Debido a que la autooxidación lipídica es un proceso exotérmico, los métodos de análisis térmico son una herramienta valiosa para estudiar dicho proceso así como la termoestabilidad (Litwinienko y col., 1999). Asimismo, estudios no isotérmicos de DSC pueden brindar una interesante información debido a que es un método simple, rápido y sensible que requiere pequeñas cantidades de muestra (2-10 mg).

Para el análisis de la autooxidación de las muestras se utilizó un calorímetro diferencial de barrido Q 100 V9.8 Build 296 (TA Instruments, USA) controlado por el software TA Instruments Universal Analysis 2000/XP v. 4.2 E.

Se pesaron aproximadamente 5 mg de las diferentes muestras, las cuales fueron colocadas en una cápsula de aluminio abierta y sometidas a un tratamiento térmico a distintas velocidades de calentamiento ($\beta = 5, 10, 15$ y $20^\circ\text{C}/\text{min}$) realizando un barrido de 10 a 350°C , bajo un flujo de oxígeno de 100 mL/min. Las temperaturas extrapoladas correspondientes al inicio de la oxidación (T_e) así como las temperaturas máximas de los picos (T_{p1} y T_{p2}) fueron determinadas en cada caso de acuerdo al método Ozawa-Flynn-Wall (OFW).

3.2.4. Análisis sensorial

Se realizó la evaluación sensorial de los aceites mezcla G-C mediante ensayos de aceptabilidad sensorial empleando el método de la escala hedónica de 9 puntos, utilizando un panel de evaluadores no entrenados. Así, cuando se quiere saber cuál es el grado de aceptabilidad sensorial de un producto, se deben utilizar escalas hedónicas en la que el consumidor expresa su reacción subjetiva ante el producto, indicando si le gusta o le disgusta, si lo acepta o lo rechaza y la marca realizada sobre dicha escala por el consumidor se transforma en puntaje para el análisis de los resultados. A través de este proceso, la evaluación sensorial se transforma en una ciencia cuantitativa sujeta a análisis estadísticos, modelos, predicciones y fuertes teorías (Lawless y Heymann, 1998).

Los atributos mediante los cuales se evaluó el motivo de la preferencia o el rechazo de los aceites vegetales mezcla por parte del consumidor fueron apariencia, aroma, sabor y aceptabilidad global. En primer lugar se realizó un ensayo de aceptabilidad sensorial mediante el que se comparó el grado de aceptación del aceite de girasol y los aceites mezcla con el agregado de 10 y 20% de aceite de chía. Luego, se realizó otro ensayo de aceptabilidad sensorial evaluándose la presencia de los diferentes antioxidantes utilizados.

Preparación de las muestras

Como soporte para la degustación de los aceites se utilizaron cubos de papas de 1 cm³ hervidos durante 5 – 6 min en agua con 0,22% de sal. Una vez obtenidas las papas hervidas, las mismas fueron divididas en porciones de 500 g y se les adicionó 75 mL del aceite mezcla correspondiente. Luego las muestras se sirvieron a temperatura ambiente, en vasos de plástico de 120 mL de color amarillo a fin de enmascarar posibles diferencias de color entre los aceites. Para cada evaluador se prepararon 3 vasos con tres cubos adicionados con aceite en cada uno.

Desarrollo de la prueba

Durante el primer análisis sensorial se prepararon 150 muestras, de las cuales 50 contenían la muestra A: aceite puro de girasol, 50 la muestra B: aceite mezcla G-C 80:20 v/v y 50 la muestra C: aceite mezcla G-C 90:10 v/v. Las seis combinaciones posibles (ABC, ACB, BAC, BCA, CAB, CBA) fueron distribuidas al

azar entre los evaluadores. Las muestras se codificaron con tres números de tres dígitos obtenidos a partir de la tabla de números aleatorios.

Para el segundo análisis sensorial se prepararon 200 muestras, de las cuales 50 contenían G-C control (A); 50 G-C + AP (B); 50 G-C + ER (C) y 50 G-C + APER (D). Las 24 combinaciones posibles fueron asignadas al azar a los evaluadores. Las muestras se codificaron con cuatro números de tres dígitos obtenidos a partir de la tabla de números aleatorios.

El ensayo se llevó a cabo en las instalaciones del CIDCA en cuanto a la preparación de las muestras y a su evaluación. La prueba se efectuó entre las 11 y las 13 h. La degustación se realizó en grupos de 3 a 5 personas, ubicadas espaciadamente para evitar la comunicación entre los evaluadores.

A cada evaluador se le entregó una bandeja conteniendo las muestras junto con la planilla de evaluación (**Figura 3.4**). Se proporcionó agua potable a temperatura similar a la de las muestras, como agente neutralizante para el enjuague bucal entre muestras. A los evaluadores se les indicó que se concentraran en el aceite y examinaran primero los atributos de una muestra y luego recién los de las siguientes.

Figura 3.4. Planilla de evaluación confeccionada y utilizada en el análisis sensorial

ACEPTABILIDAD DE ACEITES POR ATRIBUTOS									
Nombre:.....					Fecha:/...../.....				
Evaluador N°:.....									
Utilizando la siguiente escala, por favor evalúe la aceptabilidad de cada atributo. Concéntrese en el aceite y no en las papas, evalúe todos los atributos de cada muestra y luego recién prueba la siguiente.									
MUESTRA N° 506									
	Disgusta				Gusta				
Apariencia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Aroma	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sabor	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Aceptabilidad global	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MUESTRA N° 821									
	Disgusta				Gusta				
Apariencia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Aroma	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sabor	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Aceptabilidad global	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MUESTRA N° 297									
	Disgusta				Gusta				
Apariencia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Aroma	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sabor	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Aceptabilidad global	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MUCHAS GRACIAS POR TU PARTICIPACIÓN!!!									

Análisis de resultados

A fin de determinar si existían diferencias significativas entre las muestras, se realizó un análisis de varianza y se compararon las medias por el método llamado Mínima Diferencia Significativa (MDS o LSD “Least Significant Difference”) de Fisher (nivel de confianza del 95%). El programa empleado fue Statgraphics Plus (Versión 4.0 para Windows, Manugistics Inc., USA, 1999).

3.2.5. Ensayo de almacenamiento

A fin de evaluar la estabilidad oxidativa de las mezclas de aceite G-C 90:10 y 80:20 p/p frente a la oxidación, se llevó a cabo un ensayo de almacenamiento a dos niveles de temperatura habitualmente empleadas por parte del consumidor, temperatura ambiente ($T=20\pm 2^{\circ}\text{C}$) y refrigeración ($T=4\pm 1^{\circ}\text{C}$), con el agregado de antioxidantes naturales (extracto de romero, ER) y sintéticos (palmitato de ascorbilo, AP). Los aceites mezcla G-C 90:10, 80:20 p/p con y sin la adición de antioxidantes fueron almacenadas en frascos de vidrio color ámbar (30 mL) para evitar la incidencia directa de la luz, en atmósfera de nitrógeno. La mitad de los frascos del lote fueron almacenados a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$, mientras que los restantes se colocaron en un cuarto de temperatura controlada a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante un periodo de 12 meses, realizándose periódicamente las respectivas tomas de muestra (c/ 30 d) para el posterior análisis de la estabilidad oxidativa por duplicado.

3.2.6. Ensayo acelerado de estabilidad oxidativa (Rancimat)

La estabilidad oxidativa de los aceites mezcla fue evaluada mediante un ensayo acelerado de estabilidad oxidativa determinando como parámetro el tiempo de inducción (t_i) en un equipo Rancimat 743 (Suiza) (Metrohm Ionanalytik, 2001) (AOCS Cd 12b-92, 1998). Así, se colocaron 5 g de aceite en el recipiente de reacción y sometieron a una temperatura de 98°C con burbujeo continuo de una corriente de aire a una velocidad de 20 L/h. Los productos de oxidación de naturaleza volátil fueron transportados por dicha corriente de aire a la celda de medición donde se dispersaron en una solución de muy baja conductividad (agua bidestilada). Las determinaciones fueron realizadas por duplicado.

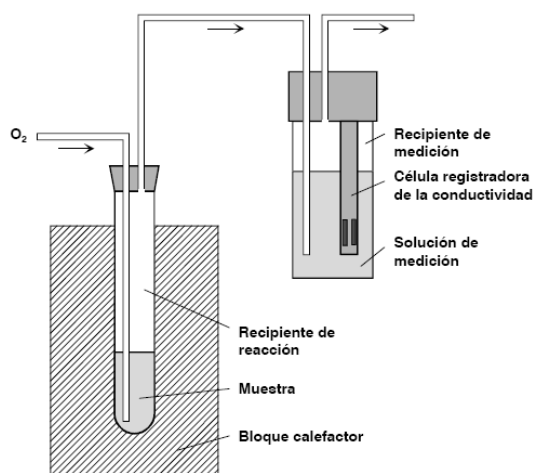


Figura 3.5. Esquema del equipo Rancimat 743 (Metrohm Ionanalytik, 2001).

De esta manera, mediante el registro de la evolución de la conductividad de esta solución en función del tiempo, se obtuvieron las curvas de oxidación, cuyo punto de inflexión se designa t_i y representa una magnitud característica que permite evaluar la estabilidad oxidativa de la muestra en cuestión (Metrohm Ionanalytik, 2001).

3.2.7. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos a $4\pm 1^\circ\text{C}$ y a $20\pm 2^\circ\text{C}$ fueron analizados en forma independiente. En cada caso, se realizaron las comparaciones de medias entre los distintos sistemas estudiados mediante un ANOVA unifactorial (factor de variación= sistema). Además, se realizó un ANOVA unifactorial a fin de realizar la comparación de medias para cada sistema a lo largo del tiempo (factor de variación = t).

Los datos fueron procesados utilizando el software Statgraphics Plus (Versión 4.0 para Windows, Manugistics Inc., USA, 1999).

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Caracterización de los aceites y de sus mezclas

El grado de insaturación de los aceites está determinado por su perfil de ácidos grasos, siendo más susceptibles a la oxidación a medida que aumenta el tenor porcentual de ácidos grasos insaturados y el número de dobles enlaces de su cadena hidrocarbonada (Padley, 1994).

La composición de ácidos grasos presentes en los aceites de girasol, chía y sus mezclas G-C con y sin el agregado de antioxidantes se presenta en la **Tabla 3.4**. Puede observarse la diferencia en el contenido de ácidos grasos de los diferentes aceites estudiados. El aceite refinado de girasol (obtenido por extracción sólido-líquido) tiene un perfil que consiste principalmente en ácidos linoleico (C 18:02, ω -6) (54,4%) y oleico (C 18:01, ω -9), el que representa el 36,6% del total de ácidos grasos. El aceite de chía (obtenido por prensado en frío) presenta un perfil constituido principalmente por ácido α -linolénico (C 18:03, ω -3), el cual representa ~ 65% de los ácidos grasos totales. Estos resultados son similares a los informados en la literatura (Ixtaina y col., 2012). Las mezclas G-C 80:20 y 90:10 p/p control contienen aproximadamente 17,4 y 9,0% de C18:3, lo cual corresponde a una relación ω -6: ω -3 de 2,7:1 y 5,3:1, respectivamente. Dichas relaciones ω -6: ω -3 se encuentran dentro de los valores recomendados por la FAO/OMS (1997).

Tabla 3.4. Composición de ácidos grasos (%) correspondientes a los diferentes sistemas constituidos por aceite de girasol, chía y sus mezclas con y sin el agregado de antioxidantes

Aceite	Ácidos grasos (%)					
	Palmítico 16:0	Estearico 18:0	Oleico 18:1 ω 9	Linoleico 18:2 ω 6	Linolénico 18:3 ω 3	Relación ω 6/ ω 3
Girasol	6,65 ^a	2,31 ^a	36,62 ^d	54,43 ^d	nd	nd
Chía	7,05 ^a	2,11 ^a	6,28 ^a	19,40 ^a	65,17 ^c	0,30 ^a
G-C 80:20 Control	7,56 ^a	2,28 ^a	26,06 ^b	46,71 ^b	17,40 ^b	2,68 ^b
G-C 80:20 AP	7,09 ^a	2,06 ^a	27,24 ^b	47,21 ^b	17,40 ^b	2,71 ^b
G-C 80:20 ER	6,58 ^a	2,16 ^a	26,45 ^b	47,07 ^b	17,76 ^b	2,65 ^b
G-C 80:20 AP:ER	7,78 ^a	2,30 ^a	26,24 ^b	47,04 ^b	16,64 ^b	2,82 ^b
G-C 90:10 Control	7,31 ^a	2,08 ^a	34,57 ^{cd}	48,01 ^{bc}	9,04 ^a	5,31 ^c
G-C 90:10 AP	6,88 ^a	2,30 ^a	32,11 ^{cd}	49,18 ^{bc}	9,54 ^a	5,15 ^c
G-C 90:10 ER	6,58 ^a	2,08 ^a	30,45 ^{bc}	50,91 ^{bcd}	9,99 ^a	5,10 ^c
G-C 90:10 AP:ER	6,44 ^a	2,43 ^a	30,66 ^{bc}	51,09 ^{bcd}	9,59 ^a	5,32 ^c

Valores promedio (n=2). Letras distintas en una columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre sistemas para cada ácido graso. nd: no detectado. AP: Palmitato de ascorbilo, ER: Extracto de romero.

En la **Tabla 3.5**, se observa el contenido de los distintos tipos de tocoferoles existentes en los sistemas estudiados. La concentración de tocoferoles totales correspondientes a los aceites estudiados se encontró en un rango de 411 a 502

mg/kg. Otros autores han informado rangos de 447 a 900 mg/kg de tocoferoles (principalmente α -tocoferol) en aceite de girasol a partir de híbridos tradicionales (Gunstone, 2002), con valores extremos que varían desde 389 hasta 1.873 mg/kg (Dolde y col., 1999; Nolasco y col., 2006). Por otra parte, datos bibliográficos informan en aceite de chía una variación de tocoferoles totales (principalmente γ -tocoferol) desde 238 hasta 427 mg/kg (Ixtaina y col., 2011).

El aceite de girasol posee mayoritariamente α -tocoferol (99,2%), presentando una menor protección frente a la oxidación respecto de otros aceites vegetales con mayores proporciones de β -, γ -, y/o δ -tocoferol. Estos últimos ejercen una mayor actividad antioxidante *in vitro*. El aceite crudo de chía presenta un alto contenido de γ -tocoferol, aproximadamente del 98,3% del tenor de tocoferoles totales. Las mezclas G-C 80:20 p/p, exhiben un contenido de γ -tocoferol entre 14 a 16% y de α -tocoferol > 81% respecto a los tocoferoles totales, mientras que las que contienen 10% de aceite de chía tienen asociado un contenido < 6% de γ -tocoferol y > 94% de α -tocoferol.

Tabla 3.5. Contenido de tocoferoles presentes en los aceites vegetales estudiados, con o sin antioxidantes

Aceite	Tocoferoles ($\mu\text{g/g}$)				Totales
	α	β	γ	δ	
Girasol	498,44 ^d	4,03 ^{ab}	nd	nd	502,47 ^d
Chía	nd	nd	403,81 ^c	7,11 ^b	410,92 ^a
G-C 80:20 Control	376,28 ^a	5,87 ^{bc}	71,85 ^b	nd	454,00 ^{bc}
G-C 80:20 AP	399,44 ^{ab}	7,33 ^c	78,05 ^b	3,11 ^a	487,93 ^{cd}
G-C 80:20 ER	376,42 ^a	6,27 ^{bc}	62,25 ^b	2,22 ^a	447,16 ^{abc}
G-C 80:20 AP:ER	375,52 ^a	5,33 ^{bc}	65,32 ^b	nd	446,16 ^{ab}
G-C 90:10 control	422,38 ^{bc}	1,62 ^a	9,55 ^a	nd	433,55 ^{ab}
G-C 90:10 AP	432,43 ^c	4,67 ^{bc}	21,85 ^a	nd	458,96 ^{bc}
G-C 90:10 ER	436,77 ^c	6,79 ^{bc}	27,34 ^a	nd	470,89 ^{bcd}
G-C 90:10 AP:ER	434,77 ^c	3,88 ^{ab}	19,18 ^a	nd	457,83 ^{bc}

Valores promedio (n=2). Letras distintas en una columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre sistemas para cada isómero de tocoferol y para tocoferoles totales, nd: no detectado

Los aceites utilizados como materia prima en el presente trabajo de Tesis presentaron bajos contenidos de ácidos grasos libres, PV y *p*-AV, lo que indica una buena calidad de los mismos, como puede observarse en la **Tabla 3.6**.

El aceite de girasol presentó el valor inicial de tiempo de inducción (t_i) más elevado, mientras que el aceite de chía mostró el menor valor de este parámetro debido a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados. Los aceites mezcla G-C 80:20 y 90:10 p/p mostraron valores iniciales de t_i intermedios en función del contenido de AGPI. Las trazas de metales, en particular iones cobre y hierro, constituyen agentes prooxidantes, por lo que no es deseable su presencia en aceites. El contenido de ambos metales en las mezclas de aceite fueron inferiores a los informados en la literatura para los aceites de chía (Ixtaina y col., 2011).

Tabla 3.6. Características físico químicas de aceites de girasol, chía y sus mezclas G-C 80:20 y 90:10 p/p

	Aceite de Girasol	Aceite de Chía	Aceite mezcla G-C 80:20 p/p	Aceite mezcla G-C 90:10 p/p
Acidos grasos libres (% ácido oleico)	0,06 ± 0,01	0,55 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,10 ± 0,01
Metales (mg/kg)				
Cu	0,01 ± 0,00	0,19 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,00
Fe	0,64 ± 0,05	0,30 ± 0,01	0,28 ± 0,06	0,61 ± 0,00
PV (meq O₂/kg)	1,5 ± 0,2	0,8 ± 0,1	1,5 ± 0,3	1,0 ± 0,2
<i>p</i>-AV	5,1 ± 0,2	0,5 ± 0,1	3,6 ± 0,1	4,5 ± 0,2
tiempo de inducción (h)	13,0 ± 0,3	3,0 ± 0,1	7,6 ± 0,3	9,2 ± 0,4

Valores promedio ± DS de dos lotes independientes (n=2) nd: no detectado

3.3.2. Estudio de la termoxidación de los aceites mezcla mediante calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Varios autores han informado que la determinación de la temperatura correspondiente al inicio del proceso de oxidación (T_e) es una herramienta útil para evaluar el proceso oxidativo así como la eficiencia de diversos compuestos antioxidantes (Litwinienko y col., 1999).

En virtud de ello, se llevó a cabo un estudio de la autooxidación de los aceites de girasol, chía y sus mezclas G-C con y sin la adición de antioxidantes mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Las curvas de DSC obtenidas a diversas velocidades de calentamiento de los diferentes aceites estudiados en presencia de oxígeno (100 mL/min) se muestran en la **Figura 3.6**.

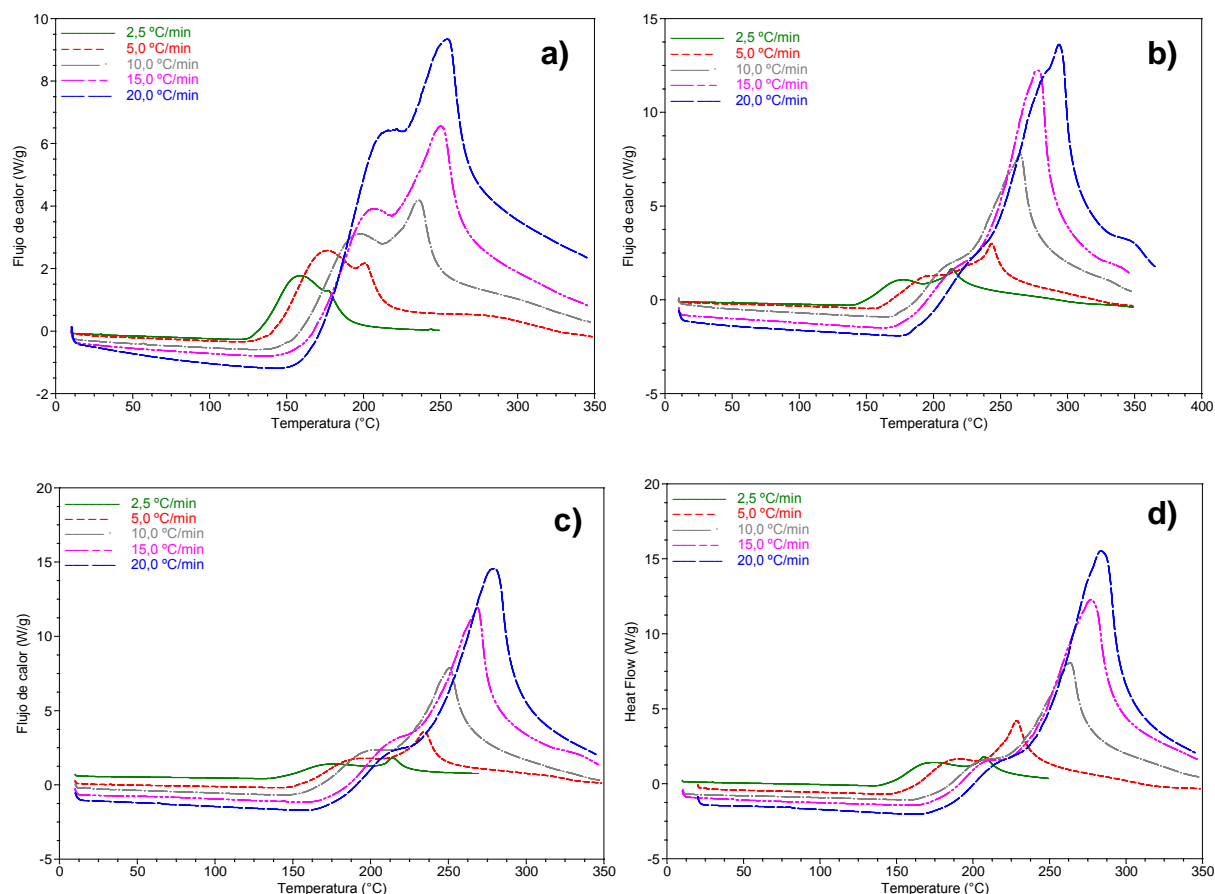


Figura 3.6. Curvas de DSC correspondientes a la termoxidación de (a) aceite de chía, (b) aceite de girasol, (c) aceite mezcla G-C 80:20 p/p y (d) aceite mezcla G-C 90:10 p/p obtenidas a diversas velocidades de calentamiento ($\beta = 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$).

Como puede observarse en la **Figura 3.6**, un aumento en la velocidad de calentamiento produce un desplazamiento en los valores de la temperatura extrapolada del inicio (T_e) y de las temperaturas máximas de pico (T_{p1} y T_{p2}) asociadas a los procesos exotérmicos observados para todos los sistemas estudiados.

En dichos termogramas pueden observarse dos picos principales, más o menos pronunciados según la composición del aceite, relacionados con la ocurrencia de dos procesos principales. Así, el primer pico de las curvas de

oxidación no isotérmicas de DSC se debe a la formación de peróxidos, mientras que el segundo está asociado a la descomposición de dichos compuestos lábiles e inestables en otros productos. Estos resultados se basan en los estudios llevados a cabo por Litwinienko y Kasprzycka-Guttman (1998) en aceite de mostaza, quienes han examinado diversos tipos de reacciones complejas las cuales podrían tener lugar en el proceso oxidativo, llegando a la conclusión que las mismas serían de tipo secuencial con inicio autocatalítico, lo cual puede representarse mediante el esquema presentado en la **Ec. 5.13**:



donde el primer paso, $a \rightarrow b$, es el proceso catalizado por b . Estos autores han encontrado un muy buen ajuste entre las temperaturas características (T_e , T_{p1} y T_{p2}) calculadas y las determinadas experimentalmente para este mecanismo de reacción. Dicha interpretación fue confirmada experimentalmente por estudios similares con aceite de chía (Ixtaina y col., 2012).

En la **Figura 3.7** se muestran las curvas de oxidación obtenidas a una velocidad de calentamiento ($\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$), para los aceites de girasol, chía y sus mezclas G-C sin agregado de antioxidantes. Podemos observar que la morfología de las curvas de DSC es diferente según la composición de ácidos grasos asociada a los aceites investigados. Cabe señalar que las curvas de DSC obtenidas para el aceite de chía presentaron la mayor altura del primer pico debido a su elevado contenido de ácido α -linolénico, un perfil análogo se observó en aceite de lino (Litwinienko, 1999; 2007). Las curvas de oxidación para el aceite de girasol, presentaron el primer pico menos pronunciado en comparación con el correspondiente al aceite de chía, mientras que las mezclas G-C presentaron alturas de picos intermedias.

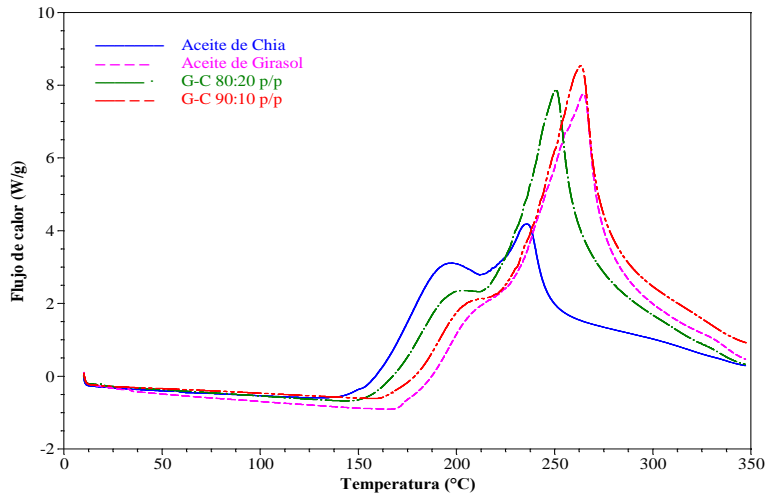


Figura 3.7. Curvas de DSC correspondientes a la termoxidación de aceites de girasol, chía y sus mezclas G-C a una velocidad de calentamiento de $\beta = 10 \text{ }^\circ\text{C/min}$.

Las curvas de DSC correspondientes a los aceites mezcla G-C con y sin la adición de antioxidantes para una velocidad de calentamiento ($\beta = 10,0^\circ\text{C/min}$) se muestran en la **Figura 3.8**. Como puede observarse, los termogramas obtenidos para los diferentes tratamientos con y sin antioxidantes presentaron curvas similares si bien los valores extrapolados de T_e , T_{p1} y T_{p2} fueron diferentes.

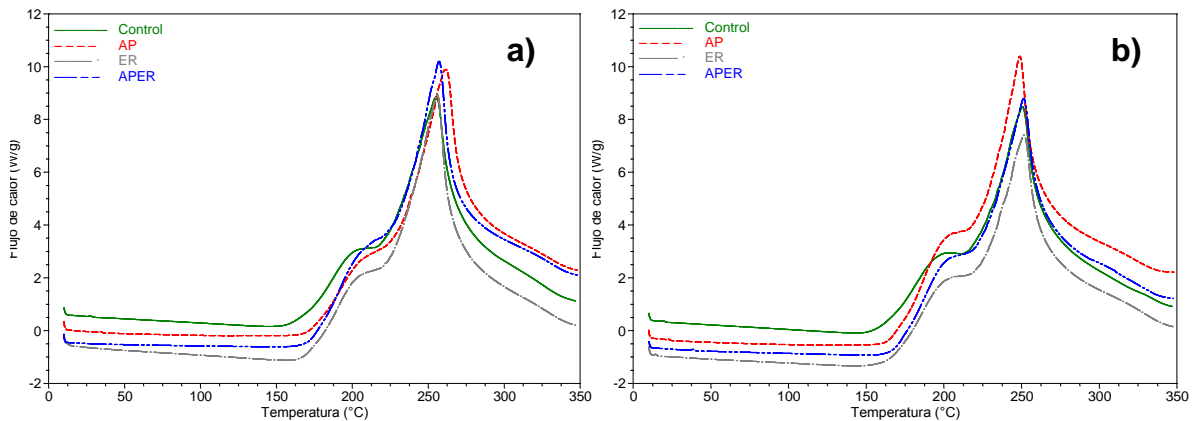


Figura 3.8. Curvas de DSC correspondientes a la termoxidación de aceites mezcla G-C **(a)** 80:20 y **(b)** 90:10 con y sin el agregado de antioxidantes a una velocidad de calentamiento ($\beta = 10 \text{ }^\circ\text{C/min}$).

La evaluación de la estabilidad de los aceites vegetales estudiados a través de los parámetros cinéticos debe considerar las temperaturas del inicio del proceso (T_e) y la del primer pico (T_{p1}), ya que estas dos temperaturas características están relacionadas directamente con el proceso de autooxidación. Algunos autores sugieren desde el punto de vista analítico, que el inicio del proceso de autooxidación (T_e) es el punto más adecuado para el cálculo de los parámetros cinéticos de la

autooxidación debido a que el primer y segundo pico exotérmicos pueden superponerse (Ulkowski y col., 2005).

Las temperaturas extrapoladas del inicio (T_e) y las temperaturas máximas del primer y segundo pico (T_{p1} y T_{p2}) permitieron el cálculo de las energías de activación (E_a) y los factores pre-exponenciales (A) en el estudio de la termoxidación de los aceites a través del método de Ozawa-Flynn-Wall (OFW) (**Ec. 3.14**) (Ozawa, 1965, 1970; Flynn y Wall, 1966). La ventaja de la aplicación del método OFW radica en que la energía de activación puede ser determinada independientemente del modelo cinético de la reacción (Flynn y Wall, 1966, Ozawa, 1970).

$$\log \beta = aT_p^{-1} + b \quad \text{Ec. 3.14}$$

De acuerdo a dicho método, cuando se grafica $\log \beta$ versus T^{-1} , se puede obtener una línea recta con pendiente $a = -0,4567E_a/R$ y ordenada al origen $b = -2,315 + \log(AE_a/R)$. Así, es posible calcular la energía de activación E_a y A a partir de las siguientes ecuaciones:

$$E_a = -2,19R \frac{d \log \beta}{dT^{-1}} \quad \text{Ec. 3.15}$$

$$A = \frac{\beta E_a \exp \left[\frac{E_a}{RT} \right]}{RT^2} \quad \text{Ec. 3.16}$$

donde:

E_a : energía de activación de Arrhenius (kJ/mol)

R : constante de los gases (kJ/mol °K)

T : temperatura absoluta (°K)

Así, las energías de activación de Arrhenius calculadas a partir de T_e y T_{p1} pueden ser útiles para estudiar la susceptibilidad de los aceites a la oxidación así como para la determinación de los efectos de diversos aditivos, tales como los compuestos antioxidantes.

A partir de las temperaturas extrapoladas (T_e , T_{p1} y T_{p2}) de los termogramas de los aceites mezcla G-C con y sin la adición de antioxidantes se calcularon los parámetros cinéticos (**Tablas 3.7 y 3.8**). Los valores de E_a calculados a partir de T_e y T_{p1} resultaron mayores que la energía de activación calculada a partir del segundo pico (T_{p2}) para todos los sistemas ensayados. El valor de E_a calculado a partir de T_e

del aceite de chía fue $69,5 \pm 1,2$ kJ/mol, similar al informado por Ixtaina y col. (2012) y a la del ácido α -linolénico puro (62-70 kJ/mol) (Litwinienko, 2007), que es el ácido graso más abundante en dicho aceite. Por otra parte, la E_a para el aceite de girasol ($106,3 \pm 3,4$ kJ/mol) fue mayor que la obtenida para el aceite de chía y similar a la del aceite de maíz (104,3 kJ/mol) (Litwinienko y col., 1995). Este parámetro cinético indica que la estabilidad a la oxidación del aceite de girasol es mayor que la del aceite de chía, lo que puede relacionarse con el menor contenido de AGPI presente en el aceite de girasol.

Los valores de E_a y A obtenidos a partir de T_e fueron superiores a los calculados a partir T_{p1} y T_{p2} para todos los aceites evaluados. Puede observarse que los parámetros cinéticos calculados a partir de T_e para las mezclas de aceite G-C 80:20 p/p fueron inferiores que los calculados para las mezclas 90:10 p/p debido a la mayor concentración de ácidos grasos poliinsaturados correspondiente a los primeros (**Tablas 3.7 y 3.8**). Para ambos aceites mezcla G-C (80:20 y 90:10 p/p) estudiados, la adición de ER y AP:ER aumentó la E_a y los valores de A con respecto a los sistemas control ($p \leq 0,05$). Este hecho podría estar asociado a la capacidad de estos compuestos para retrasar el proceso de autooxidación. En el caso del aceite G-C 80:20 p/p, la adición de AP, AP:ER y ER produjo un aumento en la E_a de 4, 10 y 15% vs. el sistema control, respectivamente. En cuanto a las mezclas de aceite G-C 90:10 p/p, estos cambios fueron del 5, 9 y 14%, respectivamente. Por lo tanto, de acuerdo con el estudio DSC, el ER mostró la mejor actividad antioxidante.

Tabla 3.7. Parámetros estadísticos y cinéticos calculados a partir de T_e , T_{p1} y T_{p2} para aceite mezcla G-C 80:20 p/p con y sin la adición de antioxidantes mediante el método Ozawa-Flynn-Wall (OFW)

	T_e	T_{p1}	T_{p2}		T_e	T_{p1}	T_{p2}
G-C 80:20 p/p				G-C 80:20 p/p + 2000 ppm AP			
Pendiente (a)	-4,370±0,110 ^c	-4,224±0,377 ^a	-3,338±0,358 ^a	Pendiente (a)	-4,564±0,054 ^b	-4,475±0,265 ^a	-2,954±0,093 ^a
Constante (b)	11,170±0,039 ^a	9,951±0,807 ^a	7,329±0,684 ^a	Constante (b)	11,414±0,118 ^{ab}	10,418±0,596 ^a	6,604±0,179 ^a
R²	0,962	0,972	0,984	R²	0,985	0,982	0,995
E_a (kJ/mol)	79,6±0,2 ^a	76,9±0,9 ^a	60,8±6,5 ^a	E_a (kJ/mol)	83,1±1,0 ^{ab}	81,5±4,8 ^a	53,8±1,7 ^a
A (s⁻¹)	3,19x10 ¹² ±2,78x10 ^{11a}	1,98x10 ¹¹ ±4,36x10 ^{10a}	9,59x10 ⁹ ±8,56x10 ^{8a}	A (s⁻¹)	5,44x10 ¹² ±1,40x10 ^{12b}	8,09x10 ¹¹ ±8,35x10 ^{10a}	1,33x10 ⁸ ±4,95x10 ^{7a}
G-C 80:20 p/p + 5000 ppm ER				G-C 80:20 p/p + 2000:2000 ppm AP:ER			
Pendiente (a)	-5,027±0,079 ^a	-4,861±0,041 ^a	-3,061±0,038 ^a	Pendiente (a)	-4,823±0,045 ^{ab}	-4,297±0,316 ^a	-2,959±0,063 ^a
Constante (b)	12,467±0,162 ^c	11,262±0,126 ^a	6,834±0,086 ^a	Constante (b)	11,952±0,117 ^b	10,024±0,644 ^a	6,615±0,099 ^a
R²	0,993	0,978	0,994	R²	0,979	0,978	0,996
E_a (kJ/mol)	91,5±1,4 ^{bc}	88,5±0,7 ^a	55,7±0,7 ^a	E_a (kJ/mol)	87,8±0,8 ^b	78,2±5,76 ^a	53,9±1,14 ^a
A (s⁻¹)	5,67x10 ¹³ ±1,98x10 ^{13c}	3,62 x10 ¹² ±1,00x10 ^{12a}	2,12x10 ⁸ ±3,93x10 ^{7a}	A (s⁻¹)	1,78x10 ¹³ ±4,59x10 ^{12c}	3,57x10 ¹¹ ±1,17x10 ^{11a}	1,33x10 ⁸ ±2,72x10 ^{7a}

Valores promedio ± DS (n=2). Letras distintas en cada parámetro para una Temperatura indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los sistemas

Tabla 3.8. Parámetros estadísticos y cinéticos calculados a partir de T_e , T_{p1} y T_{p2} para aceite mezcla G-C 90:10 p/p con y sin la adición de antioxidantes mediante el método Ozawa-Flynn-Wall (OFW)

	T_e	T_{p1}	T_{p2}		T_e	T_{p1}	T_{p2}
G-C 90:10 p/p			G-C 90:10 p/p + 2000 ppm AP				
Pendiente (a)	-4,595±0,020 ^c	-4,425±0,049 ^a	-2,987±0,090 ^b	Pendiente (a)	-4,835±0,109 ^{bc}	-4,142±0,109 ^a	-3,886±0,176 ^a
Constante (b)	11,628±0,054 ^a	10,345±0,107 ^a	6,636±0,183 ^a	Constante (b)	11,949±0,221 ^{ab}	9,647±0,207 ^a	8,259±0,329 ^a
R²	0,992	0,990	0,991	R²	0,966	0,986	0,961
E_a (kJ/mol)	83,7±0,4 ^a	80,6±0,9 ^a	54,4±1,6 ^a	E_a (kJ/mol)	88,0±2,0 ^{ab}	75,4±2,0 ^a	70,7±3,2 ^b
A (s⁻¹)	8,75x10 ¹² ±1,04x10 ^{12a}	4,78x10 ¹¹ ±1,11x10 ^{11a}	1,42x10 ⁸ ±5,40x10 ^{7a}	A (s⁻¹)	1,84x10 ¹³ ±8,59x10 ^{12ab}	1,06x10 ¹¹ ±4,63x10 ^{10a}	4,98x10 ⁹ ±5,40x10 ^{8a}
G-C 90:10 p/p + 5000 ppm ER			G-C 90:10 p/p + 2000:2000 ppm AP:ER				
Pendiente (a)	-5,250±0,015 ^a	-4,411±0,256 ^a	-3,370±0,393 ^{ab}	Pendiente (a)	-5,017±0,053 ^{ab}	-4,723±0,120 ^a	-3,030±0,100 ^{ab}
Constante (b)	12,880±0,017 ^c	10,195±0,191 ^a	7,312±0,746 ^a	Constante (b)	12,301±0,095 ^b	10,901±0,276 ^a	6,711±0,033 ^a
R²	0,978	0,981	0,992	R²	0,994	0,995	0,975
E_a (kJ/mol)	95,6±0,27 ^c	80,3±4,7 ^a	61,4±7,2 ^{ab}	E_a (kJ/mol)	91,3±1,0 ^{bc}	86,0±2,2 ^a	55,2±0,2 ^{ab}
A (s⁻¹)	1,36x10 ¹⁴ ±4,94x10 ^{12c}	4,54x10 ¹¹ ±4,33x10 ^{10a}	9,86x10 ⁸ ±1,13x10 ^{8a}	A (s⁻¹)	3,80x10 ¹³ ±7,88x10 ^{12b}	1,74x10 ¹² ±9,98x10 ^{11a}	1,60x10 ⁸ ±4,56x10 ^{5a}

Valores promedio ± DS (n=2). Letras distintas en cada parámetro para una Temperatura indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los sistemas

3.3.3. Evaluación sensorial

Ensayo de aceptabilidad

El primer ensayo sensorial se llevó a cabo para conocer si las formulaciones de los aceites mezcla G-C 90:10 y 80:20 v/v eran aceptadas por los consumidores. En la **Tabla 3.9** se muestran los resultados obtenidos, donde puede observarse que las diferentes formulaciones registraron valores promedio localizados entre los puntos hedónicos 6,6 y 7,4. Así, los diferentes aceites evaluados presentaron una buena aceptabilidad en todos los atributos, no habiéndose registrado diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre los diferentes aceites estudiados.

Tabla 3.9. Puntaje promedio obtenido por cada atributo en el primer ensayo de aceptabilidad sensorial

	Apariencia	Aroma	Sabor	Aceptabilidad global
Girasol	7,2 ± 1,6 ^a	7,2 ± 1,4 ^a	6,9 ± 1,6 ^a	7,1 ± 1,5 ^a
G-C 80:20	7,4 ± 1,4 ^a	7,0 ± 1,5 ^a	6,9 ± 1,8 ^a	7,1 ± 1,5 ^a
G-C 90:10	7,2 ± 1,6 ^a	6,6 ± 1,8 ^a	6,8 ± 1,7 ^a	6,9 ± 1,7 ^a

Valores promedio ± DS (n = 50). Para cada atributo, valores promedio seguidos de letras idénticas no difieren significativamente entre sí ($p \geq 0,05$)

Debido a la buena aceptación del aceite mezcla G-C 80:20 v/v obtenida a partir del primer análisis sensorial, el mismo fue seleccionado para llevar a cabo la segunda evaluación. El objetivo del siguiente análisis sensorial fue determinar el grado de aceptación de los diferentes antioxidantes utilizados (AP, ER y AP:ER).

La **Tabla 3.10** presenta los resultados obtenidos, evidenciando que no existen diferencias significativas ($p \geq 0,05$) en los atributos apariencia y aroma entre las diferentes muestras estudiadas, mientras que para el sabor y aceptabilidad las muestras control y con AP presentaron significativamente una mayor aceptabilidad que aquéllas con ER y AP:ER ($p \leq 0,05$).

Tabla 3.10. Puntaje promedio obtenido para cada atributo en el segundo ensayo de aceptabilidad sensorial

G-C 80:20 p/p	Apariencia	Aroma	Sabor	Aceptabilidad global
Control	7,2 ± 1,4 ^a	6,8 ± 1,6 ^a	7,0 ± 1,4 ^b	7,1 ± 1,5 ^b
AP	7,0 ± 1,7 ^a	6,8 ± 1,8 ^a	6,9 ± 1,8 ^b	6,9 ± 1,6 ^b
ER	6,9 ± 1,8 ^a	6,4 ± 1,9 ^a	5,7 ± 2,3 ^a	5,9 ± 2,1 ^a
AP:ER	7,0 ± 1,6 ^a	6,4 ± 1,6 ^a	6,0 ± 2,3 ^a	6,1 ± 1,9 ^a

Valores promedio ± DS (n = 50). Para cada atributo, valores promedio seguidos de letras idénticas no difieren significativamente entre sí ($p \geq 0,05$)

3.3.4. Almacenamiento de los aceites mezcla girasol-chía

La predicción de la estabilidad oxidativa en aceites podría relacionarse con la vida útil del producto. En este sentido, es importante señalar que las condiciones del ensayo utilizadas deben ser similares a las de su almacenamiento (Frankel, 2005). Ixtaina y col. (2012) evaluaron la efectividad de diferentes antioxidantes naturales y sintéticos y sus concentraciones sobre el deterioro oxidativo del aceite de chía bajo distintas condiciones de almacenamiento. Estos resultados han permitido la selección de los antioxidantes y concentraciones más eficientes, los cuales fueron aplicados en el presente trabajo de Tesis.

En las **Figuras 3.9 a 3.14** se muestra la evolución de PV, *p*-AV y Totox en el seguimiento de la oxidación lipídica durante el periodo de almacenamiento a 4±1°C y 20±2°C, correspondiente a los distintos sistemas estudiados. El análisis comparativo de los mismos permitió evidenciar que la temperatura de almacenamiento es un factor de gran relevancia en la evolución del proceso oxidativo, de manera similar a los resultados informados por Ixtaina y col. (2012) para el aceite de chía.

La **Figura 3.9** permite visualizar la evolución de los valores de peróxidos de los diferentes aceites almacenados a 4±1°C, observándose que los aceites mezcla G-C tratados con diferentes antioxidantes presentaron PV ≤ 10,0 meq O₂/kg aceite durante el periodo de almacenamiento estudiado. Dicho valor es el límite máximo establecido por el Código Alimentario Argentino para diversos aceites refinados como apto para el consumo humano (Código Alimentario Argentino, 2008) y además, es considerado como el límite de aceptabilidad de aceites vegetales que contienen ácido linolénico como principal ácido graso (Frankel, 2005).

Los aceites mezcla G-C sin adición de antioxidantes alcanzaron dicho límite a partir de 150 d de almacenamiento a $4\pm 1^\circ\text{C}$. Ambos sistemas control mostraron incrementos significativos ($p \leq 0,05$) con respecto a las mezclas de aceite con la adición de antioxidantes a partir de los 30 d. Los aceites mezcla G-C 90:10 y 80:20 p/p con la adición de AP:ER presentaron los niveles más bajos de PV, siendo significativamente inferiores ($p \leq 0,05$) que los demás sistemas durante todo el periodo estudiado. Una tendencia similar se observó en los aceites adicionados con AP, los cuales no mostraron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) con los aceites mezcla con AP:ER hasta los 180 y 270 d para los aceites mezcla G-C 90:10 y 80:20 p/p, respectivamente (**Figura 3.9**).

En contraste, durante el almacenamiento a $20\pm 2^\circ\text{C}$, se alcanzó el límite legal entre 120 y 240 d de almacenamiento en el orden siguiente: mezclas de aceite control (120 d), aceite mezcla con ER (150 d), aceite mezcla con AP (180 d 90:10 p/p, 210 d 80:20 p/p), aceites con AP:ER para ambas mezclas de aceite (240 d) (**Figura 3.10**). Los valores de PV correspondientes a los aceites mezcla G-C 90:10 y 80:20 p/p adicionados con AP:ER presentaron los menores incrementos después de 360 d de almacenamiento, siendo AP:ER el antioxidante más eficiente para retardar la formación de hidroperóxidos a temperatura ambiente (**Figura 3.10**).

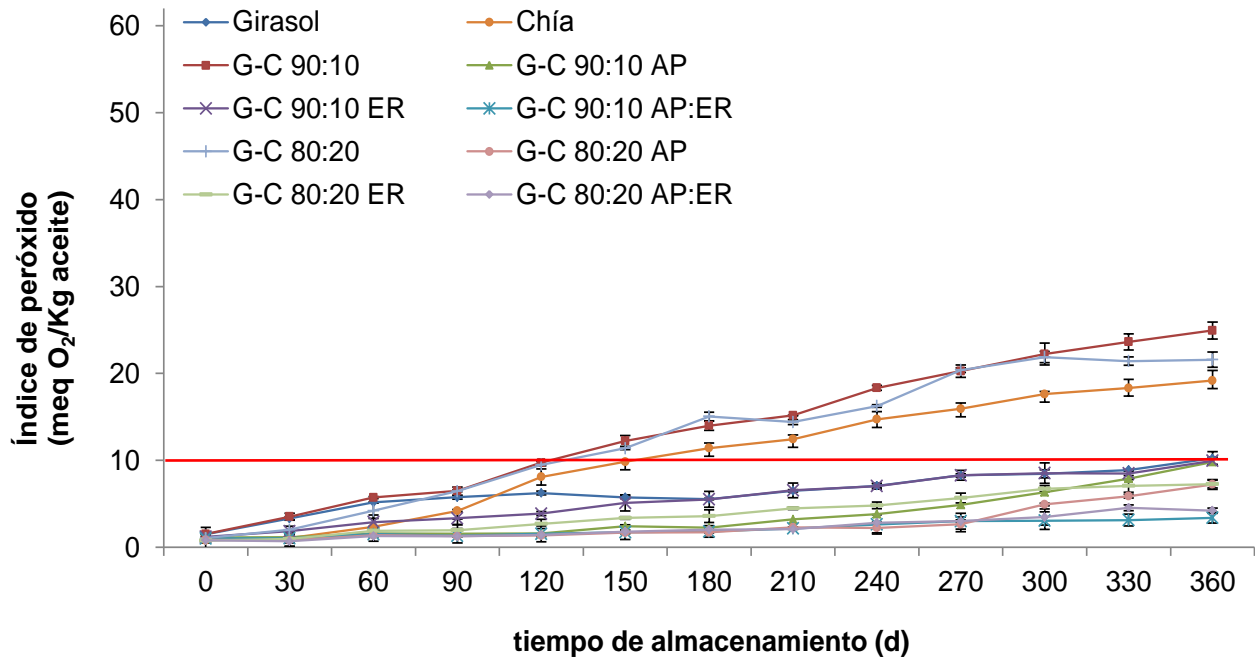


Figura 3.9. Evolución del índice de peróxido (PV) durante el almacenamiento de los aceites de girasol, chía y sus mezclas a $T=4\pm 1^{\circ}\text{C}$. Las barras verticales indican la desviación estándar.

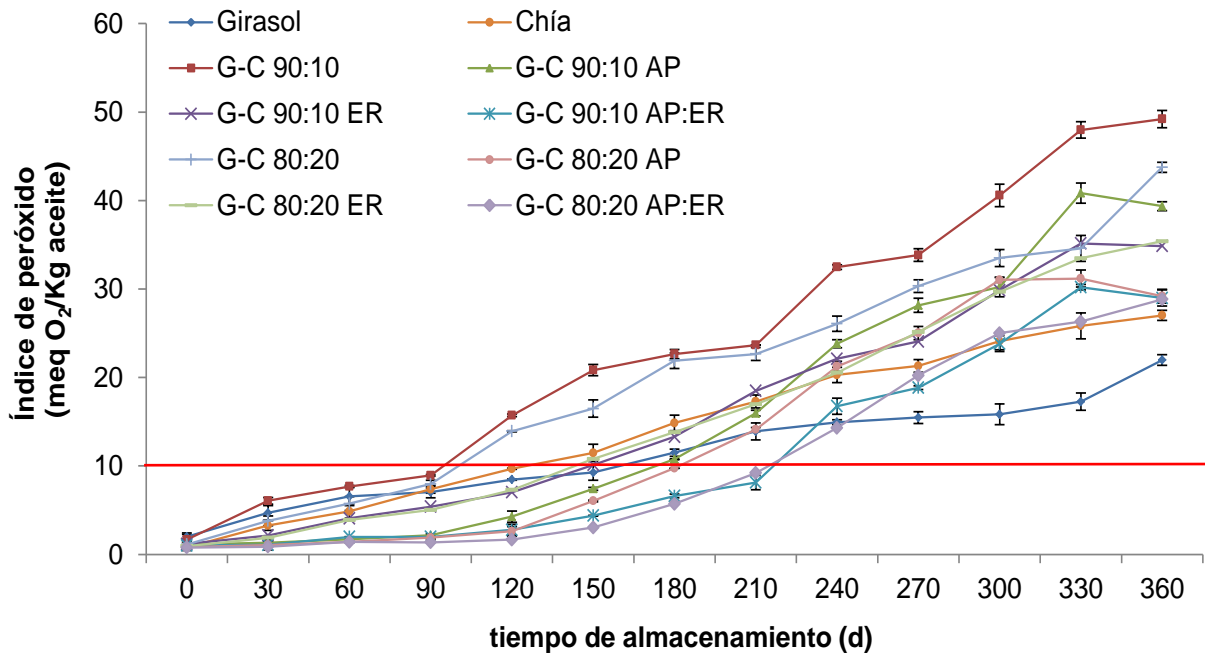


Figura 3.10. Evolución del índice de peróxido (PV) durante el almacenamiento de aceites de girasol, chía y sus mezclas G-C a $T=20\pm 2^{\circ}\text{C}$. Las barras verticales indican la desviación estándar.

El valor de *p*-anisidina (*p*-AV) es muy útil para conocer la historia del aceite, Grompone (1991) ha demostrado que el periodo de inducción depende marcadamente del *p*-AV del aceite de partida.

Con respecto al *p*-AV a tiempo inicial ($t = 0$), el aceite de girasol mostró el valor más alto ($5,1 \pm 0,2$), mientras que el de chía el menor ($0,5 \pm 0,1$). Las mezclas de aceites G-C 90:10 y 80:20 p/p registraron valores intermedios ($4,5 \pm 0,2$ y $3,6 \pm 0,1$, respectivamente). El *p*-AV de los aceites fue bajo durante el almacenamiento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ (**Figura 3.11**), mientras que a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ todos los sistemas exhibieron importantes cambios en función del tiempo de almacenamiento (**Figura 3.12**). El aceite de chía evidenció la mayor formación de productos secundarios de la oxidación para ambas temperaturas de almacenamiento, lo cual puede deberse al elevado contenido de AGPI. Por otra parte, los aceites mezcla G-C 90:10 y 80:20 p/p con AP:ER registraron los menores *p*-AV para ambas temperaturas estudiadas.

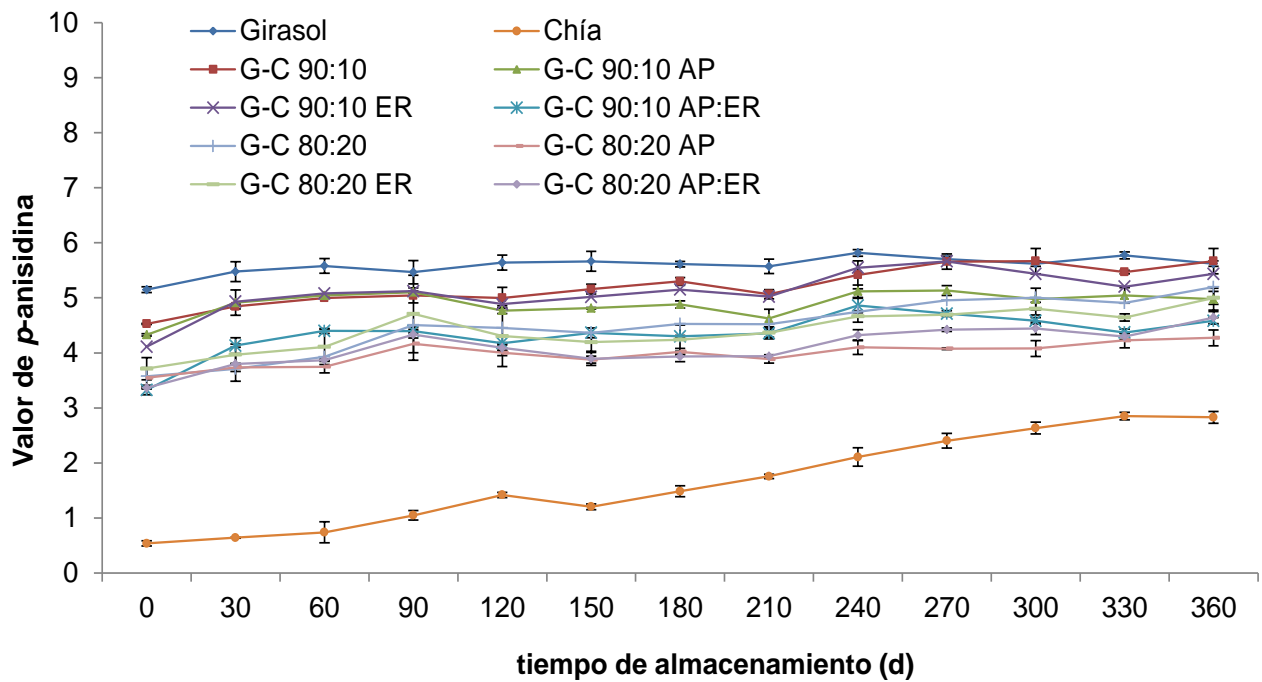


Figura 3.11. Evolución de *p*-AV durante el almacenamiento de aceites de girasol, chía y sus mezclas a $T=4\pm 1^{\circ}\text{C}$. Las barras verticales indican la desviación estándar

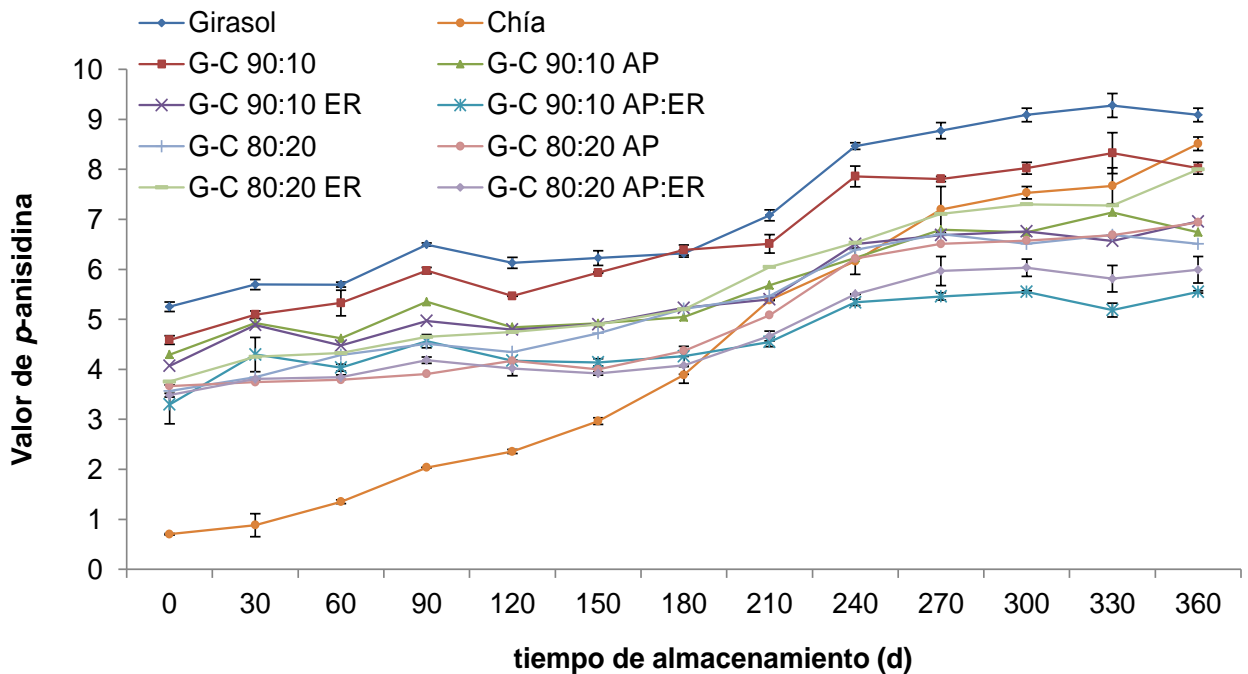


Figura 3.12. Evolución de *p*-AV durante el almacenamiento de aceites de girasol, chía y sus mezclas a $T=20\pm 2^{\circ}\text{C}$. Las barras verticales indican la desviación estándar

La evolución del valor Totox brinda una información útil con respecto al progreso de la formación de los productos primarios y secundarios de la oxidación.

La evolución de la oxidación total a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ está principalmente asociada a los productos de oxidación primarios (hidroperóxidos) ya que los productos secundarios de oxidación se incrementaron en menor grado. Los valores Totox de los aceites mezcla almacenados a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ con agregado de antioxidantes fueron $\leq 30,0$; mientras que los sistemas control G-C (90:10, 80:20) mostraron elevados niveles de Totox (48,4 y 55,5; respectivamente) (**Figura 3.13**). A $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ todos los sistemas estudiados mostraron altos niveles de oxidación total, asociados a la importante evolución registrada para los productos primarios y secundarios de oxidación. Los aceites mezcla G-C con diferentes antioxidantes presentaron valores Totox entre 63,5 (mezcla G-C 90:10 con AP:ER) y 85,5 (mezcla G-C 90:10 con AP) al final del periodo de almacenamiento (**Figura 3.14**). Los resultados obtenidos evidencian la influencia de la temperatura de almacenamiento en la conservación de los aceites mezcla girasol-chía con y sin la adición de antioxidantes.

A pesar de las diferencias en la composición de ácidos grasos y el tipo y contenido de tocoferoles entre las mezclas de aceite G-C 90:10 y 80:20 p/p, no se encontraron diferencias en la estabilidad a la oxidación de estos sistemas para las diferentes condiciones estudiadas. Esto podría atribuirse al contenido de antioxidantes naturales (tocoferoles), principalmente γ -tocoferol, el cual tiene una alta actividad antioxidante *in vitro*.

El aceite de girasol contiene principalmente α -tocoferol (99,2% de los tocoferoles totales), el cual es el principal componente de la vitamina E, mientras que el aceite de chía tiene un alto contenido de γ -tocoferol (98,3% de los tocoferoles totales). Los aceites mezcla G-C 80:20 p/p presentaron un contenido de 14,0 a 16,0% de γ -tocoferol y de 82,8% de α -tocoferol con respecto a los tocoferoles totales, mientras que G-C 90:10 p/p mostraron un menor contenido de γ -tocoferol ($< 6,0\%$) y un mayor contenido de α -tocoferol ($> 94,0\%$) (**Tabla 3.5**). Los aceites vegetales crudos son generalmente más estables que los aceites refinados correspondientes, debido a que los procesos de degomado, refinado con álcalis, blanqueo y desodorización eliminan parte de los tocoferoles y de otros componentes minoritarios que contribuyen a la estabilidad oxidativa de los mismos (Mohamed, 2013).

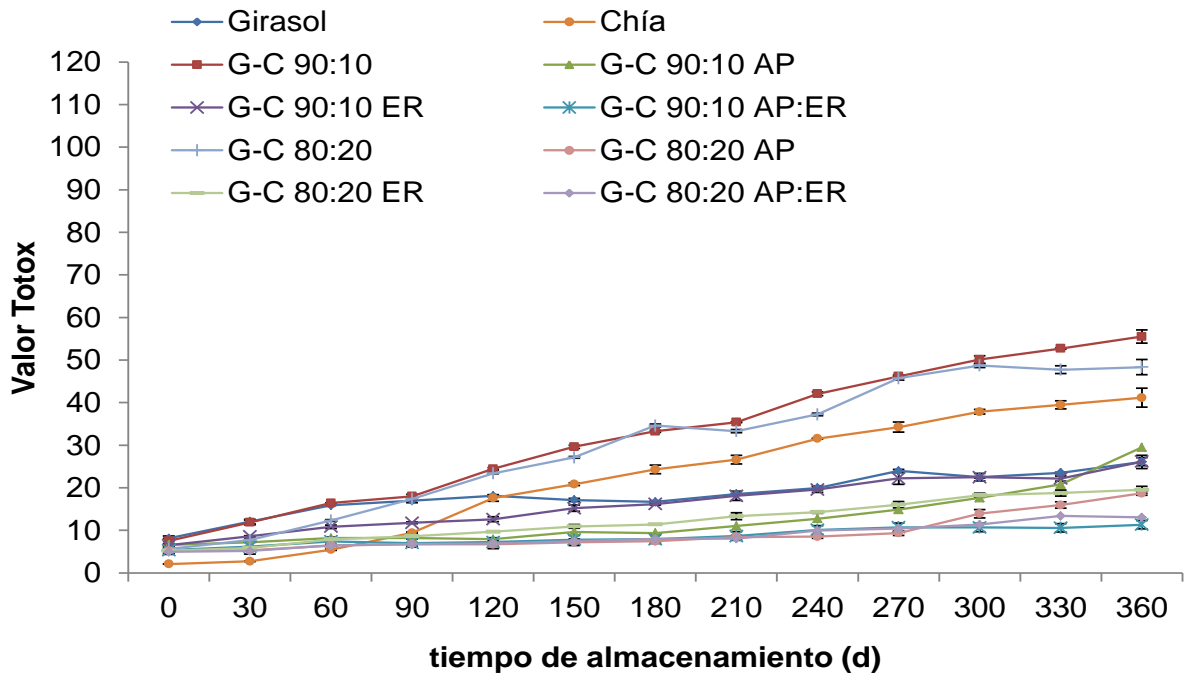


Figura 3.13. Evolución del valor Totox durante el almacenamiento de aceites de girasol, chía y sus mezclas a $T=4\pm 1^{\circ}\text{C}$. Las barras verticales indican la desviación estándar.

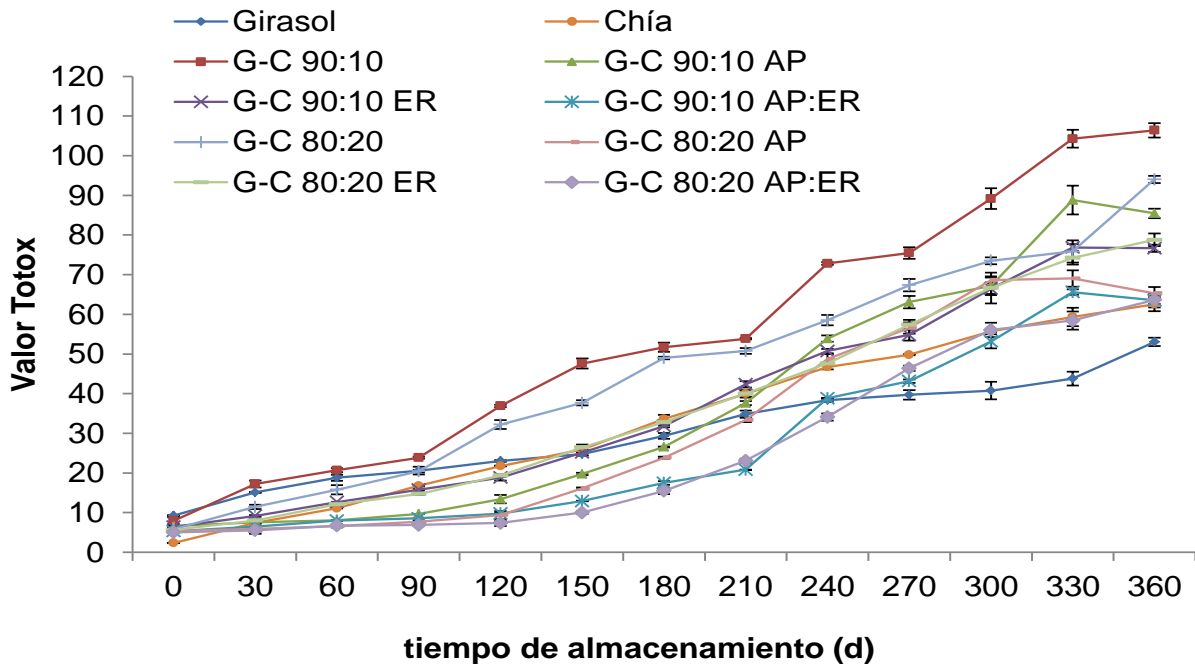


Figura 3.14. Evolución del valor Totox durante el almacenamiento de aceites de girasol, chía y sus mezclas a $T=20\pm 2^{\circ}\text{C}$. Las barras verticales indican la desviación estándar.

3.3.5. Ensayo de estabilidad oxidativa acelerada mediante Rancimat

En el equipo Rancimat se puede determinar la estabilidad oxidativa de los aceites mediante el cálculo de su tiempo de inducción (t_i) a través de la oxidación acelerada de los mismos, se registra el cambio en la conductividad eléctrica del agua, al captar los compuestos volátiles formados durante el ensayo (deMan y col., 1987). El t_i es un parámetro importante debido a que su extensión es una medida de la estabilidad oxidativa de los aceites (Sleeter, 1985). Esta metodología ha sido desarrollada como una variante automatizada del método AOM (Active Oxygen Method) para la determinación del tiempo de inducción de grasas y aceites, siendo avalado por diferentes normativas nacionales e internacionales (AOCS Cd 12b-92 e ISO 6886) (Metrohm Ionanalytik, 2001). Dicha estabilidad oxidativa está relacionada con la vida útil de los productos dependiendo de las características propias de los mismos tales como el grado de insaturación, contenido de antioxidantes naturales, trazas de metales, estado inicial de oxidación, etc. A su vez puede variar de acuerdo con las condiciones de almacenamiento (luz, temperatura, oxígeno, envases, etc.) (Gutiérrez Rosales, 1989).

La estabilidad a la oxidación de los aceites de girasol, chía y sus mezclas G-C 80:20 y 90:10 p/p con y sin la adición de diferentes antioxidantes (AP, ER y AP:ER) fueron evaluados periódicamente durante su almacenamiento a 4 ± 1 y $20\pm 2^\circ\text{C}$, determinando los respectivos tiempos de inducción (t_i). La estabilidad oxidativa de los diferentes aceites es afectada por su composición ácida, la cual disminuye en función del aumento del contenido de ácidos grasos insaturados. El aceite de chía exhibió la mayor susceptibilidad ($t_i = 3,0$ h) a la oxidación lipídica debido a su elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados, especialmente el ácido α -linolénico (~60%). El aceite de girasol presentó un tiempo de inducción de 13,0 h, mientras que valores de t_i intermedios (7,6 y 9,2 h) fueron obtenidos para los aceites mezcla sin el agregado de antioxidantes G-C 80:20 y 90:10 p/p (sistemas control). La adición de antioxidantes aumentó el t_i de los aceites mezcla G-C (80:20 y 90:10) de manera significativa ($p \leq 0,05$) en todos los casos. Así, a tiempo inicial ($t=0$), su estabilidad mostró importantes incrementos en el t_i respecto a los sistemas control, en el siguiente orden ER (146 y 138%); AP:ER (126 y 120%) y AP (40 y 28%), respectivamente.

Durante el almacenamiento a $4\pm 1^\circ\text{C}$ pudo observarse que AP:ER fue el antioxidante más efectivo a partir de los 90 d de almacenamiento para G-C 80:20 p/p y de los 180 d para G-C 90:10 p/p (**Figura 3.15a**). Asimismo, la mezcla de antioxidantes AP:ER presentó la mayor eficiencia para G-C 80:20 p/p a $20\pm 2^\circ\text{C}$. En cambio, para los aceites mezcla G-C 90:10 p/p tratados con AP:ER así como ER brindaron la mayor protección en cuanto al deterioro oxidativo (**Figura 3.15b**). Estos resultados están de acuerdo con las variaciones observadas en los índices PV, $p\text{-AV}$ y Totox durante el almacenamiento de los aceites mezcla estudiados.

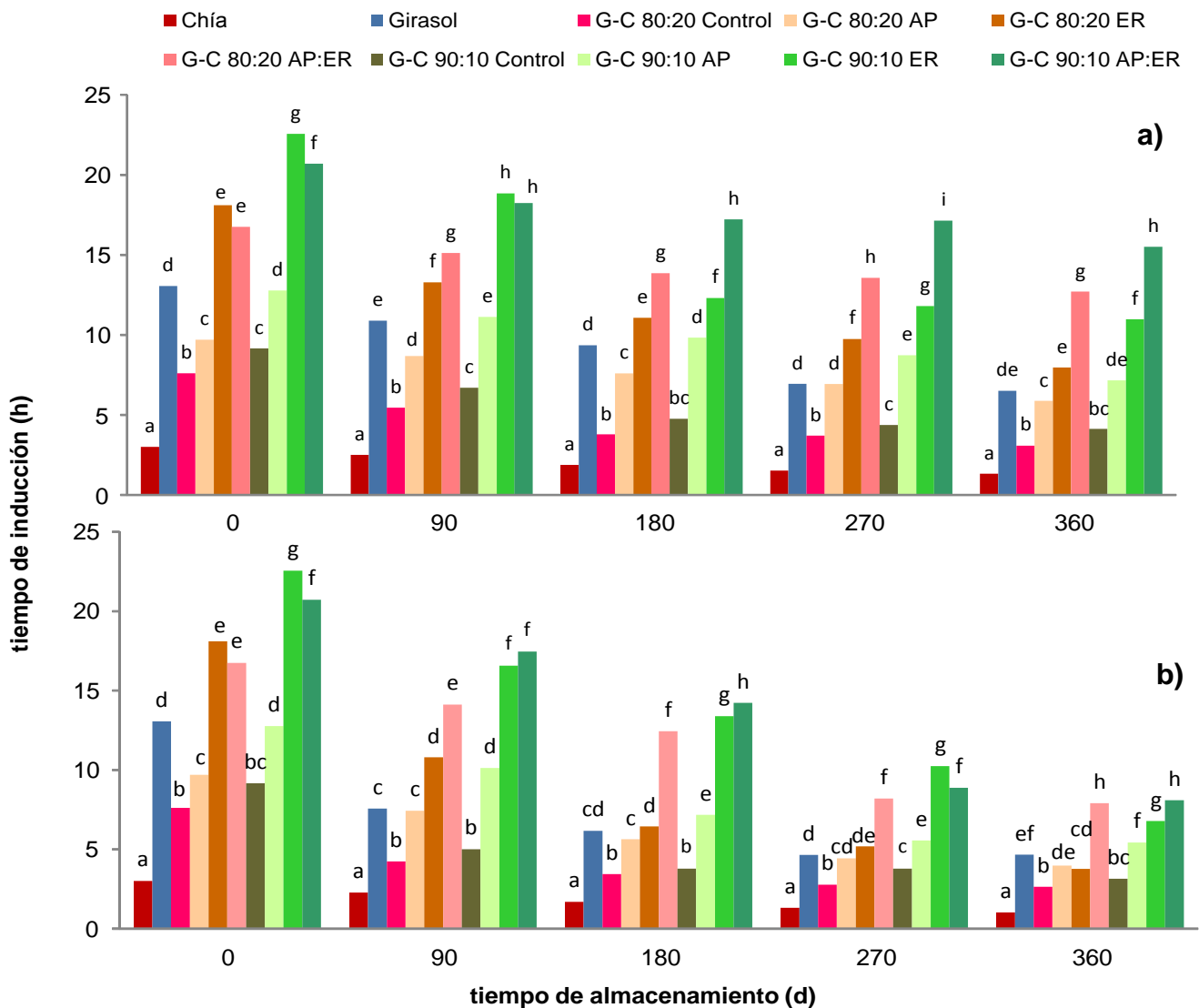


Figura 3.15. tiempo de inducción correspondiente a los aceites de girasol, chía y sus mezclas G-C, con y sin la adición de antioxidantes, en función del tiempo de almacenamiento (a) $4\pm 1^\circ\text{C}$ y (b) $20\pm 2^\circ\text{C}$. Los valores representan el valor medio de dos lotes independientes ($n=2$) y las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los sistemas para un determinado tiempo de almacenamiento de acuerdo a (HSD) de Tukey

En la **Figura 3.16** se muestra el efecto del tiempo de almacenamiento para los diferentes aceites mezcla G-C con y sin el agregado de antioxidantes, a las diferentes temperaturas evaluadas en el presente trabajo de Tesis.

La estabilidad de los aceites y sus mezclas disminuyó significativamente ($p \leq 0,05$) al aumentar el tiempo de almacenamiento con respecto a su t_i inicial para todos los sistemas y temperaturas estudiadas. Los aceites mezcla almacenados a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ se desestabilizaron más rápido que aquéllos conservados a $4 \pm 1^\circ\text{C}$, los cuales exhibieron mayores valores de t_i . Por lo tanto, la temperatura de almacenamiento constituye un parámetro importante a ser considerado en la estabilidad de los aceites vegetales.

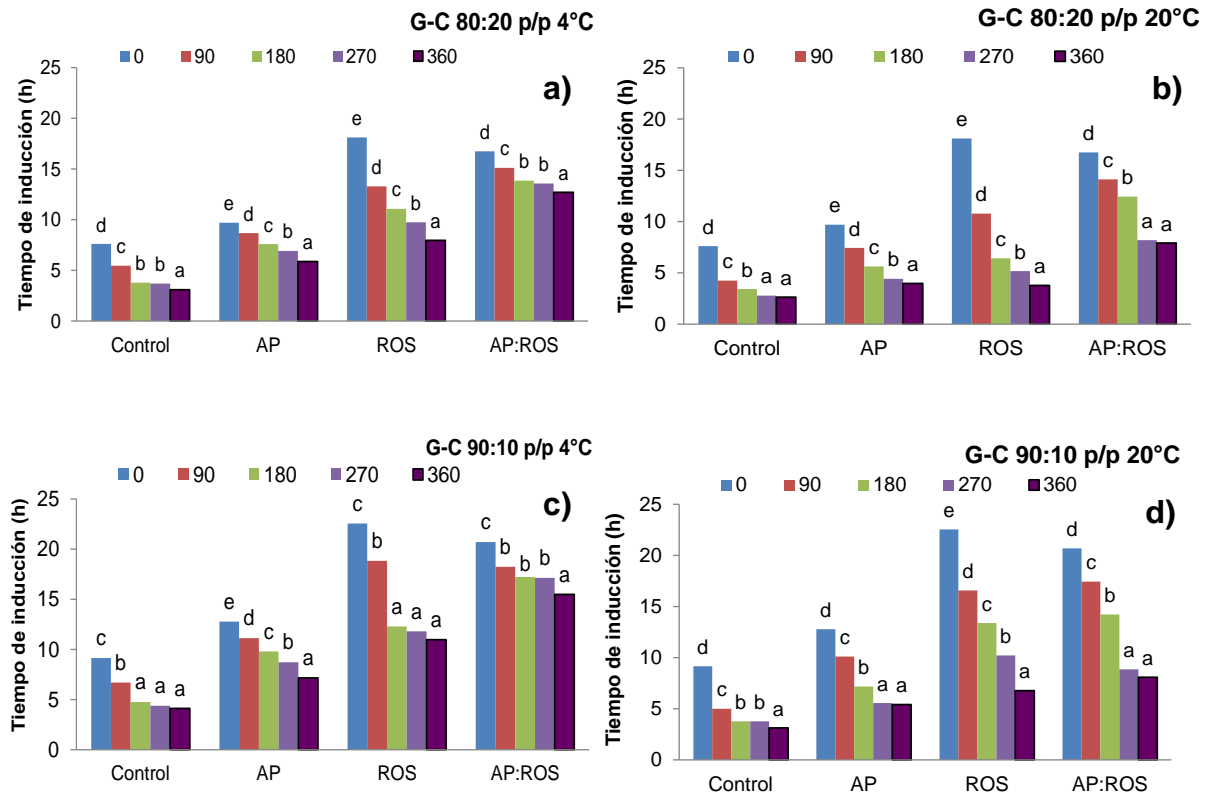


Figura 3.16. Efecto del tiempo de almacenamiento de aceites vegetales con y sin la adición de antioxidantes sobre la estabilidad oxidativa. **a)** G-C 80:20 $4 \pm 1^\circ\text{C}$; **b)** G-C 80:20 $20 \pm 2^\circ\text{C}$; **c)** G-C 90:10 $4 \pm 1^\circ\text{C}$; **d)** G-C 90:10 $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Los valores representan el valor medio de dos lotes independientes ($n=2$) y las letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los diferentes tiempos de almacenamiento para un determinado aceite de acuerdo a (HSD) de Tukey

3.4. CONCLUSIONES PARCIALES

➤ La composición de ácidos grasos de los aceites mezcla girasol-chía indica que puede lograrse una relación óptima de ácidos grasos esenciales ω -6/ ω -3 con una proporción de aceite de chía de 10 y 20% p/p, acorde a los lineamientos de la FAO/OMS.

➤ La evaluación sensorial de los aceites mezcla G-C estudiados indicó una buena aceptabilidad de los mismos en atributos tales como apariencia, aroma, sabor. Además, no se registraron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre los distintos aceites mezcla control (G-C 80:20, G-C 90:10 p/p). La incorporación de antioxidantes (ER, AP:ER) a dichos sistemas evidenció una cierta influencia en el sabor debido posiblemente a los compuestos presentes en el extracto de romero (ER).

➤ El estudio realizado mediante DSC permitió obtener los termogramas de oxidación correspondientes a los aceites de girasol, chía y sus respectivas mezclas G-C, los cuales mostraron la existencia de dos picos relacionados con la formación de hidroperóxidos (productos primarios del proceso oxidativo) y su posterior descomposición en otros productos (productos secundarios de oxidación).

➤ Los termogramas de DSC a diferentes velocidades de calentamiento posibilitaron la obtención de los parámetros cinéticos (E_a y A) de los diferentes sistemas respecto a la oxidación de lípidos. Los valores de E_a y A calculados a partir de T_e aumentaron con la adición de antioxidantes para ambos aceites mezcla G-C 80:20 y 90:10 v/v, principalmente con la adición de ER.

➤ El ensayo de almacenamiento evidenció que la temperatura es un factor de gran relevancia en la evolución del proceso oxidativo. Los niveles de PV correspondientes a los aceites mezcla G-C (80:20 y 90:10 p/p) almacenados a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ con la adición de antioxidantes registraron valores de $\text{PV} \leq 10 \text{ meqO}_2/\text{kg}$ aceite, el cual es el límite legal establecido por el Código Alimentario Argentino (CAA) para diversos aceites refinados. En contraste, todas las muestras almacenadas a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ alcanzaron el límite legal entre 120 y 240 d de almacenamiento en el orden siguiente: aceites mezcla control (120 d), aceites mezcla con ER (150 d), aceites mezcla con AP (180 d 90:10 p/p, 210 d 80:20 p/p), aceites mezcla con AP:ER (240 d).

- La adición de antioxidantes en los aceites mezcla G-C originó una disminución de la oxidación lipídica con respecto a los sistemas control durante el almacenamiento. La mezcla de antioxidantes AP:ER exhibió la mayor eficiencia antioxidante para la conservación de los aceites mezcla G-C (80:20 y 90:10 p/p) para ambas temperaturas de almacenamiento estudiadas.
- Los tiempos de inducción (t_i) registraron una disminución de dicho parámetro en función del aumento del contenido de ácidos grasos poliinsaturados (principalmente C18:3), de la temperatura y del tiempo de almacenamiento. La adición de antioxidantes aumentó los valores de t_i en ambas mezclas de aceites. Así, AP:ER (1:1) fue la más eficiente en cuanto a la estabilidad oxidativa de los aceites mezcla G-C 80:20 y 90:10 p/p durante el almacenamiento a $4\pm 1^\circ\text{C}$ hasta los 90 y 180 d, respectivamente. Los aceites mezcla almacenados a $4\pm 1^\circ\text{C}$, presentaron los mayores valores de t_i respecto de los conservados a $20\pm 2^\circ\text{C}$.
- El estudio de DSC evidenció que el antioxidante ER presentó el mejor efecto antioxidante, mientras que AP:ER fue más eficiente durante el almacenamiento a $4\pm 1^\circ\text{C}$ de acuerdo con los ensayos de Rancimat, PV, p -AV y los valores Totox.

3.5. DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Publicaciones científicas en revistas internacionales

- ✓ “Effect of storage conditions and antioxidants on the oxidative stability of sunflower-chía oil blends”. Guiotto Estefania N.; Ixtaina Vanesa Y.; Nolasco Susana M.; Tomás Mabel C. *Journal of the American Oil Chemists' Society* (en prensa). DOI 10.1007/s11746-014-2410-9

Presentaciones en congresos y/o jornadas

- ✓ “A DSC study of the autoxidation of chía - sunflower oil blends”. Guiotto E N, Ixtaina V Y, Nolasco S M, Tomás M C. 103rd AOCS Annual Meeting & Expo. Long Beach, USA; 29 de abril al 2 de mayo 2012
- ✓ “Estudio de la termoxidación de aceites mezcla girasol-chía mediante DSC”. Guiotto E N, Ixtaina V Y, Nolasco S M, Tomás M C. 156^o Jornada Científica de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica. Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica. Buenos Aires, Argentina; agosto de 2012. Este trabajo fue distinguido con el Premio Accesit 2012
- ✓ “Evaluación de la estabilidad oxidativa de aceites mezcla girasol-chía con la adición de antioxidantes (extracto de romero y palmitato de ascorbilo) mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC)”. Guiotto E N, Ixtaina V Y, Nolasco S M, Tomás M C. XXIX Congreso Argentino de Química “Centenario de la Asociación Química Argentina”, Mar del Plata, Argentina, octubre de 2012
- ✓ “Estabilidad oxidativa de aceites mezcla girasol:chía con adición de antioxidantes (extracto de romero y palmitato de ascorbilo) durante su almacenamiento”. Guiotto E N, Ixtaina V Y, Nolasco S M, Tomás M C. IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICyTAC 2012) Córdoba, Argentina; noviembre de 2012
- ✓ “Oxidative stability of sunflower-chía oil blends with addition of antioxidants”. Guiotto E N, Ixtaina VY, Nolasco S M, Tomás M C. 104th AOCS Annual Meeting & Expo, Montreal, Canadá; abril de 2013

Capítulo IV

EMULSIONES ALIMENTARIAS FUNCIONALES

O/W CON SUBPRODUCTOS DE

CHÍA Y GIRASOL

4.1. INTRODUCCIÓN

Muchos alimentos naturales o procesados están constituidos parcial o totalmente por emulsiones, sistemas termodinámicamente inestables que tienden a separarse en sus dos fases con el transcurso del tiempo (Moreau y col., 2003).

El principal requerimiento para que una emulsión sea considerada estable reside en que mantenga el tamaño medio de gota, la distribución espacial de las mismas o su estado de agregación constantes en función del tiempo (Karlberg y col., 2005, Muñoz y col., 2007). Esto puede obtenerse mediante un control adecuado de los procesos de desestabilización tales como el cremado, floculación y coalescencia. Muchas veces estos procesos se presentan simultáneamente y pueden retardarse mediante la presencia de agentes emulsificantes y estabilizantes. Los agentes emulsificantes promueven la formación de la emulsión y su estabilidad en el corto tiempo mediante su acción en la interfase. Los agentes estabilizantes brindan estabilidad a largo plazo (Karlberg y col., 2005). La estabilidad física de una emulsión está condicionada por el resultado de un balance complejo de fuerzas de atracción y repulsión entre las gotas de la fase dispersa (Evans y Wennerström, 1994).

Algunos agentes emulsificantes son producto anfifílico cuyos constituyentes presentan funciones hidrofílicas e hidrofóbicas por ejemplo, las lecitinas. La estructura química de dichos productos posibilita su adsorción en la interfase aceite-agua favoreciendo la formación de gotas con un menor consumo de energía y por tanto, la formación de la emulsión al reducir la tensión interfacial (Riego Martín y Gómez Herrera, 1988; van Nieuwenhuyzen y Szuhaj, 1998).

La **Tabla 4.1** muestra diferentes aplicaciones de las lecitinas en la industria alimentaria. La aplicación más difundida de las lecitinas, en ese campo es su rol como agente emulsificante relacionado con la formulación de emulsiones o dispersiones estables. Éstas son utilizadas para obtener tanto emulsiones W/O como emulsiones O/W. Tal como se mencionara anteriormente, ejemplos típicos de emulsiones O/W estabilizadas por lecitinas son la mayonesa, los aderezos y ciertas fórmulas para lactantes, mientras que emulsiones W/O son por ej., margarina y manteca (Hernández y Quezada, 2008).

4.1. Aplicaciones de las lecitinas en alimentos

Producto alimenticio	Funcionalidad
Aceites vegetales	Antioxidante
Bebidas en polvo	Agente humectante
Chocolate	Modificador de la viscosidad Modificador de la dispersabilidad Inhibidor del "fatbloom"
Confituras	Agente anti-adherente
Flavours	Agente encapsulante
Lácteos	Modificador de la dispersabilidad
Margarina	Modificador de la untabilidad Agente anti-salpicante Agente emulsificante
Panificados	Mejorador del volumen Acondicionador de la masa Reemplazante de yema de huevo

Las lecitinas en fase acuosa pueden formar diversas estructuras de asociación las cuales pueden ser de naturaleza micelar e incluso líquido-cristalina (Muñoz y Alfaro, 2000), tal como se ha especificado anteriormente en el **Capítulo I, sección 4.4.**

Las propiedades de dispersión, emulsificación y estabilización de las lecitinas se han asociado directamente con la carga eléctrica presente en los fosfolípidos constituyentes, así como en su composición de ácidos grasos. Un fosfolípido con una carga neta negativa tiene diferentes propiedades físicas en solución en comparación con una especie con carga neta neutra. En particular, la interacción con el agua o la hidratabilidad puede verse afectada por el estado de ionización de dicho fosfolípidos. Así, una carga negativa aumenta la estabilidad coloidal de los sistemas dispersos tales como emulsiones y liposomas (Carlsson, 2008).

Entre los tres principales fosfolípidos presentes en la lecitina, la polaridad disminuye en el siguiente orden: PI > PC > PE. Cuando PE y PC se mezclan en agua, las propiedades de la mezcla están dominadas por PC hasta aproximadamente el 25% de PE (fase lamelar) y por PE (en fase hexagonal inversa) por encima de aproximadamente un 32% de PE (Carlsson, 2008).

Las propiedades emulsificantes de las diferentes lecitinas están relacionadas con su valor de Balance Hidrofílico-Lipofílico (HLB), los mismos pueden observarse en la **Figura 4.1** (van Nieuwenhuyzen, 1999). Las diferentes modificaciones a las cuales pueden someterse a las lecitinas permiten producir emulsificantes con propiedades hidrofílicas-lipofílicas específicas. Las fracciones enriquecidas en PC obtenidas a partir de un proceso de fraccionamiento con etanol (HLB ≈ 7,5) son consideradas un buen emulsificante O/W, mientras que las fracciones enriquecidas en PI, con menores valores de HLB, ven incrementada su capacidad de formar emulsiones W/O.

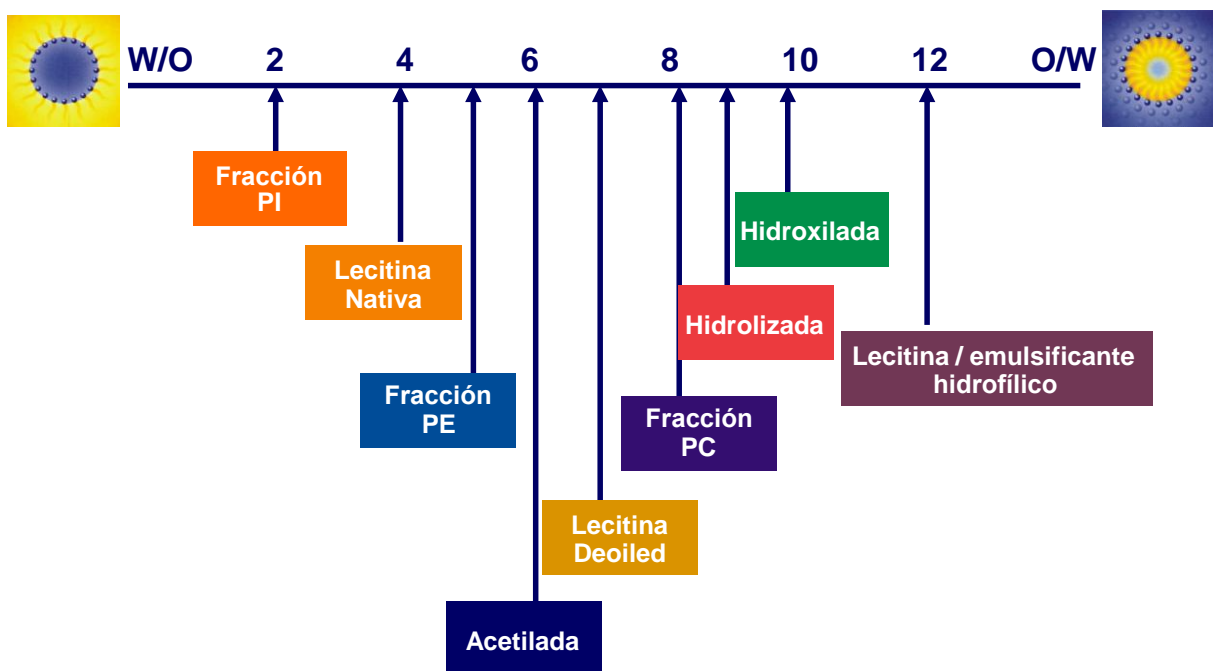


Figura 4.1. HLB de lecitinas modificadas

Por otra parte, un agente estabilizante -por ej. Polisacáridos- le confiere una cierta estabilidad física a la emulsión durante un tiempo prolongado, mediante la inmovilización de las gotas de la fase dispersa al aumentar la viscosidad de la fase acuosa de la misma. Cabe mencionar que ciertos agentes estabilizantes pueden ejercer también un rol como agentes emulsificantes (Dickinson y Pawlowski, 1997).

Las gomas y mucílagos de las diferentes fuentes y sus derivados representan un grupo de polímeros ampliamente utilizados en la industria alimentaria y farmacéutica como agentes espesantes, gelificantes y estabilizantes debido, entre otras cosas, a su capacidad para modificar las propiedades reológicas del solvente en el cual se disuelven, generalmente agua. El aumento de la viscosidad se debe al volumen hidrodinámico ocupado por las cadenas del polisacárido de alto peso molecular y a la interacción entre las mismas, cuando las gomas y mucílagos se solubilizan y dispersan (Yassen y col., 2005).

Los mucílagos son sustancias translúcidas amorfas polímeros de un monosacárido o mezcla de monosacáridos, muchos de ellos combinados con ácidos urónicos. Su estructura química general corresponde a la de polisacáridos heterogéneos con un alto contenido de galactosa, manosa, glucosa y derivados de osas, principalmente ácidos. La estructura y conformación de las gomas o mucílagos está determinada por los enlaces glucosídicos que presentan, así como por los monosacáridos que las constituyen. Los polisacáridos con mayor sustitución de sus grupos carboxílicos se hidratan más rápido que los que tienen una menor cantidad (Pacheco-Aguirre, 2010). Las propiedades fisicoquímicas más importantes que presentan estos hidrocoloides vegetales son la dispersión en agua, la viscosidad y la gelificación, siendo las mismas específicas para cada tipo de sustancia.

Para el caso de las gomas o mucílagos con carga negativa, la dispersión en agua y la viscosidad se incrementan por efecto de la repulsión intermolecular de sus grupos iónicos, teniendo moléculas relativamente estiradas que forman puentes de hidrógeno más efectivos con el agua (Pacheco-Aguirre, 2010).

Además de la estructura química, la concentración del polisacárido es otro factor que afecta el tiempo necesario para alcanzar la máxima viscosidad. Asimismo, este fenómeno depende del tipo de goma o de mucílago.

La función estabilizante se alcanza a una concentración superior a la crítica (C^*) para poder pasar de un comportamiento típico de una solución diluida a una concentrada. A concentraciones superiores a C^* , las interacciones entre polímeros son mucho más importantes que las polímero-solvente. Es decir, existe una fuerte competencia por el agua entre las macromoléculas de polímeros cercanas que por lo tanto, tienden a moverse como una unidad estructural. A concentraciones mucho más altas se produce una estructura basada en entrelazamientos físicos temporales

entre las macromoléculas; en estas ocasiones se consigue gelificar la fase continua de la emulsión. Es decir, no sólo aumenta la viscosidad de la fase continua sino que además el agente estabilizante es responsable de la manifestación de las propiedades viscoelásticas. Cabe señalar que a concentraciones inferiores a C^* , los polímeros pueden estabilizar las emulsiones cuando son de naturaleza aniónica, catiónica o anfótera, mediante interacciones electrostáticas (Muñoz y col., 2007).

Aunque ha sido ampliamente investigado el efecto de muchos polisacáridos tales como la goma guar, metilcelulosa, “fenugreek”, “locust bean”, lino, avena (Huang y col., 2001), goma xántica (Sun y col., 2007), *Alyssum homolocarpum* (Koocheki y col., 2009) y *Lipidium perfoliatum* (Soleimanpour y col., 2013) sobre la estabilidad de emulsiones O/W, no se registran estudios en cuanto a los usos potenciales del mucílago de chía en la industria alimentaria como agente estabilizante.

El objetivo de este capítulo fue obtener emulsiones O/W (Φ_m 0,10) con el agregado de lecitinas modificadas de girasol y mucílago de chía, evaluando la estabilidad de las mismas frente a la separación gravitacional y a la coalescencia durante el almacenamiento refrigerado (4 ± 1 °C). Para ello se formularon emulsiones con lecitinas modificadas de girasol (fracción enriquecida en fosfatidilcolina y lecitina “deoiled”) como agentes emulsificantes, mucílago de chía de diferente composición proximal como agente estabilizante y aceite mezcla girasol-chía 80:20 p/p como fase oleosa.

A tal efecto, se ensayaron distintas formulaciones a fin de evaluar la influencia del tipo y concentración de lecitinas modificadas de girasol y la presencia o ausencia de mucílago de chía sobre la estabilidad de las distintas emulsiones alimentarias funcionales.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Lecitinas de girasol

Se utilizaron lecitinas modificadas de girasol como agentes emulsificantes - fracción enriquecida en fosfatidilcolina (FPC) y lecitina de girasol “deoiled” (LGD). Dichas lecitinas modificadas se obtuvieron de acuerdo a los procesos de

fraccionamiento y “deoiling” descritos en el **Capítulo II, secciones 2.2.2.1 y 2.2.2.2**, respectivamente.

4.2.1.1. Composición de fosfolípidos

La composición de fosfolípidos de las lecitinas modificadas de girasol fue determinada mediante ^{31}P NMR, cuyo procedimiento se ha descrito en el **Capítulo II, sección 2.2.2.3**.

4.2.2. Mucílago de chía

Dos tipos de mucílago de chía (M1 y M2) con diferente contenido de proteínas y lípidos fueron utilizados, habiéndose obtenido según las metodologías que se detallan seguidamente.

Método I (M1)

El mucílago se obtuvo siguiendo la técnica propuesta por Marin Flores y col. (2008) modificada y adaptada a las condiciones del laboratorio. Semillas enteras de chía se remojaron en agua (1:20 p/v), durante 1 h, a temperatura ambiente, con agitación manual durante los primeros 15 min para lograr la completa hidratación de las semillas y evitar su aglomeración. El mucílago extraído se separó de las semillas por filtración a través de una malla comercial utilizando vacío de 220 mbar mediante una bomba (Fisher Scientific, USA). Luego se congeló a -20°C durante 96 h y se liofilizó (-45°C , 0,060 mbar, 45 μm de Hg, 5 d) (Liofilizador LABCONCO, Freezone 18, USA). El mucílago seco fue molido utilizando una multiprocesadora (Moulinex, España) hasta obtener un polvo fino.

Método II (M2) (Capitani y col., 2013)

El mucílago se obtuvo remojando las semillas enteras de chía en agua (1:10 p/v), durante 4 h, a temperatura ambiente, con agitación manual durante los primeros 15 min para lograr la completa hidratación de las semillas y evitar su aglomeración. Posteriormente, dicha mezcla se distribuyó en bandejas de plástico (9 x 5 x 15 cm) en una capa de 1 cm de espesor, se cubrieron con papel aluminio, se congelaron a -20°C durante 96 h y liofilizaron (-50°C , 0,033 mbar, 25 μm Hg, 4 d) (Liofilizador RIFICOR, Argentina). Por último, el mucílago seco se separó de las semillas mediante un proceso de tamizado (agitador Zonytest, Argentina), malla N^o

20 ASTM (840 μm), en tres periodos de 15 min cada uno, previo a la separación manual de la mezcla de semillas y de mucílago liofilizado.

Los dos tipos de mucílago se guardaron en frascos de plástico cerrados herméticamente y se almacenaron en desecador para protegerlos de la humedad.

4.2.2.1. Determinación del contenido de proteínas

El contenido de proteína cruda se determinó utilizando el método de Kjeldahl (AOAC, 1990), empleando un digestor y destilador Büchi (Suiza).

Digestión

La muestra (1 g) se colocó en el tubo digestor junto con 10 g de catalizador, el cual consistió en una mezcla al 7% de $\text{SO}_4\text{Cu}:\text{SO}_4\text{K}_2$. Seguidamente, se añadieron 25 mL de H_2SO_4 concentrado y se procedió al calentamiento. Se preparó en forma paralela un blanco. Una vez que la solución se hubo aclarado, se prosiguió el calentamiento por otros 30 min, con lo cual se aseguró la completa oxidación de la materia orgánica. Se retiró y se dejó enfriar. Luego se agregaron 100 mL de agua.

Destilación

Se preparó una solución de H_3BO_3 al 4% a la que se añadió una solución indicadora. Esta última se preparó con 0,02 g de rojo de metilo y 0,04 g de verde de bromocresol disueltos en 19 mL de alcohol y 1 mL de agua destilada. La proporción de solución indicadora fue de 5 mL por litro de H_3BO_3 al 4%. Se colocaron 50 mL de esta solución ácida preparada en un erlenmeyer de 250 mL el que se situó a la salida del condensador para recoger el amonio destilado. Se añadió NaOH al 30% a la muestra digerida para liberar el amonio, hasta que la solución tomó una coloración azul intensa. Esta coloración se debe a la formación de un complejo entre iones amonio y cobre e indica que la cantidad de NaOH fue suficiente para neutralizar el exceso de H_2SO_4 .

La destilación se llevó a cabo hasta recoger aproximadamente 100 mL de líquido en el erlenmeyer colector. A fin de determinar el amonio absorbido por el H_3BO_3 se tituló el destilado con HCl 0,1 N.

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{[(V_1 - V_B) \times N_{\text{HCl}}] \times 0,014}{w_1} \times 100$$

Ec. 4.1

donde:

V_1 : volumen de HCl consumido en la titulación de la muestra (mL)

V_B : volumen de HCl consumido en la titulación del blanco (mL)

w_1 : peso de la muestra, expresado en base seca (g)

N_{HCl} : Normalidad del ácido sulfúrico utilizado en la titulación

A fin de estimar el porcentaje de proteínas se multiplicó el % Nitrógeno por un factor $F=6,25$.

4.2.2.2. Determinación de lípidos residuales

Los lípidos residuales se estimaron utilizando *n*-hexano (grado analítico, CAS N°110–54–3, valoración: mínimo 96%, punto de ebullición: 69°C) como solvente en un equipo Soxhlet con ciclos térmicos a 80°C, 8 h siguiendo la norma IUPAC 1.122 (IUPAC, 1992). El solvente fue removido del aceite utilizando un rotavapor R-114 (Büchi, Suiza) a 40°C a presión reducida bajo una corriente de nitrógeno. El contenido de aceite fue determinado gravimétricamente y expresado como porcentaje en peso sobre base seca (% b.s.).

4.2.2.3. Dispersiones de mucílago de chía

Las dispersiones de mucílago fueron preparadas según el método de Betancur-Ancona y col., (2003). Para ello, se pesaron 0,75 g de mucílago de chía liofilizado, se adicionaron 80 g de agua destilada y se agitaron a 60°C durante 30 min. Las mismas se enfriaron a temperatura ambiente y se almacenaron durante 24 h a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ a fin de lograr la completa hidratación del mucílago.

4.2.3. Preparación de emulsiones O/W

Las emulsiones O/W (10:90 p/p) fueron preparadas utilizando lecitinas modificadas de girasol (FPC, LGD) como agentes emulsificantes a diferentes concentraciones 0,5; 1,0 y 2,0% p/p con respecto a la fase acuosa. Como fase oleosa se utilizó aceite mezcla girasol:chía 80:20 p/p.

La fase continua de las emulsiones con la presencia de mucílago de chía se obtuvo -en cada caso- mediante la incorporación de dispersiones de mucílago, de

manera de tener en la emulsión final una concentración de 0,75% p/p de mucílago de chía.

Los sistemas formulados con y sin el agregado de mucílago de chía se homogeneizaron mediante un equipo Ultraturrax T-25 (Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Alemania), a 10.000 rpm durante 2 min y seguidamente mediante un procesador ultrasónico (Sonics & Materials, Inc., USA) a su máxima potencia (750 W) durante 3,5 min, empleando un baño de agua-hielo para evitar el deterioro de los componentes de la emulsión por un posible aumento de la temperatura ambiente.

En todas las emulsiones se adicionó 0,01% (p/p) de azida sódica con la finalidad de inhibir el crecimiento microbiano. A fin de evaluar la estabilidad física de las emulsiones O/W (Φ_m 0,10) con lecitinas modificadas de girasol y en ausencia o presencia de mucílago de chía, se llevó a cabo un ensayo de almacenamiento a temperatura de refrigeración ($4\pm 1^\circ\text{C}$) durante 30 y 120 días, respectivamente; realizando periódicamente las determinaciones que se detallan a continuación.

4.2.4. Caracterización de las emulsiones O/W

4.2.4.1. Caracterización óptica mediante un analizador vertical de barrido (QuickScan)

La estabilidad global de las diferentes emulsiones O/W (Φ_m 0,10) estudiadas se determinó a través de medidas de dispersión de la luz mediante un analizador óptico vertical de barrido QuickScan (Beckman Coulter, USA) (**Figura 4.2**) en función de la longitud de la celda y del tiempo de almacenamiento, de acuerdo a lo descrito en el **Capítulo II, sección 2.2.3.2**.



Figura 4.2. Analizador óptico vertical de barrido QuickScan (Beckman Coulter, USA)

4.2.4.2. Distribución y tamaño de partículas

Se realizaron determinaciones de la distribución y el tamaño de partículas de las emulsiones mediante un equipo de dispersión estática de luz Mastersizer 2000E, con un sistema de dispersión Hydro 2000MU provisto de un laser He-Ne (633 nm) (Malvern Instruments Ltd., UK) (**Figura 4.3**). El rango de medición del equipo se encuentra entre 0,1 a 1000 μm . La técnica de difracción láser opera bajo la predicción del comportamiento de las partículas sobre la dispersión de la luz. Las partículas dispersan la luz en todas las direcciones con un patrón de intensidad, el cual es dependiente de su tamaño. Se tomaron alícuotas de cada emulsión y se colocaron en un recipiente con agua destilada y agitación a 2000 rpm, donde un haz de radiación láser incide sobre una celda interna transparente, donde recircula la emulsión diluida. La luz dispersada en distintos ángulos, por las gotas de diferente tamaño, pasa por un complejo sistema óptico e incide posteriormente sobre los detectores, obteniendo un patrón angular de luz dispersada. El software incorporado en el equipo permite traducir este patrón con la correspondiente distribución de tamaño de partículas (McClements, 1999).

Se determinaron los diámetros promedio de gota de Brouker D [4,3] y De Sauter D [3,2], relacionados con las distribuciones en volumen y en superficie, respectivamente. D [4,3] está relacionado con cambios en el tamaño de partícula que involucran procesos de desestabilización y D [3,2] brinda una medida del diámetro promedio en el que se encuentran la mayoría de las gotas. Dichos resultados fueron analizados mediante el análisis de varianza ANOVA seguido por el test de Tukey ($p \leq 0,05$), usando el software InfoStat (Universidad Nacional de Córdoba, 2004).



Figura 4.3. Analizador de tamaño de partículas Malvern Mastersizer (Malvern Instruments Ltd., UK)

4.2.4.3. Observaciones microscópicas

Se realizaron observaciones microscópicas de las emulsiones mediante un microscopio óptico conectado a una cámara DC 100 (Leica Microscopy Systems Ltd., Suiza). Una pequeña gota de la emulsión se colocó directamente sobre un portaobjeto de vidrio, se cubrió y se observó a 100X.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las emulsiones O/W (Φ_m 0,10) presentaron un pH inicial promedio de $6,59 \pm 0,22$ sin registrarse diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre las mismas.

4.3.1. Emulsiones O/W con lecitinas modificadas de girasol (FPC, LGD)

4.3.1.1. Composición de fosfolípidos de las diferentes lecitinas

La composición de fosfolípidos obtenida mediante ^{31}P NMR así como la relación entre los fosfolípidos mayoritarios presentes en la fracción enriquecida en fosfatidilcolina (FPC), lecitina de girasol cruda (LGC) y lecitina de girasol “deoiled” (LGD) pueden observarse en las **Tablas 4.2 y 4.3**, respectivamente.

Los resultados obtenidos muestran que FPC exhibe una elevada concentración de PC (45,71%) y niveles bajos de PI (1,92%) en comparación con LGC y LGD; dichas diferencias fueron altamente significativas ($p \leq 0,05$) (**Tabla 4.2**).

Tabla 4.2. Composición en fosfolípidos mediante ^{31}P NMR de las lecitinas modificadas de girasol

PL	FPC (% m/m)	LGC (% m/m)	LGD (% m/m)
PC	77,24	37,05	36,40
PI	3,24	35,84	35,80
PE	8,30	11,62	11,65
PA	1,01	4,42	4,45
Otros	10,51	11,06	11,70
Total ($\mu\text{g/g}$)	592	429	572

Para cada fila, valores promedio seguidos de letras idénticas no difieren significativamente entre sí ($p \geq 0,05$)

La FPC presentó una relación promedio PC/PE de 9,33, evidenciando una considerable diferencia a nivel composicional con respecto a LGC y LGD, las cuales mostraron relaciones PC/PE de 3,19 y 3,12, respectivamente (**Tabla 4.3**). Por otra

parte, se observa que la eliminación del aceite residual (“deoiling”) no tuvo influencia sobre las relaciones de los fosfolípidos mayoritarios en LGC y LGD.

Tabla 4.3. Relación entre los principales fosfolípidos presentes en las lecitinas de girasol

	PC/PE	PC/PI	PI/PE
FPC	9,33	23,81	0,39
LGC	3,19	1,03	3,09
LGD	3,12	1,02	3,07

Tal como se describió en el **Capítulo I**, los fosfolípidos PC y PE pueden presentar distintos arreglos en la interfase. Esta característica le otorga a la relación PC/PE, la posibilidad de ser utilizada como un parámetro relacionado en forma directa con la potencial actividad como agente emulsificante en diversos tipos de emulsiones, tanto en el caso de las lecitinas nativas como de las modificadas (van Nieuwenhuyzen y Szuhaj, 1998). En este sentido, la relación PC/PE correspondiente a FPC sugiere una aplicación eficiente de la misma como agente emulsificante en emulsiones O/W con respecto a LGC y LGD.

4.3.1.2. Estabilidad de las emulsiones O/W con lecitinas modificadas de girasol (FPC, LGD) como agente emulsificante

El término estabilidad en una emulsión se refiere a su capacidad para resistir los cambios en sus propiedades a través del tiempo; cuando más estable es una emulsión, más lento es el proceso de cambio en sus propiedades (McClements, 1999).

Los perfiles de “Back-Scattering” correspondientes a las emulsiones O/W (Φ_m 0,10) formuladas con lecitinas modificadas de girasol (FPC, LGD) en un rango de concentraciones de 0,5 a 2,0% y almacenadas a $4\pm 1^\circ\text{C}$ durante 30 d se muestran en la **Figura 4.4**.

Las emulsiones O/W exhibieron procesos de desestabilización por cremado en función del tiempo de almacenamiento refrigerado, evidenciado por el movimiento ascendente de las gotas debido a la menor densidad de la fase dispersa respecto a la correspondiente a la fase continua. Durante el proceso de cremado se forma una fase inferior, la cual está empobrecida en gotas y una fase superior enriquecida en las mismas, fase crema (**Figura 4.4**).

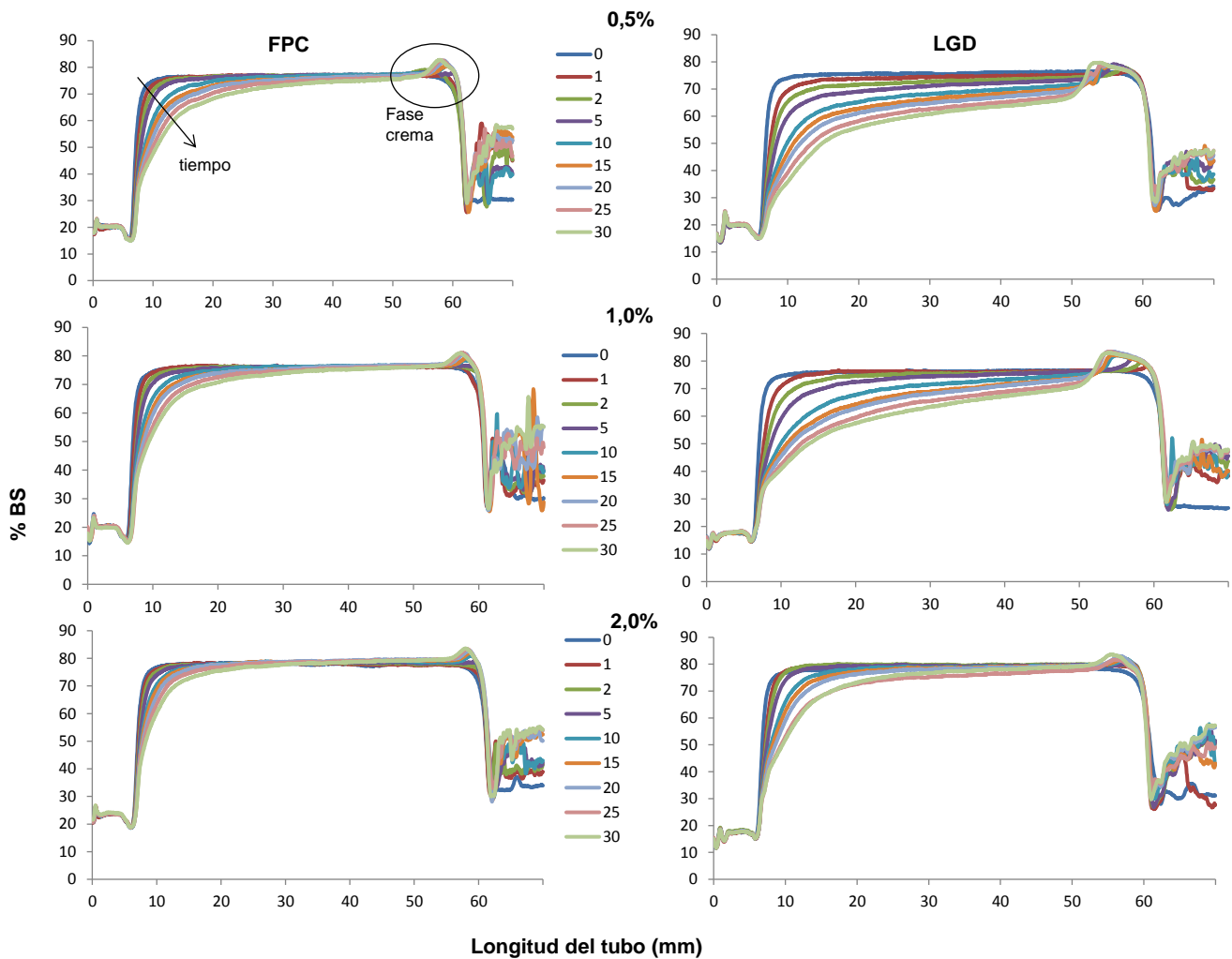


Figura 4.4. Perfiles diferenciales correspondientes a emulsiones O/W (Φ_m 0,10), formuladas con FPC (izquierda) y LGD (derecha) en un rango de 0,5-2% p/p. Cada línea de color representa un tiempo de almacenamiento (d)

Las cinéticas de desestabilización se evaluaron sobre dos zonas de las emulsiones: zona I (10-15 mm) donde se visualiza el proceso de clarificación y zona II (50-55 mm) denominada fase crema (**Figuras 4.5 y 4.6**).

Las cinéticas de desestabilización correspondientes a la zona I muestran que los valores de %BS inicial ($t=0$) no presentaron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre las diferentes emulsiones analizadas (**Figura 4.5**). Luego del quinto día de almacenamiento refrigerado, los perfiles de QuickScan de las emulsiones O/W formuladas con 0,5 y 1,0% de agente emulsificante (FPC, LGD) registraron un notorio descenso del %BS en dicha zona, siendo mucho más pronunciado en las emulsiones formuladas con LGD. Este hecho, denota una rápida desestabilización de la emulsión debido a la migración de partículas hacia la parte superior de la

emulsión (cremado). Por otra parte, las emulsiones O/W con niveles de 2,0% de FPC y LGD, presentaron variaciones significativas ($p \leq 0,05$) del %BS a partir de 10 d de almacenamiento refrigerado.

Las emulsiones con FPC fueron considerablemente más estables en todo el rango de concentraciones estudiado respecto a las adicionadas con LGD, desde 10 d de almacenamiento. Además, se evidenció un aumento significativo ($p \leq 0,05$) en la estabilidad de las emulsiones frente al proceso de cremado en función del aumento de la concentración de FPC (**Figura 4.5**).

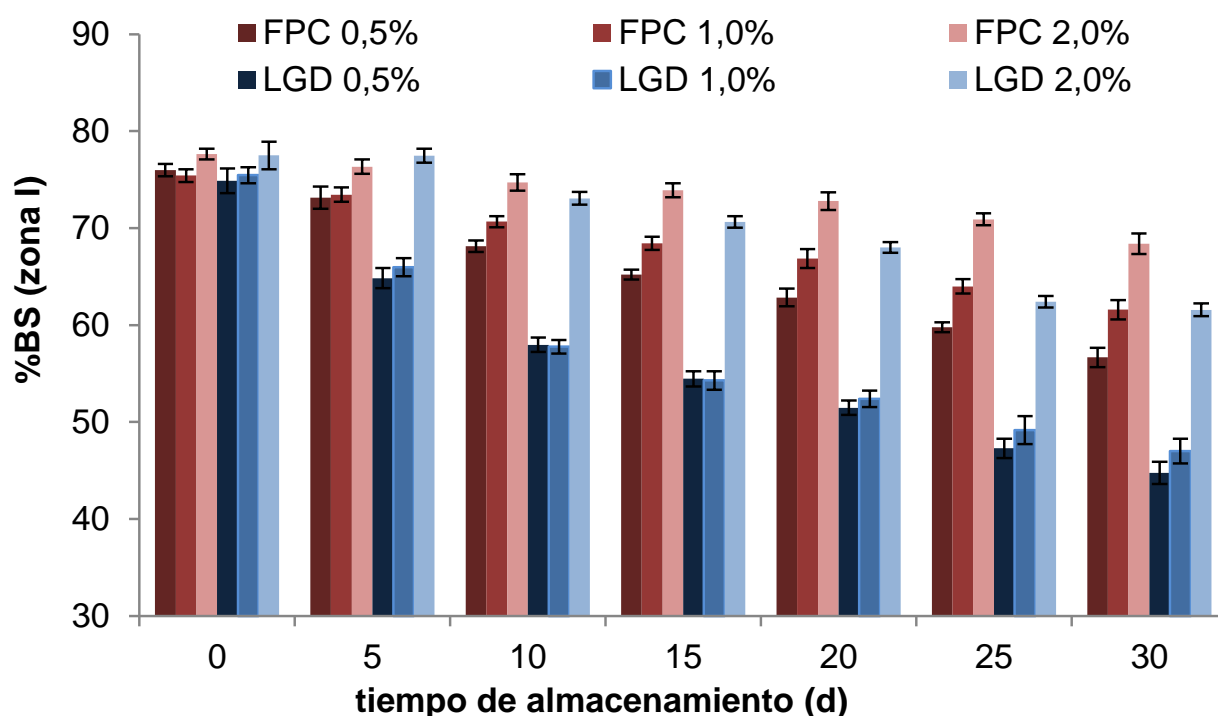


Figura 4.5. Cinéticas de desestabilización de emulsiones O/W (Φ_m 0,10), formuladas con FPC y LGD en un rango de 0,5-2% p/p correspondientes a la zona I (10-15 mm)

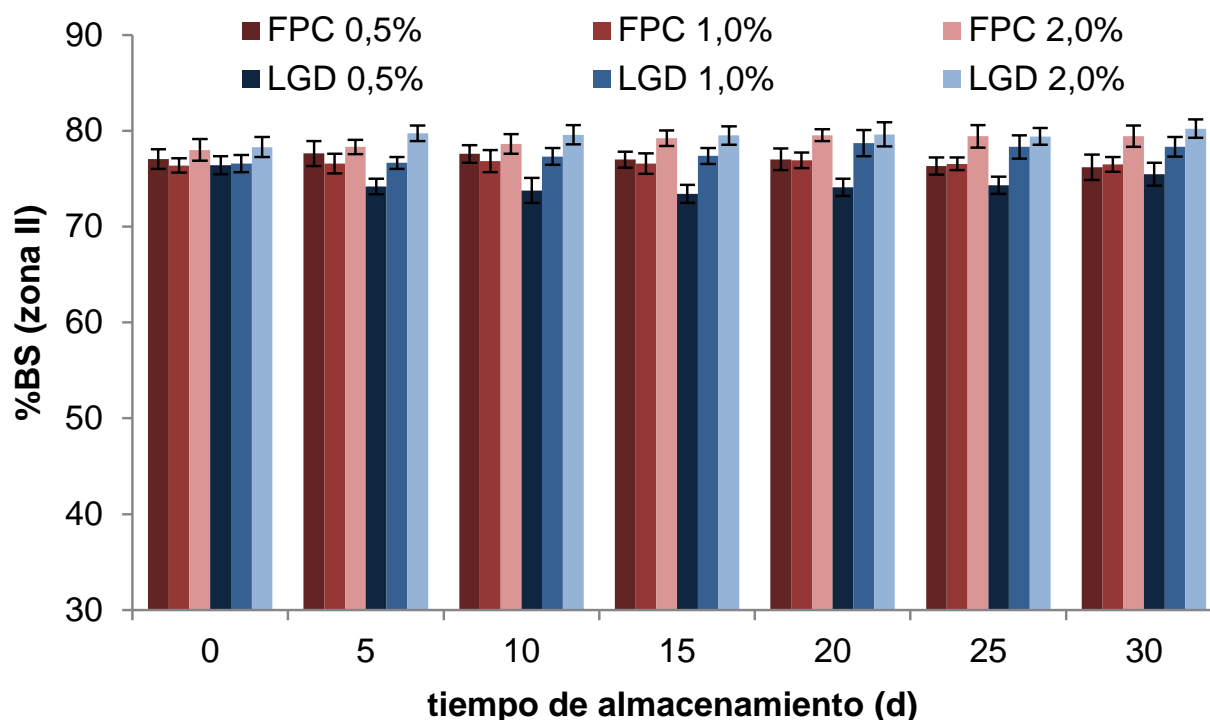


Figura 4.6. Cinéticas de desestabilización de emulsiones O/W (Φ_m 0,10), formuladas con FPC y LGD en un rango de 0,5-2% p/p correspondientes a la zona II (50-55 mm)

El análisis de posibles procesos de desestabilización de la fase crema se llevó a cabo evaluando el comportamiento de los valores de %BS en función del tiempo de almacenamiento en la zona II de la celda (50-55 mm) (**Figura 4.6**). En dicha zona puede observarse en general, que el agregado de ambos agentes emulsificantes permitió la formación de una fase crema estable en función del tiempo durante el periodo de almacenamiento estudiado. No obstante, la emulsión O/W con 0,5% de LGD, presentó una disminución significativa ($p \leq 0,05$) del %BS a partir del 5 d de almacenamiento. Este hecho sugiere -en este caso- la ocurrencia de una desestabilización rápida de la fase crema por coalescencia.

Las diferencias registradas en la actividad emulsificante de las diferentes lecitinas de girasol pueden relacionarse con los valores de HLB asociados a las mismas. La FPC presenta un mayor HLB que la LGD debido a la mayor relación entre los fosfolípidos PC/PE (siendo PC más hidrofílico que PE). Cabe señalar que un aumento en el HLB de las diferentes lecitinas puede generar mejores características emulsificantes para emulsiones O/W (Davis, 1994; van Nieuwenhuyzen, 1999).

4.3.1.3. Análisis de la distribución y tamaño de partículas

El comportamiento de las emulsiones, en lo que respecta al cremado y a la coalescencia, está gobernado por la presencia de gotas más grandes, aún cuando éstas representen un pequeño porcentaje en número de la totalidad de las mismas (Palazolo, 2006). A modo de ejemplo de la distribución de tamaño de partículas en volumen y en superficie, en la **Figura 4.7** se presentan los resultados obtenidos para las emulsiones con diferentes tipos y concentraciones de lecitinas modificadas de girasol a $t=0$. Dichos perfiles fueron similares mientras las emulsiones estudiadas no modificaron significativamente su estabilidad. Puede observarse que las emulsiones formuladas con FPC exhibieron un comportamiento similar en las distribuciones de tamaño de partículas en superficie independientemente de la concentración utilizada (**Figura 4.7a**).

La mayoría de las distribuciones de tamaño de partículas en volumen fueron monomodales, con un tamaño comprendido entre 0,1 - 3,0 μm , excepto la emulsión con 2,0% de FPC, la cual presentó una pequeña población de partículas de mayor tamaño (3,0 - 13,0 μm). La distribución de tamaño de partículas en superficie presentó un comportamiento monomodal con tamaños de partícula entre 0,1 a 1,7 μm , para todas las concentraciones de FPC estudiadas.

Por otra parte, las emulsiones formuladas con LGD presentaron diferentes distribuciones de tamaño de partículas, con un corrimiento hacia la izquierda en función del aumento de la concentración utilizada, lo que indica la presencia de una amplia distribución de tamaño de partículas de menor tamaño (**Figura 4.7**).

El análisis de la distribución del tamaño de partículas de las diferentes emulsiones O/W esta acorde con las observaciones comentadas previamente respecto a la actividad emulsificante de los diferentes tipos de lecitina modificada de girasol estudiadas.

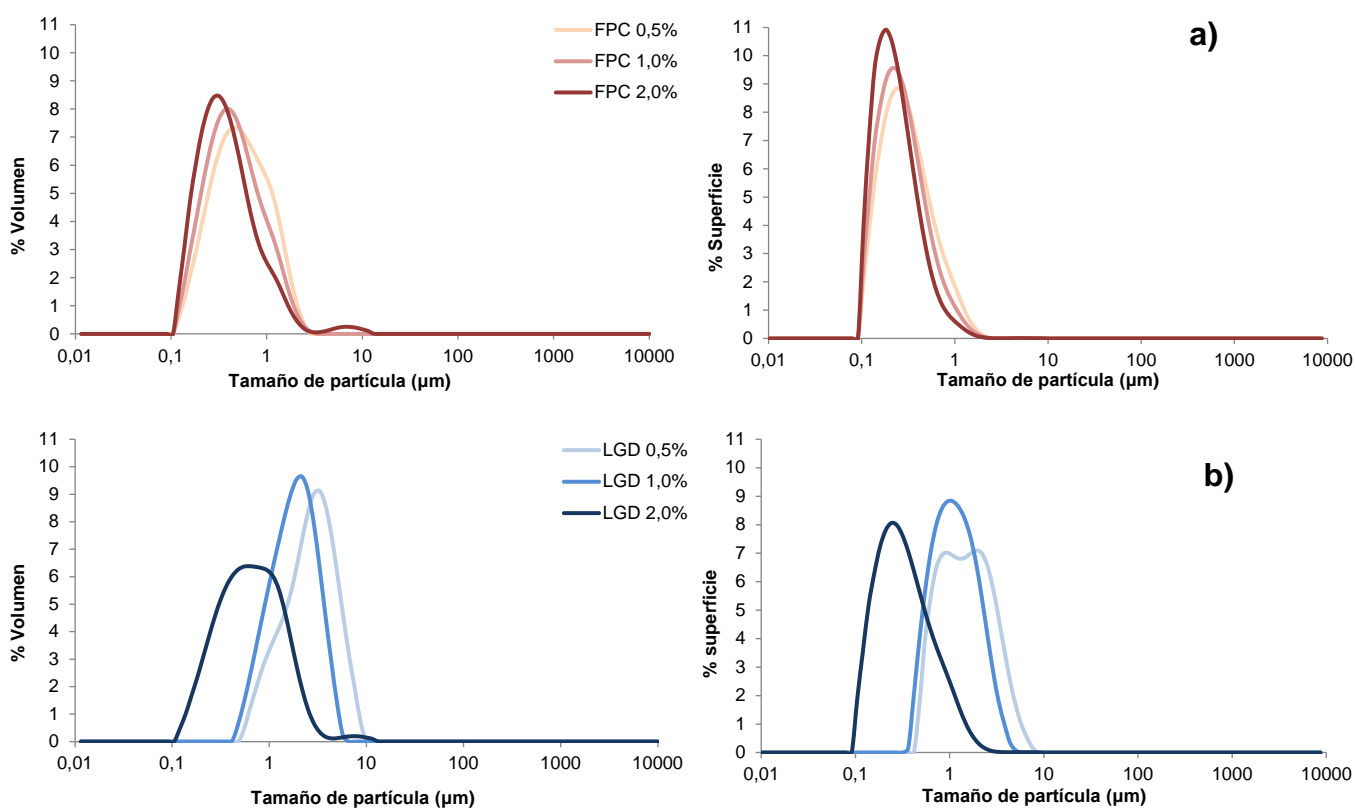


Figura 4.7. Distribución de tamaño de partícula en volumen y en superficie correspondiente a emulsiones O/W (Φ_m 0,10) con diferente tipo y concentración de agente emulsificante **a)** FPC **b)** LGD. Valores promedio ($n=2$)

En las **Tablas 4.4, 4.5 y 4.6** se representan los diámetros promedio De Brouker ($D [4,3]$), De Sauter ($D [3,2]$) y el área superficial específica (AIE) en función del tipo y concentración de los agentes emulsificantes, durante el almacenamiento refrigerado.

Las emulsiones O/W formuladas con FPC como agente emulsificante, presentaron valores similares de diámetros $D [4,3]$ y $D [3,2]$ en rangos de 0,47 - 0,62 μm y 0,29 - 0,40 μm , respectivamente; sin registrarse diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre las diferentes concentraciones ensayadas, así como tampoco durante el tiempo de almacenamiento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ (**Tablas 4.4 y 4.5**). El área interfacial específica (AIE) aumentó significativamente ($p \leq 0,05$) con el incremento de la concentración de FPC de 0,5 a 2,0%. Por otro lado, dicho parámetro no presentó cambios significativos ($p \geq 0,05$) durante el periodo de almacenamiento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ (**Tabla 4.6**).

Las emulsiones con LGD mostraron una disminución significativa ($p \leq 0,05$) de los valores de $D [4,3]$ y $D [3,2]$ en función del incremento de la concentración. Las emulsiones con 2,0% de LGD, exhibieron diámetros $D [4,3]$ y $D [3,2]$ con valores

promedio de 0,77 y 0,44 μm , respectivamente; sin presentar diferencias significativas ($p \geq 0,05$) durante el tiempo de almacenamiento refrigerado. Por otra parte, las emulsiones con 0,5 y 1,0% de LGD, exhibieron aumentos significativos ($p \leq 0,05$) en ambos diámetros respecto a los valores correspondientes al tiempo inicial (datos estadísticos no mostrados). El área interfacial creada (AIE) fue significativamente menor ($p \leq 0,05$) para concentraciones de 0,5 y 1,0% de LGD (**Tabla 4.6**), debido a la limitada cantidad de agente emulsificante que pueda ejercer un efecto tensioactivo en el sistema.

Dichos resultados están en concordancia con la desestabilización exhibida mediante los perfiles de QuickScan observados durante el almacenamiento refrigerado de las emulsiones, donde la disminución de los valores de %BS estuvo principalmente asociada a un proceso de migración de partículas (separación gravitacional) más que a un aumento de tamaño de gota (coalescencia). Por otra parte, las emulsiones formuladas con FPC fueron más estables debido a la formación de gotas de menores diámetros y de mayor área interfacial vs. las emulsiones obtenidas con LGD.

Tabla 4.4. Diámetro De Brouker (D [4,3]) de las emulsiones O/W formuladas con fracción enriquecida en fosfatidilcolina (FPC) y lecitina de girasol “deoiled” (LGD)

	D [4,3] (μm)			
	0	7	15	30
FPC 0,5%	0,61 \pm 0,02 ^{ab}	0,62 \pm 0,02 ^a	0,57 \pm 0,01 ^a	0,61 \pm 0,03 ^a
FPC 1,0%	0,53 \pm 0,03 ^a	0,61 \pm 0,03 ^a	0,51 \pm 0,03 ^a	0,53 \pm 0,04 ^a
FPC 2,0%	0,47 \pm 0,02 ^a	0,55 \pm 0,01 ^a	0,53 \pm 0,02 ^a	0,54 \pm 0,02 ^a
LGD 0,5%	1,72 \pm 0,05 ^d	2,51 \pm 0,04 ^d	2,63 \pm 0,02 ^d	2,82 \pm 0,05 ^d
LGD 1,0%	1,39 \pm 0,03 ^c	1,92 \pm 0,04 ^c	1,90 \pm 0,03 ^c	1,87 \pm 0,04 ^c
LGD 2,0%	0,69 \pm 0,01 ^b	0,78 \pm 0,02 ^b	0,81 \pm 0,02 ^b	0,81 \pm 0,01 ^b

Para cada columna, valores promedio \pm DS (n=2) seguidos de letras idénticas no difieren significativamente entre sí ($p \geq 0,05$)

Tabla 4.5. Diámetro De Sauter (D [3,2]) de las emulsiones O/W formuladas con fracción enriquecida en fosfatidilcolina (FPC) y lecitina de girasol “deoiled” (LGD)

	D [3,2] (µm)			
	0	7	15	30
FPC 0,5%	0,39±0,01 ^{ab}	0,40±0,03 ^{ab}	0,36±0,02 ^{ab}	0,40±0,02 ^{ab}
FPC 1,0%	0,34±0,02 ^{ab}	0,35±0,01 ^{ab}	0,33±0,01 ^a	0,35±0,02 ^{ab}
FPC 2,0%	0,29±0,01 ^a	0,31±0,02 ^a	0,29±0,02 ^a	0,30±0,01 ^a
LGD 0,5%	1,19±0,02 ^d	1,68±0,04 ^d	1,69±0,01 ^d	1,96±0,03 ^d
LGD 1,0%	0,84±0,01 ^c	1,48±0,03 ^c	1,46±0,01 ^c	1,42±0,02 ^c
LGD 2,0%	0,42±0,01 ^b	0,49±0,02 ^b	0,43±0,01 ^b	0,44±0,02 ^b

Para cada columna, valores promedio ± DS (n=2) seguidos de letras idénticas no difieren significativamente entre sí ($p \geq 0,05$)

Tabla 4.6. Área interfacial específica de las emulsiones O/W formuladas con fracción enriquecida en fosfatidilcolina (FPC) y lecitina de girasol “deoiled” (LGD)

	AIE (m ² /mL)			
	0	7	15	30
FPC 0,5%	1,54 ± 0,02 ^{cd}	1,50 ± 0,02 ^{bc}	1,67 ± 0,02 ^{bc}	1,50 ± 0,02 ^{bc}
FPC 1,0%	1,76 ± 0,03 ^d	1,71 ± 0,04 ^{cd}	1,82 ± 0,01 ^{cd}	1,71 ± 0,04 ^{cd}
FPC 2,0%	2,07 ± 0,04 ^e	1,94 ± 0,02 ^d	2,07 ± 0,03 ^d	2,00 ± 0,02 ^d
LGD 0,5%	0,50 ± 0,04 ^a	0,36 ± 0,01 ^a	0,36 ± 0,01 ^a	0,31 ± 0,01 ^a
LGD 1,0%	0,71 ± 0,03 ^b	0,41 ± 0,01 ^a	0,41 ± 0,02 ^a	0,42 ± 0,02 ^a
LGD 2,0%	1,43 ± 0,03 ^c	1,22 ± 0,03 ^b	1,40 ± 0,03 ^b	1,36 ± 0,03 ^b

Para cada columna, valores promedio ± DS (n=2) seguidos de letras idénticas no difieren significativamente entre sí ($p \geq 0,05$)

Las emulsiones O/W obtenidas mediante un homogeneizador ultrasónico de alta intensidad presentaron tamaños de gotas inferiores, respecto a las preparadas con un homogeneizador de alta velocidad (Ultraturrax) (ver **Capítulo II, Tabla 2.5**). Este comportamiento puede atribuirse a las características del tipo de homogeneizador empleado, el cual permite obtener tamaños de partícula pequeños (McClements, 1999).

4.3.2. Emulsiones O/W con mucílago de chía como agente espesante

4.3.2.1. Composición del mucílago de chía

En la **Tabla 4.7** se muestra el contenido de proteínas y lípidos correspondiente a los mucílagos de chía obtenidos a partir de ambos métodos de

extracción método I (M1) y II (M2), respectivamente. Como puede observarse, los tenores de proteínas y de lípidos presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) según el método de extracción aplicado, con niveles superiores para M2.

Tabla 4.7. Contenido de proteínas y lípidos de mucílago de chía obtenidos a partir de los métodos de extracción I y II (%b.s.)

	Proteínas	Lípidos
M1	7,29 ^a	3,83 ^a
M2	9,00 ^b	5,78 ^b

Para cada columna, valores promedio seguidos de letras idénticas no difieren significativamente entre sí ($p \geq 0,05$)

4.3.2.2. Estabilidad de las emulsiones O/W con mucílago de chía

Los perfiles de %BS correspondientes a las emulsiones O/W con 0,75% de mucílago de chía (M1 y M2) en función del tiempo de almacenamiento refrigerado se presentan en la **Figura 4.8**. Puede observarse que dichos perfiles permanecen constantes, sin desplazarse en función de la longitud de la celda ni del tiempo de almacenamiento refrigerado. Esto indica una elevada estabilidad de las emulsiones mencionadas durante el periodo de almacenamiento estudiado. Dicho comportamiento de las emulsiones fue similar para ambos tipos de mucílago durante el tiempo de almacenamiento refrigerado ensayado.

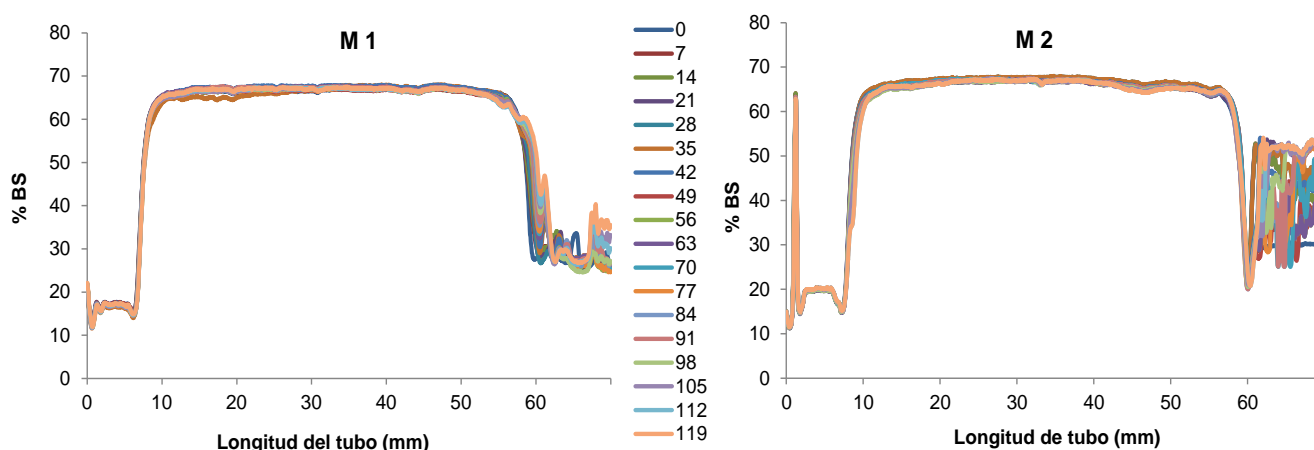


Figura 4.8. Perfiles diferenciales correspondientes a emulsiones O/W (Φ_m 0,10) formuladas con el agregado de 0,75% de mucílago de chía (M1 y M2). Cada línea de color representa un tiempo de almacenamiento diferente (d)

La **Figura 4.9** presenta la cinética de desestabilización de las emulsiones formuladas con diferentes tipos de mucílago de chía (M1 y M2) correspondientes a

las zonas I (10-15 mm) y II (50-55 mm) de la celda de medida. Las emulsiones O/W con ambos mucílago de chía exhibieron una alta estabilidad en las zonas analizadas, durante todo el periodo de almacenamiento estudiado. Las emulsiones con M1 registraron en general un nivel de estabilidad significativamente superior vs. a las emulsiones con M2, si bien dichas diferencias fueron leves. Este hecho puede atribuirse al incremento de la viscosidad de la fase continua debido a la presencia de mucílago de chía, lo que impide el movimiento de las gotas dispersas y, por lo tanto, la probabilidad de que dos gotas se acerquen y se agregen incluso se fusionen es mucho menor. Resultados similares fueron informados para emulsiones O/W formuladas con diferentes concentraciones de goma guar, metilcelulosa, goma de “fenugreek”, “locust bean”, lino, avena (Huang y col., 2001), goma xántica (Sun y col., 2007) y de *Alyssum homolocarpum* (Koocheki y col., 2009).

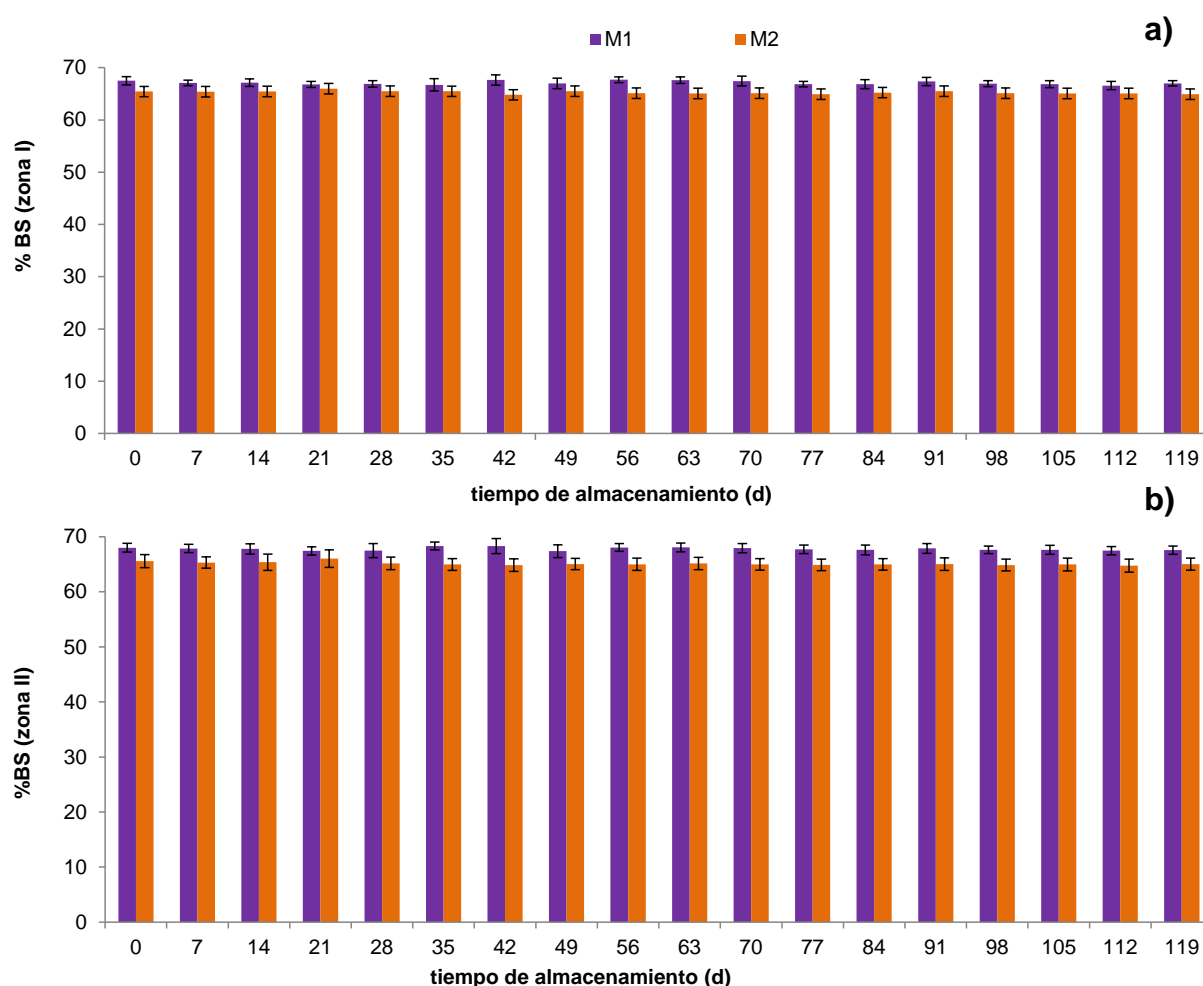


Figura 4.9. Cinéticas de desestabilización de emulsiones O/W (Φ_m 0,10) con mucílago de chía (M1 y M2), **a)** zona I (10-15 mm) y **b)** zona II (50-55 mm)

4.3.2.3. Análisis de la distribución y el tamaño de partículas

En la **Figura 4.10** se muestra la distribución de tamaño de partículas en volumen y en superficie para las emulsiones O/W con M1 y M2 correspondientes a los estadíos inicial y final, respectivamente.

Puede observarse que a tiempo inicial, las emulsiones exhibieron un comportamiento similar independientemente del tipo de mucílago, obteniéndose distribuciones bimodales (**Figura 4.10 a y b**).

Con respecto a las distribuciones de tamaño de partículas en volumen de las emulsiones iniciales ($t = 0$), la población I presentó gotas de tamaño $< 2 \mu\text{m}$, con el máximo del pico aproximadamente a $1 \mu\text{m}$, mientras que la población II tuvo su máximo aproximado a $15 \mu\text{m}$ con diámetros de partículas comprendidos entre 2 y $60 \mu\text{m}$.

Por otra parte, en el periodo final del almacenamiento refrigerado, la distribución de tamaños en volumen para las emulsiones formuladas con M2 presentaron un carácter trimodal (**Figura 4.10 c**), por lo que se puede observar una pequeña población de partículas con diámetros $> 100 \mu\text{m}$ representando sólo una pequeña población dentro de la muestra. Dicha población no tuvo influencia sobre la estabilidad de la emulsión. Por otra parte, las emulsiones formuladas con M1 no presentaron cambios durante el periodo de almacenamiento estudiado.

Las distribuciones de tamaño de partículas en superficie exhibieron un comportamiento similar independientemente del tipo de mucílago, así como del tiempo de almacenamiento refrigerado.

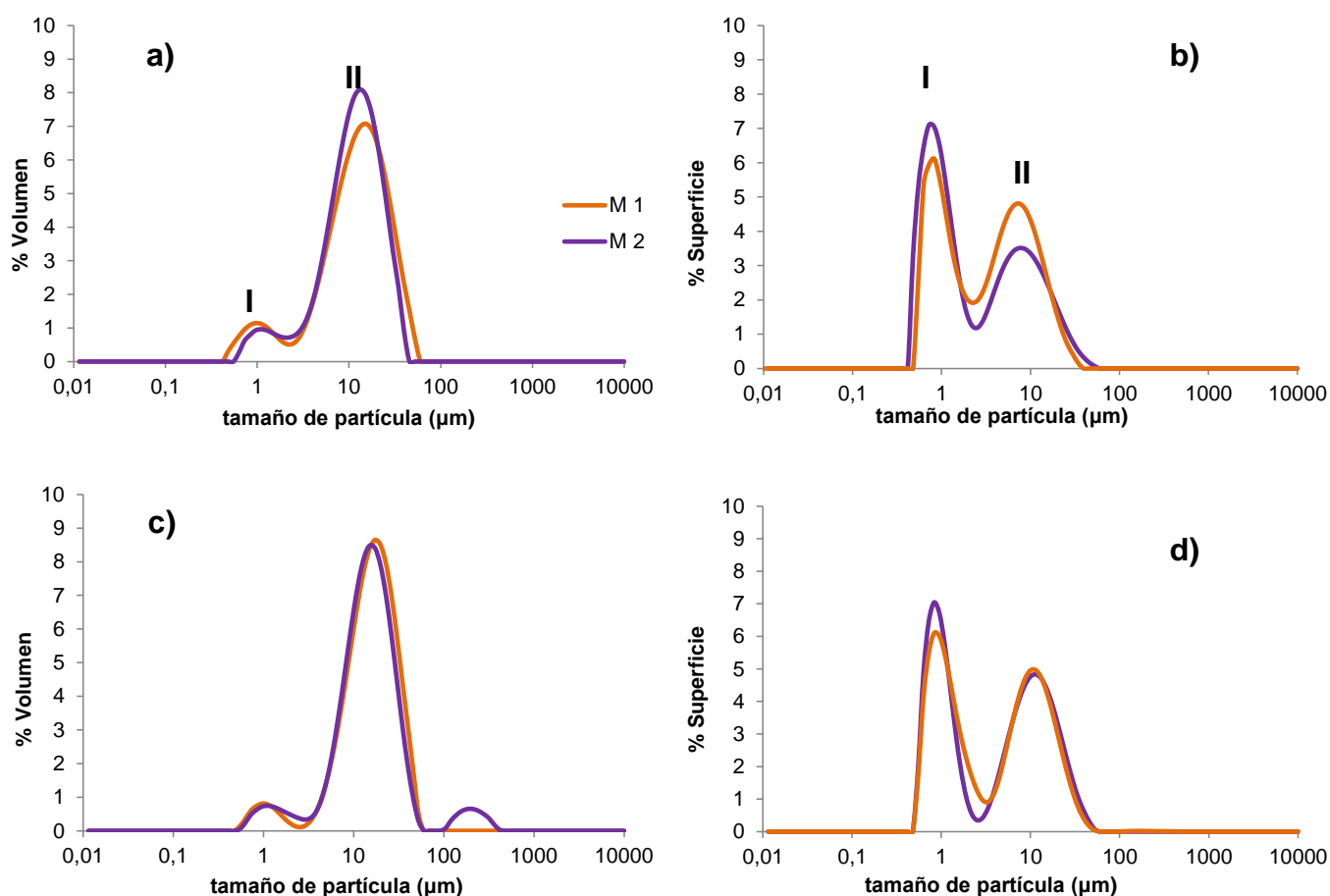


Figura 4.10. Distribución de tamaño de partículas de emulsiones O/W (Φ_m 0,10) con diferentes tipos de mucílagos de chía, en función del almacenamiento a $4\pm 1^\circ\text{C}$, en volumen: **a)** $t=0$ y **c)** $t=120$ d y en superficie **b)** $t=0$ y **d)** $t=120$ d

En la **Tabla 4.8** se muestran los diámetros promedio De Brouker ($D [4,3]$), De Sauter ($D [3,2]$) y el AIE en función del tiempo de almacenamiento refrigerado, correspondientes a las emulsiones O/W formuladas con mucílagos de chía (M1 y M2). En la misma puede observarse que los valores de $D [4,3]$ y $D [3,2]$ de dichas emulsiones presentaron una tendencia de incremento en función del tiempo de almacenamiento. Para las emulsiones con M2, los diámetros promedio alcanzaron sus mayores valores a los 75 d para luego disminuir. Esta disminución podría asociarse a la ruptura de los posibles flóculos agregados débilmente mediante la fuerza externa aplicada durante la medición del tamaño de partículas (Álvarez Cerimedo y col., 2010, Capitani, 2013). El área interfacial creada durante el proceso de homogeneización en las emulsiones O/W con mucílago de chía fue baja $\leq 0,10 \text{ m}^2/\text{mL}$, lo cual está asociado a los mayores tamaños de partícula registrados (**Tabla 4.8**).

Tabla 4.8. Diámetro De Brouker (D [4,3]), De Sauter (D [3,2]) y AIE de las emulsiones O/W con mucílago de chía (M1 y M2)

d	D [4,3] (μm)		D [3,2] (μm)		AIE (m^2/mL)	
	M1	M2	M1	M2	M1	M2
0	13,51 \pm 0,40 ^a	12,18 \pm 0,13 ^a	5,98 \pm 0,09 ^a	5,82 \pm 0,07 ^a	0,10 \pm 0,01 ^a	0,10 \pm 0,01 ^a
15	13,84 \pm 0,10 ^a	12,56 \pm 0,28 ^{ab}	5,83 \pm 0,20 ^a	5,82 \pm 0,09 ^a	0,10 \pm 0,01 ^a	0,10 \pm 0,01 ^a
30	13,88 \pm 0,20 ^a	13,25 \pm 0,02 ^{ab}	6,00 \pm 0,08 ^a	5,97 \pm 0,14 ^a	0,10 \pm 0,01 ^a	0,10 \pm 0,01 ^a
45	14,92 \pm 0,32 ^b	13,66 \pm 0,32 ^b	6,27 \pm 0,15 ^{ab}	6,20 \pm 0,05 ^a	0,10 \pm 0,01 ^a	0,10 \pm 0,01 ^a
60	15,78 \pm 0,02 ^{bc}	13,33 \pm 0,07 ^{ab}	6,42 \pm 0,17 ^b	6,22 \pm 0,06 ^a	0,09 \pm 0,01 ^{ab}	0,10 \pm 0,01 ^a
75	16,58 \pm 0,03 ^c	20,76 \pm 0,27 ^e	6,54 \pm 0,21 ^b	7,33 \pm 0,19 ^c	0,09 \pm 0,01 ^{ab}	0,08 \pm 0,01 ^b
90	16,28 \pm 0,15 ^c	20,19 \pm 0,02 ^d	6,82 \pm 0,18 ^{bc}	7,17 \pm 0,14 ^{bc}	0,09 \pm 0,01 ^{ab}	0,08 \pm 0,01 ^b
120	16,53 \pm 0,35 ^c	17,84 \pm 0,69 ^c	7,19 \pm 0,16 ^c	6,75 \pm 0,08 ^b	0,08 \pm 0,01 ^b	0,09 \pm 0,01 ^{ab}

Para cada columna, valores promedio \pm DS (n=2) seguidos de letras idénticas no difieren significativamente entre sí ($p \geq 0,05$)

4.3.2.4 Microscopía óptica de las emulsiones con mucílago de chía

La microscopía óptica nos brinda una información parcial de la microestructura de las emulsiones. Puede verse si las gotas están o no floculadas y las características de los flóculos formados (Palazolo, 2006). La presencia de flóculos puede atribuirse al balance entre las interacciones coloidales atractivas y repulsivas entre las gotas (McClements, 1999; Palazolo, 2006). Así, si hay predominio de las interacciones atractivas, las gotas se agregan formando flóculos.

La **Figura 4.11** muestra las micrografías obtenidas para las emulsiones formuladas con mucílago de chía (M1 y M2). Las imágenes revelan una amplia distribución de tamaños de partículas. El tamaño predominante se corresponde con la población II de las curvas de distribución de tamaño de partículas, mientras que las gotas más pequeñas se sitúan entre los espacios existentes entre las gotas de mayor tamaño. Las micrografías correspondientes a las emulsiones O/W con diferentes mucílagos de chía, muestran tamaños de gota similares, concordante con lo observado en las distribuciones de tamaño de partículas en volumen y en superficie (**Figura 4.10**).

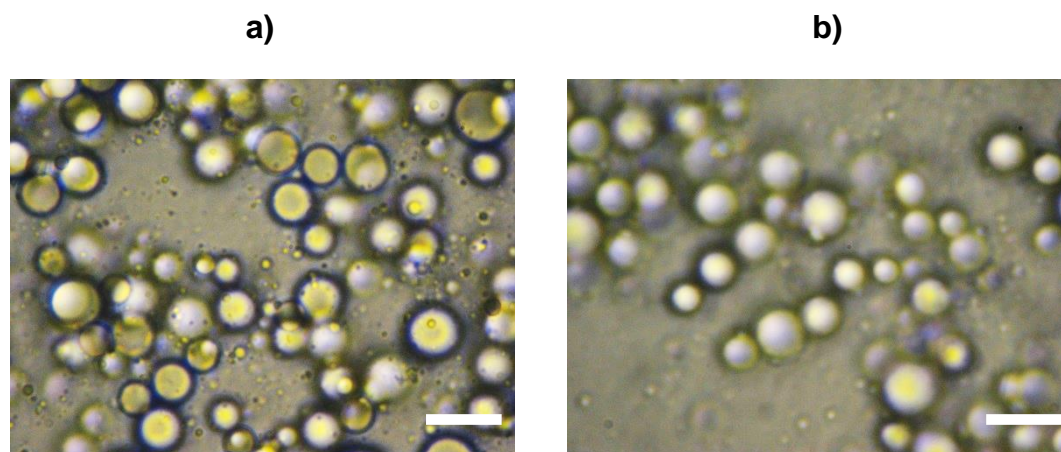


Figura 4.11 Micrográficas ópticas (100 X, 2,5 X) de emulsiones O/W estabilizadas con mucílagos de chía, **a)** M1, **b)** M2. Barras en blanco: 10 μm

4.3.3. Emulsiones O/W (Φ_m 0,10) con lecitinas modificadas de girasol (FPC, LGD) y mucílagos de chía (M1, M2)

4.3.3.1. Estabilidad de las emulsiones O/W con M1 y lecitinas modificadas de girasol (FPC, LGD)

Las emulsiones O/W formuladas con M1 y diferentes concentraciones de lecitinas modificadas de girasol (FPC, LGD) mostraron perfiles diferenciales similares, con una gran estabilidad durante todo el periodo analizado. A modo de ejemplo, la **Figura 4.12** muestra los perfiles de %BS de dos emulsiones con M1 y 0,5% de FPC o de LGD durante el almacenamiento refrigerado.

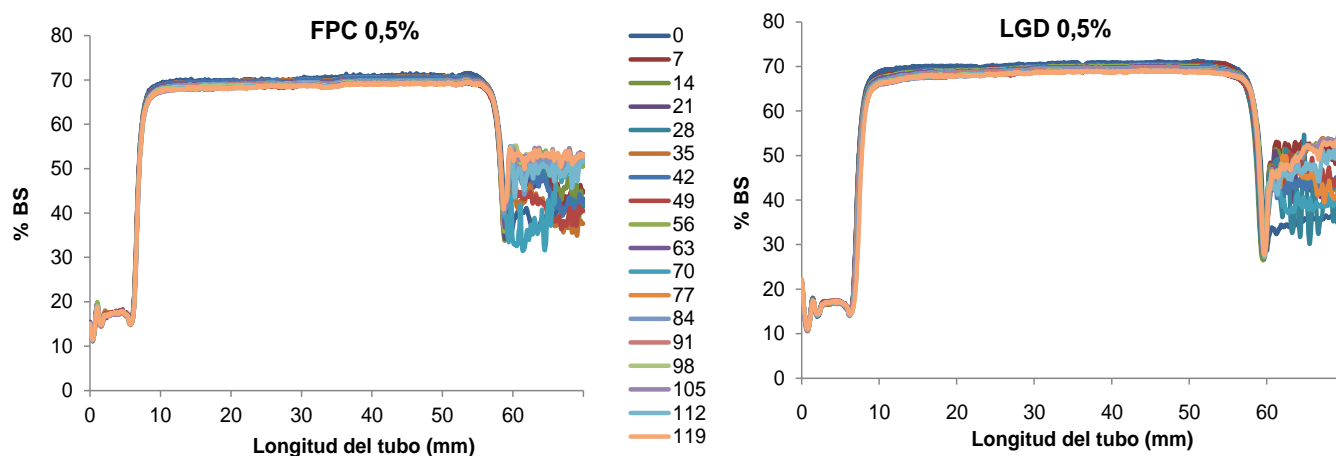


Figura 4.12. Perfiles diferenciales correspondientes a emulsiones O/W (Φ_m 0,10) formuladas con el agregado de M1 y 0,5% de FPC o de LGD, respectivamente. Cada línea de color representa un tiempo de almacenamiento diferente (d)

Las cinéticas de desestabilización de las emulsiones O/W con M1 y diferentes concentraciones de lecitinas modificadas de girasol (FPC, LGD) correspondientes a la zona I pueden observarse en la **Figura 4.13**. En este sentido, a bajas concentraciones de lecitinas modificadas de girasol, las emulsiones presentan menores valores de %BS, es decir menor cantidad de luz dispersada y por ende, se formarían partículas de mayor tamaño. Las emulsiones preparadas con 2,0% de FPC presentaron mayores %BS que aquéllas con LGD de la misma concentración. Para 0,5 y 1,0% no hubo diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre las emulsiones O/W con diferentes lecitinas modificadas de girasol ensayadas. En contraste, los valores de %BS correspondientes a las emulsiones formuladas sólo con M1 fueron inferiores (ver **Figura 4.9**), este hecho sugiere que la interacción entre el mucílago de chía y las lecitinas modificadas de girasol influyen positivamente sobre la estabilidad de las emulsiones O/W.

Las cinéticas de desestabilización de la fase crema (zona II) de las emulsiones O/W con diferente tipo y concentración de agentes emulsificantes y presencia de M1, presentaron un comportamiento similar al observado en las cinéticas de la zona I (datos no mostrados).

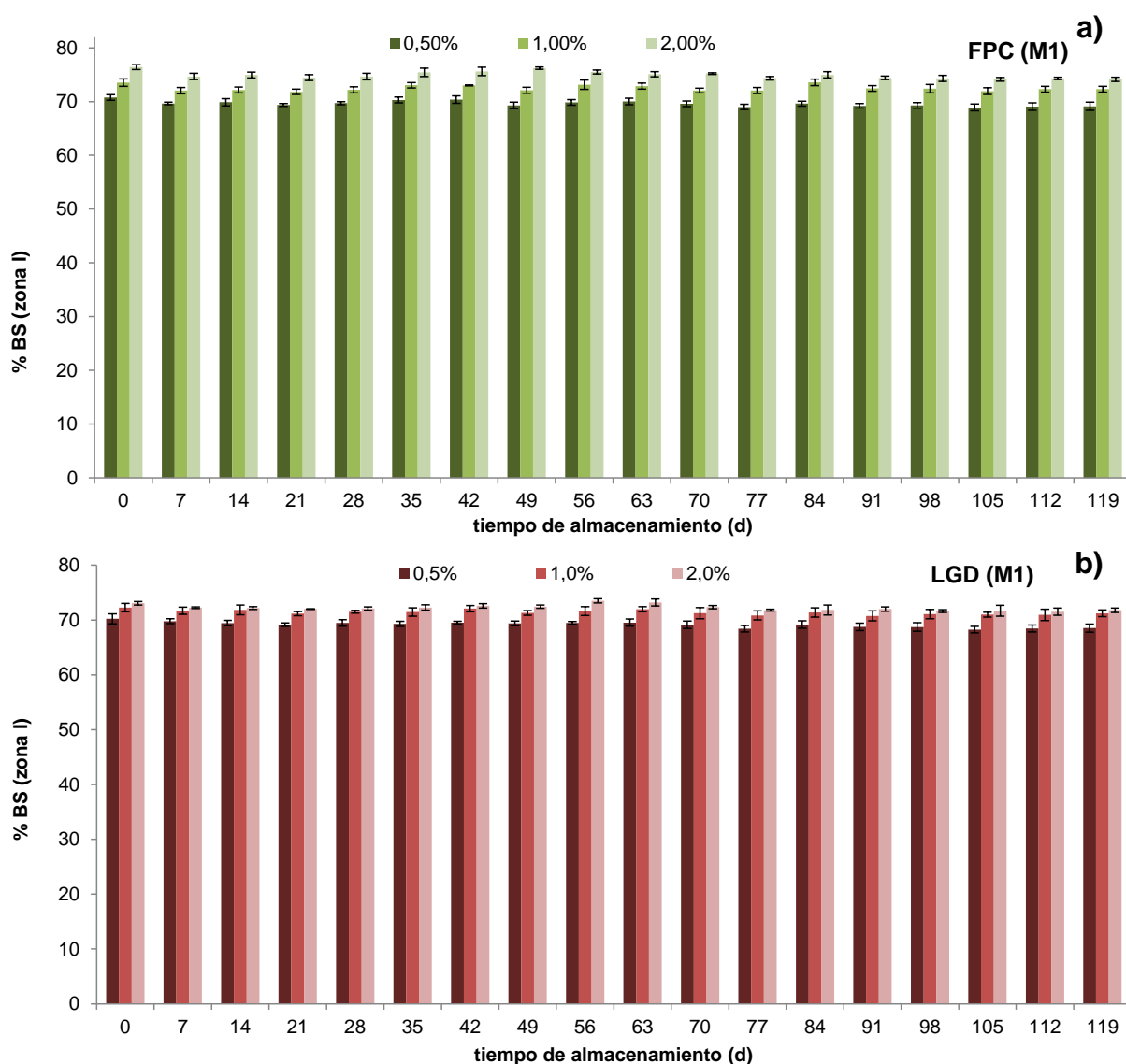


Figura 4.13. Cinética de desestabilización de emulsiones O/W (Φ_m 0,10), con diferentes concentraciones de agente emulsificante: **a)** FPC, **b)** LGD y presencia de M1, correspondientes a la zona I (10-15 mm). Valores promedio \pm SD (n=2).

4.3.3.2. Análisis de la distribución y tamaño de partículas de las emulsiones O/W con M1 y lecitinas modificadas de girasol (FPC, LGD)

Las Figuras 4.14 y 4.15 muestran las distribuciones de tamaño de partículas en volumen y en superficie para las emulsiones O/W con M1 y lecitinas modificadas de girasol (FPC, LGD), a tiempos inicial y final, respectivamente. En las mismas se evidencia el desplazamiento de las curvas hacia la derecha en función de la disminución de la concentración de los agentes emulsificantes.

Cabe señalar que a tiempos cortos las emulsiones con diferentes concentraciones de FPC exhibieron distribuciones de carácter monomodal (**Figura**

4.14 a, b). Por otra parte, las emulsiones formuladas con LGD, presentaron una distribución en volumen de tamaño de partículas de tipo bimodal para todas las concentraciones (**Figura 4.14 c**) y monomodal para la distribución en superficie (**Figura 4.14 d**). A tiempos prolongados, las emulsiones formuladas con M1 exhibieron distribuciones en volumen de carácter bimodal para todos los tipos y concentraciones de agente emulsificante (**Figura 4.15 a, c**). En cambio, las distribuciones en superficie fueron monomodales para las diferentes emulsiones con M1 (**Figura 4.15 b, d**).

Durante el almacenamiento se observó que las distribuciones de tamaño de partícula expresadas en superficie fueron similares para las diferentes emulsiones. Con respecto a las distribuciones en volumen, las emulsiones con LGD mostraron un incremento en la población de gotas de mayor tamaño y las emulsiones con FPC un cambio de perfil de monomodal a bimodal. Si bien se observaron modificaciones en la distribución del tamaño de partículas en volumen durante el periodo de almacenamiento refrigerado, dichas variaciones no se evidenciaron en la estabilidad física de las emulsiones O/W.

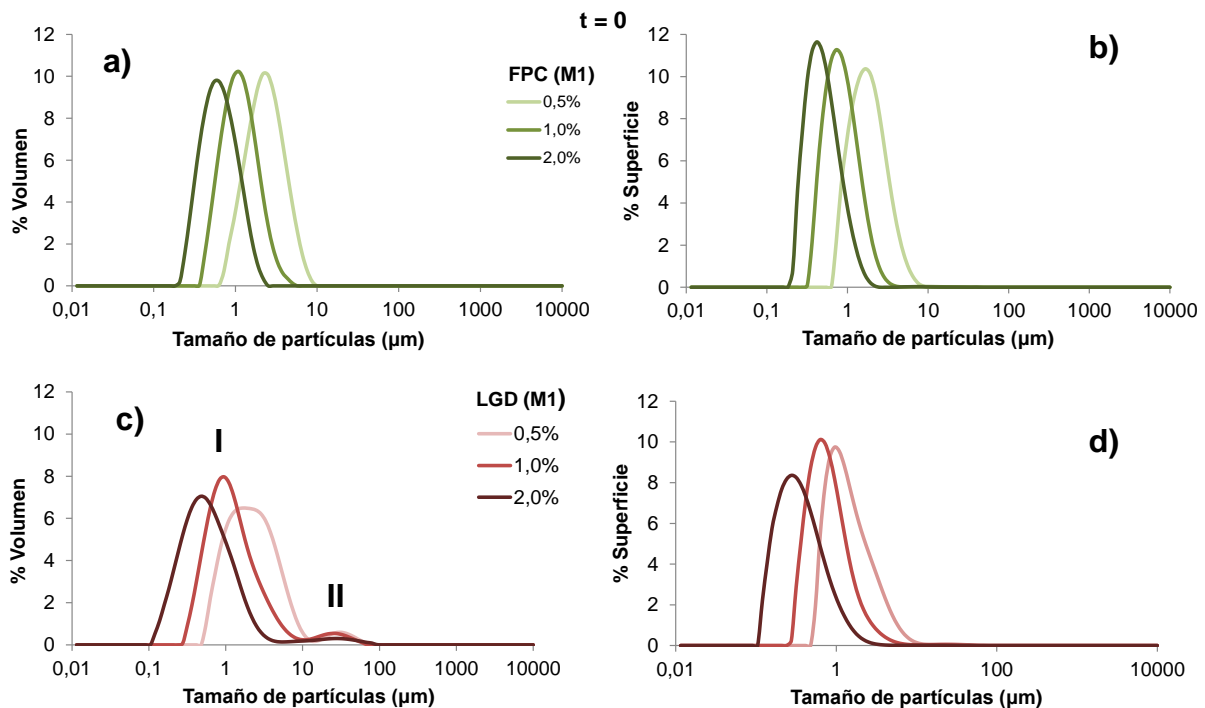


Figura 4.14. Distribución de tamaño de partículas de emulsiones O/W (Φ_m 0,10) a $t=0$ con mucílago de chía 1 (M1) y agente emulsificante (FPC, LGD). Distribución en volumen: **a)** FPC; **c)** LGD y en superficie: **b)** FPC; **d)** LGD

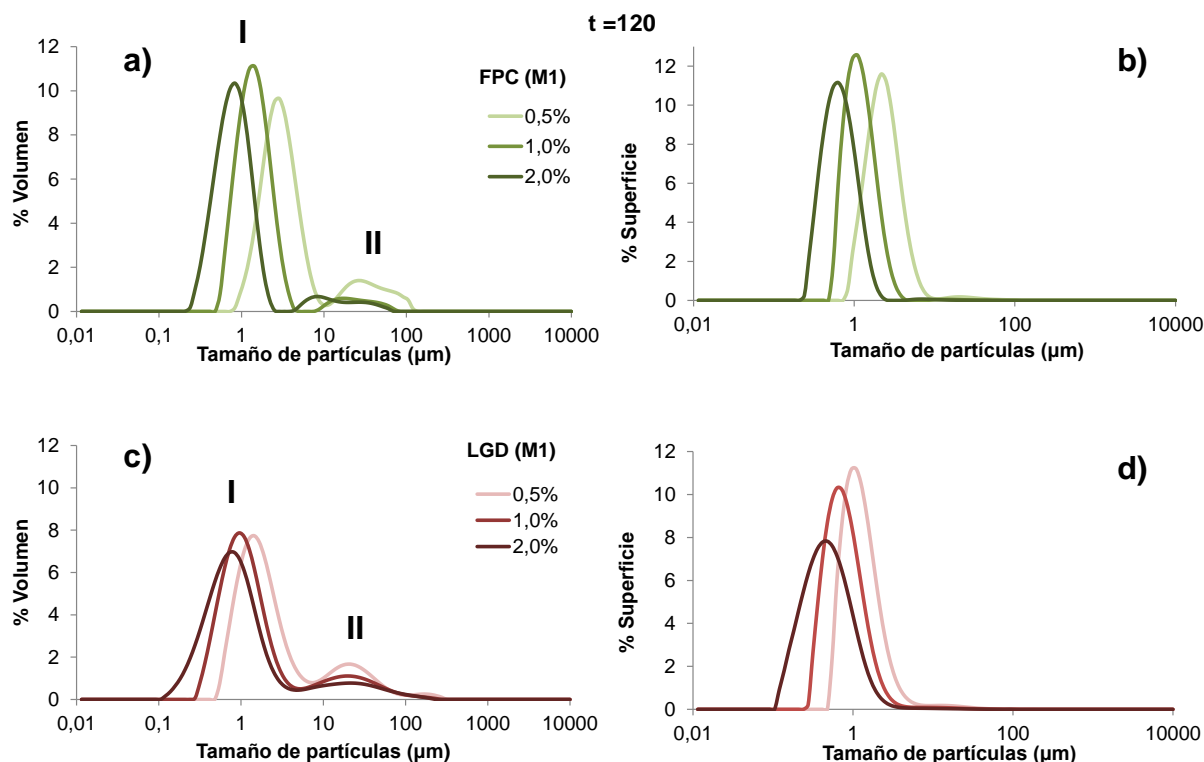


Figura 4.15. Distribución de tamaño de partículas de las emulsiones O/W (Φ_m 0,10) a $t=120$ d con mucílago de chía 1 (M1) y agente emulsificante (FPC, LGD). Distribución en volumen **a)** FPC; **c)** LGD y en superficie **b)** FPC; **d)** LGD

En las **Tablas 4.9, 4.10 y 4.11** se muestran los diámetros promedio de De Brouker D [4,3], De Sauter (D [3,2]) y el área interfacial específica (AIE) correspondientes a las emulsiones conteniendo M1 en función del tiempo de almacenamiento refrigerado, respectivamente.

En la **Tablas 4.9 y 4.10** puede observarse que los diámetros promedio De Brouker D [4,3] y De Sauter D [3,2] de las emulsiones O/W con M1 disminuyeron significativamente ($p \leq 0,05$) en función del aumento de la concentración de FPC y de LGD, dichas diferencias se mantuvieron durante todo el periodo de almacenamiento estudiado. Los valores de D [4,3] para las emulsiones O/W conteniendo 0,5% de lecitinas modificadas de girasol, no presentaron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre FPC y LGD durante el almacenamiento. Niveles de 1,0% de FPC exhibieron valores de D [4,3] significativamente menores ($p \leq 0,05$) respecto a las emulsiones con LGD para tiempos 0 y 120 d. Los valores de D [4,3] de las emulsiones O/W con 2,0% de FPC fueron significativamente menores ($p \leq 0,05$) a partir de los 60 d de almacenamiento, respecto a las emulsiones con LGD a la misma concentración (**Tabla 4.9**).

En lo que se refiere al tiempo de almacenamiento refrigerado, los valores de D [4,3] de las diferentes emulsiones O/W presentaron incrementos significativos ($p \leq 0,05$) en el primer mes, permaneciendo luego estables (**Tabla 4.9**). Este comportamiento se evidenció en las distribuciones de tamaño de partículas a través de la formación y/o incremento de una segunda población de gotas de mayor tamaño (ver **Figura 4.15. a y c**)

Con respecto a los diámetros promedio De Sauter D [3,2] correspondientes a las emulsiones O/W con M1 y concentraciones del 0,5 y 1,0% de FPC en general, fueron significativamente mayores ($p \leq 0,05$) respecto a los obtenidos en las emulsiones con LGD. No obstante, concentraciones del 2,0% de agente emulsificante no presentaron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre los distintos tipos de lecitinas modificadas (FPC, LGD) durante todo el periodo de almacenamiento estudiado (**Tabla 4.10**).

El área interfacial específica muestra que las emulsiones presentaron mayor valor de este parámetro ($p \leq 0,05$) en función del aumento de la concentración de los agentes emulsificantes (FPC y/o LGD) durante todo el almacenamiento refrigerado (**Tabla 4.11**).

Tabla 4.9. Diámetro promedio de De Brouker (D [4,3] μm) de las emulsiones O/W preparadas con mucílago de chía (M1) y diferentes concentraciones de agente emulsificante (FPC, LGD) durante el almacenamiento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$

	0	30	60	90	120
FPC 0,5%	2,24 \pm 0,29 ^{ab}	9,73 \pm 0,33 ^c	9,75 \pm 0,35 ^d	9,46 \pm 0,56 ^d	9,17 \pm 0,11 ^d
FPC 1,0%	1,90 \pm 0,06 ^a	5,60 \pm 0,28 ^b	5,77 \pm 0,27 ^{bc}	5,36 \pm 0,39 ^c	4,64 \pm 0,19 ^b
FPC 2,0%	1,52 \pm 0,16 ^a	3,76 \pm 0,22 ^a	3,01 \pm 0,40 ^a	3,02 \pm 0,18 ^a	2,58 \pm 0,10 ^a
LGD 0,5%	4,90 \pm 0,30 ^c	9,15 \pm 0,14 ^c	9,43 \pm 0,29 ^d	8,49 \pm 0,13 ^d	8,82 \pm 0,11 ^d
LGD 1,0%	2,97 \pm 0,31 ^b	5,61 \pm 0,13 ^b	6,54 \pm 0,18 ^c	6,05 \pm 0,27 ^c	6,26 \pm 0,02 ^c
LGD 2,0%	1,86 \pm 0,19 ^a	4,35 \pm 0,41 ^a	4,77 \pm 0,13 ^b	4,30 \pm 0,04 ^b	4,91 \pm 0,32 ^b

Para cada columna, valores promedio \pm DS (n=2) seguidos de letras idénticas no difieren significativamente entre sí ($p \geq 0,05$)

Tabla 4.10. Diámetros promedio De Sauter ($D [3,2] \mu\text{m}$), de las emulsiones O/W preparadas con mucílago de chía (M1) y diferentes concentraciones de agente emulsificante (FPC, LGD) durante el almacenamiento a $4\pm 1^\circ\text{C}$

	0	30	60	90	120
FPC 0,5%	$1,74 \pm 0,21^c$	$3,04 \pm 0,06^d$	$3,20 \pm 0,20^e$	$3,06 \pm 0,09^e$	$3,14 \pm 0,07^e$
FPC 1,0%	$0,94 \pm 0,04^b$	$1,55 \pm 0,06^b$	$1,59 \pm 0,05^c$	$1,40 \pm 0,05^c$	$1,36 \pm 0,02^c$
FPC 2,0%	$0,54 \pm 0,01^a$	$0,60 \pm 0,01^a$	$0,63 \pm 0,01^a$	$0,66 \pm 0,09^a$	$0,71 \pm 0,04^a$
LGD 0,5%	$1,71 \pm 0,10^c$	$2,04 \pm 0,07^c$	$1,92 \pm 0,04^d$	$1,83 \pm 0,06^d$	$1,84 \pm 0,03^d$
LGD 1,0%	$0,93 \pm 0,02^b$	$1,28 \pm 0,01^b$	$1,10 \pm 0,08^b$	$0,99 \pm 0,14^b$	$1,08 \pm 0,02^b$
LGD 2,0%	$0,43 \pm 0,01^a$	$0,66 \pm 0,05^a$	$0,67 \pm 0,01^a$	$0,59 \pm 0,04^a$	$0,70 \pm 0,01^a$

Para cada columna, valores promedio \pm DS ($n=2$) seguidos de letras idénticas no difieren significativamente entre sí ($p \geq 0,05$)

Tabla 4.11. Área interfacial específica (AIE m^2/mL) de las emulsiones O/W preparadas con mucílago de chía (M1) y diferentes concentraciones de agente emulsificante (FPC, LGD) durante el almacenamiento a $4\pm 1^\circ\text{C}$

	0	30	60	90	120
FPC 0,5%	$0,35 \pm 0,04^a$	$0,20 \pm 0,01^a$	$0,19 \pm 0,01^a$	$0,20 \pm 0,01^a$	$0,19 \pm 0,01^a$
FPC 1,0%	$0,64 \pm 0,03^b$	$0,39 \pm 0,02^{bc}$	$0,38 \pm 0,03^b$	$0,43 \pm 0,01^b$	$0,44 \pm 0,01^c$
FPC 2,0%	$1,11 \pm 0,03^c$	$1,01 \pm 0,02^d$	$0,95 \pm 0,01^d$	$0,91 \pm 0,10^c$	$0,85 \pm 0,05^e$
LGD 0,5%	$0,35 \pm 0,02^a$	$0,29 \pm 0,01^{ab}$	$0,31 \pm 0,01^b$	$0,33 \pm 0,01^a$	$0,33 \pm 0,01^b$
LGD 1,0%	$0,64 \pm 0,01^b$	$0,47 \pm 0,01^c$	$0,55 \pm 0,04^c$	$0,61 \pm 0,08^b$	$0,56 \pm 0,01^d$
LGD 2,0%	$1,39 \pm 0,02^d$	$0,91 \pm 0,06^d$	$0,89 \pm 0,02^d$	$1,01 \pm 0,07^c$	$0,85 \pm 0,01^e$

Para cada columna, valores promedio \pm DS ($n=2$) seguidos de letras idénticas no difieren significativamente entre sí ($p \geq 0,05$)

La evaluación comparativa de las emulsiones obtenidas sólo con M1 (ver **Tabla 4.8**) respecto de aquéllas obtenidas con M1 y lecitinas modificadas de girasol sugiere una importante influencia de la presencia de las lecitinas modificadas de girasol sobre los tamaños de partículas obtenidos. La posible interacción entre el mucílago de chía y las lecitinas favorecería la obtención de partículas de menor diámetro, mayor área interfacial y por ende de mayor estabilidad. La adición de 0,75% p/p de mucílago de chía M1 contribuyó a una mayor estabilidad de las emulsiones estudiadas, si bien las mismas presentaron menores valores de AIE respecto de las formuladas sólo con lecitinas modificadas de girasol debido a su capacidad de incrementar la viscosidad de la fase acuosa (ver **Tablas 4.6; 4.11; Figuras 4.4 y 4.12**)

4.3.3.3 Estabilidad de las emulsiones O/W con M2 y lecitinas modificadas de girasol (FPC, LGD)

La **Figura 4.16** muestra dos ejemplos representativos de la evolución de los perfiles diferenciales de %BS correspondientes a emulsiones O/W formuladas con M2 y lecitinas modificadas de girasol (FPC, LGD). En todos los casos, en la base del tubo (aprox. 7–11 mm) se observó un pequeño desplazamiento de los perfiles de izquierda a derecha a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento refrigerado, debido a la disminución de la luz dispersada o clarificación.

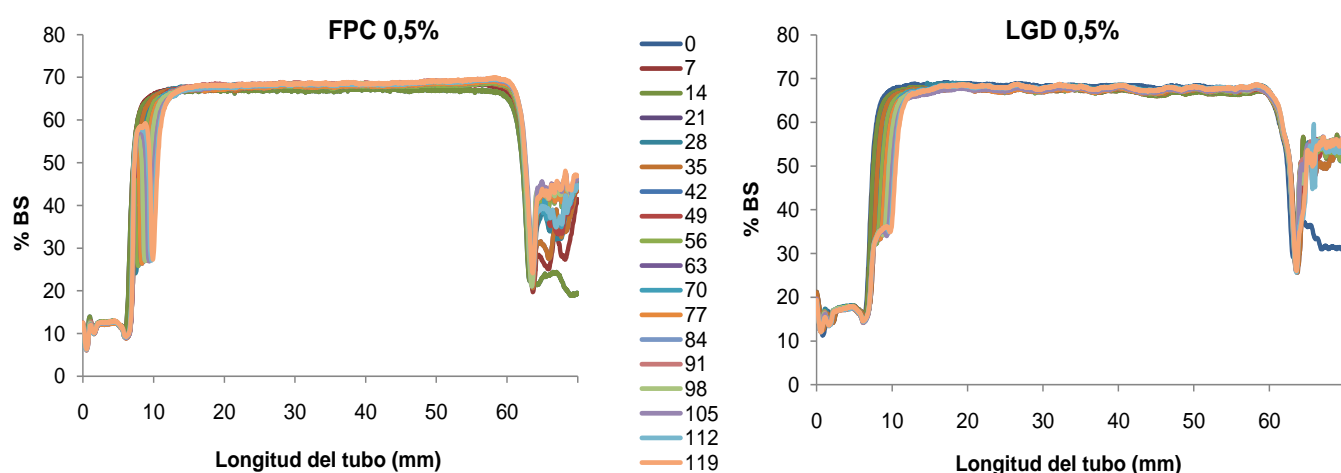


Figura 4.16. Perfiles diferenciales correspondientes a emulsiones O/W (Φ_m 0,10) formuladas con el agregado de M2 y 0,5% de FPC o de LGD, respectivamente. Cada línea de color representa un tiempo de almacenamiento diferente (d)

En la **Figura 4.17** puede visualizarse la cinética de desestabilización de las emulsiones O/W formuladas con M2 y diferentes tipos y concentraciones de lecitinas modificadas de girasol (FPC, LGD), correspondiente a la zona I del tubo. Los valores de %BS disminuyeron en función del tiempo de almacenamiento, observándose este comportamiento en las diferentes emulsiones O/W evaluadas, indicando la desestabilización de las mismas.

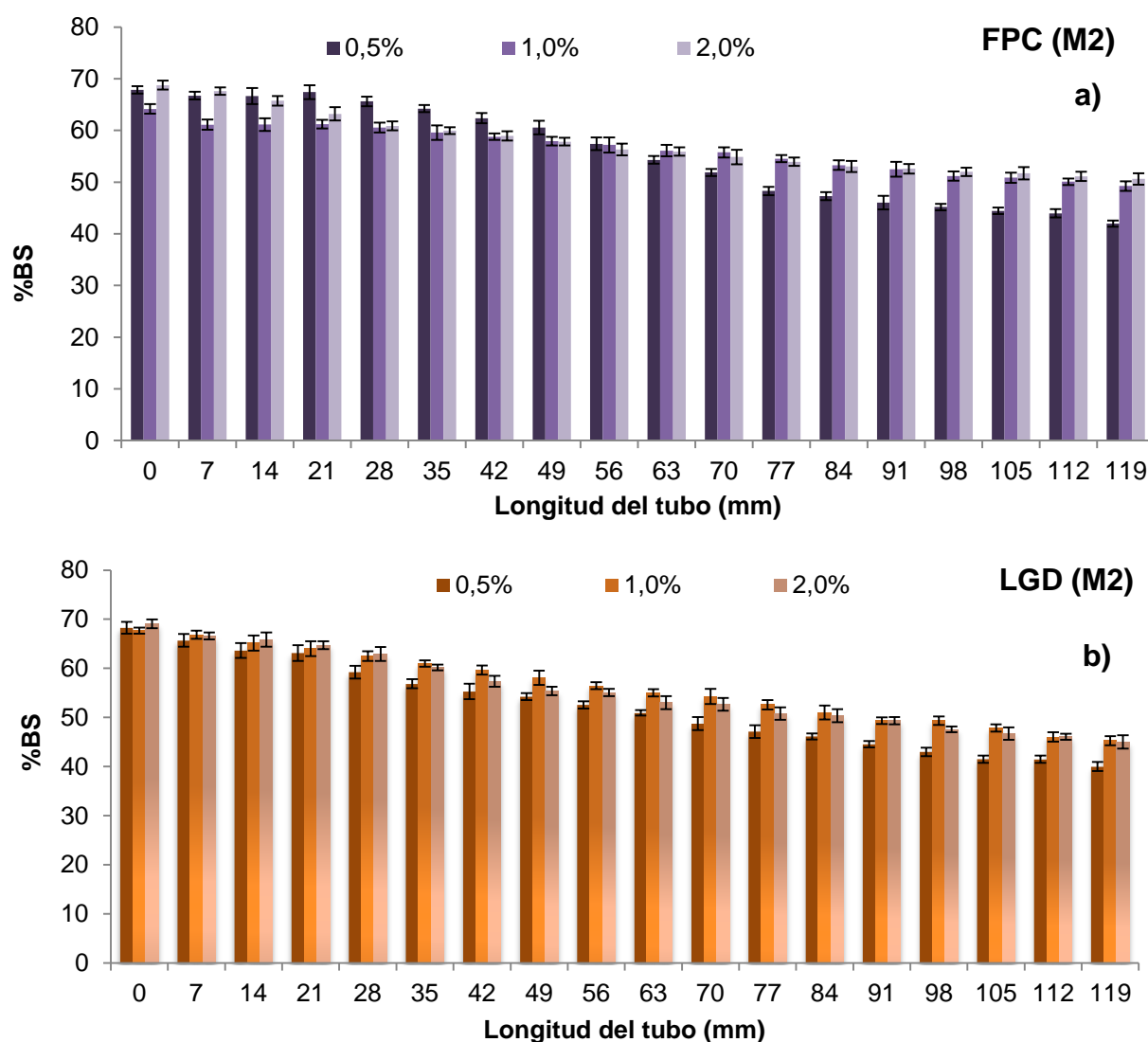


Figura 4.17. Cinética de desestabilización de emulsiones O/W (Φ_m 0,10), con diferentes concentraciones de agente emulsificante: **a)** FPC, **b)** LGD y presencia de M2, correspondientes a la zona I. Valores promedio \pm SD (n=2).

Cabe destacar que en las emulsiones formuladas con M1 y diferentes tipos y concentraciones de lecitinas modificadas de girasol (FPC, LGD) permanecieron estables durante el periodo de almacenamiento refrigerado estudiado. Este hecho puede atribuirse a la composición de M1, la cual tiene asociado un menor tenor de proteínas y de lípidos (ver **Tabla 4.7**). Dicho comportamiento está de acuerdo con los resultados obtenidos por Capitani (2013), quien estudió emulsiones O/W con aceite de maíz (fase oleosa), Tween 80 (agente emulsificante) y mucílagos de chía con diferentes tenores de proteínas y de lípidos, observando que un menor nivel porcentual de proteínas contribuyó a una mejor estabilidad física de estos sistemas.

Estudios realizados por Garti y col., (1997) en goma de “fenugreek” y por Wang y col., (2011) en mucílago de lino han indicado que los polisacáridos que

presentan un cierto contenido de proteínas pueden no afectar o bien contribuir a una mejor estabilidad física de emulsiones O/W. Sin embargo, este comportamiento puede variar según las interacciones presentes entre las proteínas y los polisacáridos, ya que si las interacciones son débiles o repulsivas, es frecuente que estos sistemas presenten una separación de fases a nivel macroscópico e incluso a nivel microscópico (Dickinson, 2003).

4.3.3.4. Análisis de la distribución y tamaño de partículas de las emulsiones con M2 y lecitinas modificadas de girasol (FPC, LGD)

Las distribuciones de tamaño de partículas en volumen para las emulsiones formuladas con 1,0 y 2,0% de ambos agentes emulsificantes (FPC, LGD), presentaron curvas con tamaños de gotas a partir de 0,1 μm . Las emulsiones con LGD evidenciaron picos más bajos y anchos comparados con las emulsiones con FPC. Las curvas de distribución resultaron monomodales para emulsiones con LGD y 2,0% de FPC (**Figuras 4.18 a, c**). Las emulsiones con 0,5 y 1,0% de FPC reflejaron una segunda población de gotas de mayor tamaño a $t=0$. Luego de 120 d de almacenamiento, todas las distribuciones en volumen exhibieron un carácter bimodal con un segunda población pequeña de tamaños de gota mayores.

Las distribuciones de tamaño de partículas en superficie para los diferentes tipos y concentraciones de agente emulsificante presentaron carácter monomodal durante el almacenamiento a $4\pm 1^\circ\text{C}$.

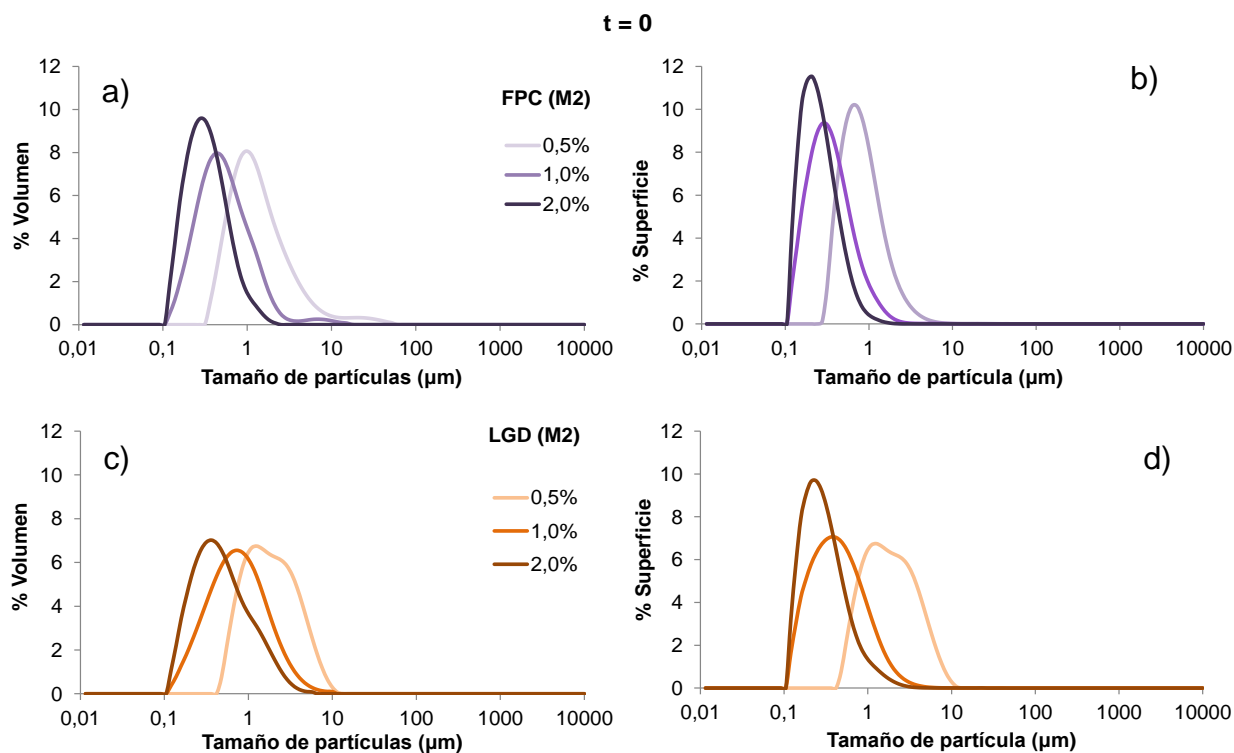


Figura 4.18. Distribución de tamaño de partículas de las emulsiones O/W a t=120 d con mucílago de chía 2 (M2) y agente emulsificante (FPC, LGD). Distribuciones en volumen: **a)** FPC; **c)** LGD. Distribuciones en superficie: **b)** FPC; **d)** LGD

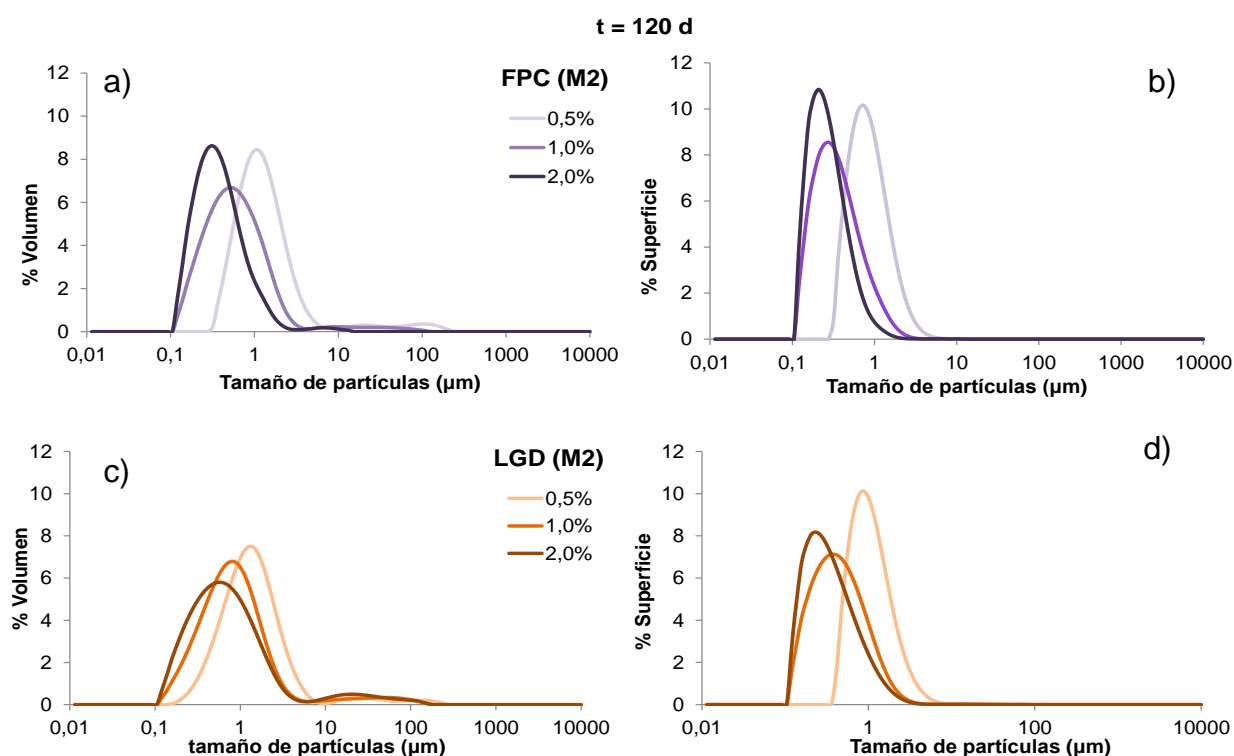


Figura 4.19. Distribuciones de tamaño de partícula de las emulsiones O/W a t=120 d con mucílago de chía 2 (M2) y agente emulsificante (FPC, LGD). Distribuciones en volumen: **a)** FPC; **c)** LGD. Distribuciones en superficie: **b)** FPC; **d)** LGD

En las **Tablas 4.12, 4.13 y 4.14** se muestran los diámetros promedio (D [4,3]; D [3,2]) y el área interfacial específica creada (AIE), respectivamente; correspondiente a las emulsiones formuladas con M2 y diferente concentración y tipo de lecitina modificada de girasol en función del tiempo de almacenamiento refrigerado.

Los valores de D [4,3] de las emulsiones disminuyen en función del aumento de la concentración del agente emulsificante (FPC, LGD). Las emulsiones preparadas con FPC presentaron diámetros significativamente menores ($p \leq 0,05$) para todas las concentraciones estudiadas vs. emulsiones con LGD durante el periodo del almacenamiento refrigerado (**Tabla 4.12**). Este comportamiento es similar al observado en las emulsiones sin presencia de mucílago (**Tabla 4.4**). A su vez, los valores de los diámetros promedio De Brouker (D [4,3]) para las emulsiones con M2 no registraron una tendencia definida de variación durante el almacenamiento.

Los valores de los diámetros promedio De Sauter D [3,2] correspondientes a las diferentes emulsiones con M2 no presentaron incrementos significativos ($p \geq 0,05$) en función del tiempo de almacenamiento (**Tabla 4.13**). Los diámetros D [3,2] de las emulsiones preparadas con 0,5% de emulsificante resultaron ser significativamente mayores ($p \leq 0,05$) en las emulsiones con LGD durante el almacenamiento refrigerado respecto a las formuladas con FPC. Concentraciones del 1,0% no registraron importantes diferencias significativas en los tamaños de gotas obtenidos con FPC o LGD. Para concentraciones del 2,0%, los diferentes tipos de agentes emulsificantes no evidenciaron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) durante todo el periodo de almacenamiento estudiado (**Tabla 4.12**).

Análogamente a lo observado en emulsiones O/W con M1 y lecitinas modificadas de girasol, el AIE aumentó significativamente ($p \leq 0,05$) en función del aumento de la concentración de los agentes emulsificantes (**Tabla 4.11**).

La evaluación comparativa de las emulsiones O/W (Φ_m 0,10) con lecitinas modificadas de girasol (LGD, FPC) y M1 o M2 indicaría una cierta influencia del tipo de mucílago de chía empleado. Así las emulsiones formuladas con M1 presentaron una mayor estabilidad en términos principalmente de su caracterización óptica (QuickScan). Este comportamiento podría estar relacionado con el contenido de lípidos y proteínas de los diferentes mucílagos de chía utilizados.

Tabla 4.12. Diámetro promedio de De Brouker (D [4,3] μm) de las emulsiones O/W preparadas con mucílago de chía (M2) y diferentes concentraciones de agente emulsificante (FPC, LGD) durante el almacenamiento a $4\pm 1^\circ\text{C}$

	0	30	60	90	120
FPC 0,5%	2,18 \pm 0,04 ^d	2,55 \pm 0,13 ^d	2,02 \pm 0,19 ^{cd}	3,88 \pm 0,02 ^d	3,34 \pm 0,05 ^c
FPC 1,0%	0,78 \pm 0,09 ^b	0,82 \pm 0,07 ^b	0,87 \pm 0,03 ^b	1,83 \pm 0,17 ^b	1,59 \pm 0,12 ^b
FPC 2,0%	0,37 \pm 0,01 ^a	0,38 \pm 0,01 ^a	0,39 \pm 0,01 ^a	0,47 \pm 0,05 ^a	0,44 \pm 0,01 ^a
LGD 0,5%	2,80 \pm 0,15 ^e	3,61 \pm 0,08 ^e	2,74 \pm 0,06 ^e	4,43 \pm 0,13 ^e	4,32 \pm 0,06 ^d
LGD 1,0%	1,41 \pm 0,14 ^c	2,32 \pm 0,03 ^d	2,34 \pm 0,30 ^d	3,21 \pm 0,09 ^c	2,50 \pm 0,33 ^{bc}
LGD 2,0%	0,90 \pm 0,02 ^b	1,35 \pm 0,12 ^c	1,59 \pm 0,02 ^c	2,26 \pm 0,16 ^b	2,22 \pm 0,26 ^b

Para cada columna, valores promedio \pm DS (n=2) seguidos de letras idénticas no difieren significativamente entre sí ($p \geq 0,05$)

Tabla 4.13. Diámetros promedio De Sauter (D [3,2] μm), de las emulsiones O/W preparadas con mucílago de chía (M2) y diferentes concentraciones de agente emulsificante (FPC, LGD) durante el almacenamiento a $4\pm 1^\circ\text{C}$

	0	30	60	90	120
FPC 0,5%	0,97 \pm 0,05 ^d	0,94 \pm 0,04 ^b	0,93 \pm 0,04 ^c	0,98 \pm 0,01 ^c	1,03 \pm 0,04 ^c
FPC 1,0%	0,39 \pm 0,01 ^b	0,37 \pm 0,01 ^a	0,39 \pm 0,01 ^a	0,42 \pm 0,01 ^b	0,39 \pm 0,01 ^{ab}
FPC 2,0%	0,27 \pm 0,01 ^a	0,27 \pm 0,01 ^a	0,28 \pm 0,01 ^a	0,30 \pm 0,01 ^a	0,29 \pm 0,01 ^a
LGD 0,5%	1,42 \pm 0,04 ^e	1,42 \pm 0,07 ^c	1,29 \pm 0,07 ^d	1,30 \pm 0,09 ^d	1,25 \pm 0,06 ^d
LGD 1,0%	0,53 \pm 0,02 ^c	0,81 \pm 0,06 ^b	0,79 \pm 0,02 ^b	0,57 \pm 0,02 ^b	0,47 \pm 0,02 ^b
LGD 2,0%	0,35 \pm 0,01 ^{ab}	0,35 \pm 0,01 ^a	0,37 \pm 0,01 ^a	0,35 \pm 0,04 ^a	0,36 \pm 0,02 ^{ab}

Para cada columna, valores promedio \pm DS (n=2) seguidos de letras idénticas no difieren significativamente entre sí ($p \geq 0,05$)

Tabla 4.14. Área interfacial específica (AIE m^2/mL) de las emulsiones O/W preparadas con mucílago de chía (M2) y diferentes concentraciones de agente emulsificante (FPC, LGD) durante el almacenamiento a $4\pm 1^\circ\text{C}$

	0	30	60	90	120
FPC 0,5%	0,62 \pm 0,03 ^b	0,64 \pm 0,02 ^b	0,65 \pm 0,03 ^b	0,61 \pm 0,01 ^a	0,59 \pm 0,02 ^a
FPC 1,0%	1,53 \pm 0,01 ^d	1,62 \pm 0,03 ^c	1,55 \pm 0,03 ^d	1,44 \pm 0,01 ^c	1,55 \pm 0,01 ^c
FPC 2,0%	2,22 \pm 0,03 ^f	2,23 \pm 0,04 ^d	2,17 \pm 0,02 ^e	2,03 \pm 0,01 ^d	2,07 \pm 0,01 ^d
LGD 0,5%	0,42 \pm 0,01 ^a	0,42 \pm 0,02 ^a	0,47 \pm 0,02 ^a	0,56 \pm 0,12 ^a	0,48 \pm 0,02 ^a
LGD 1,0%	1,13 \pm 0,04 ^c	0,74 \pm 0,05 ^b	0,76 \pm 0,02 ^c	1,05 \pm 0,04 ^b	1,27 \pm 0,06 ^b
LGD 2,0%	1,70 \pm 0,01 ^e	1,70 \pm 0,04 ^c	1,63 \pm 0,03 ^d	1,41 \pm 0,12 ^c	1,68 \pm 0,09 ^c

Para cada columna, valores promedio \pm DS (n=2) seguidos de letras idénticas no difieren significativamente entre sí ($p \geq 0,05$)

4.3.3.5. Microscopía óptica de las emulsiones con lecitinas modificadas de girasol (FPC, LGD) y mucílago de chía (M1)

En la **Figura 4.20** se presentan las micrografías ópticas correspondientes a las emulsiones formuladas con diferentes concentraciones de lecitinas modificadas de girasol y mucílago de chía M1. A través de las mismas es posible complementar la información obtenida mediante la distribución de tamaño de partículas y del analizador vertical de barrido (QuickScan). Puede apreciarse una disminución del tamaño de partículas al aumentar la concentración del agente emulsificante (FPC, LGD). Similar tendencia fue observada para emulsiones con M2.

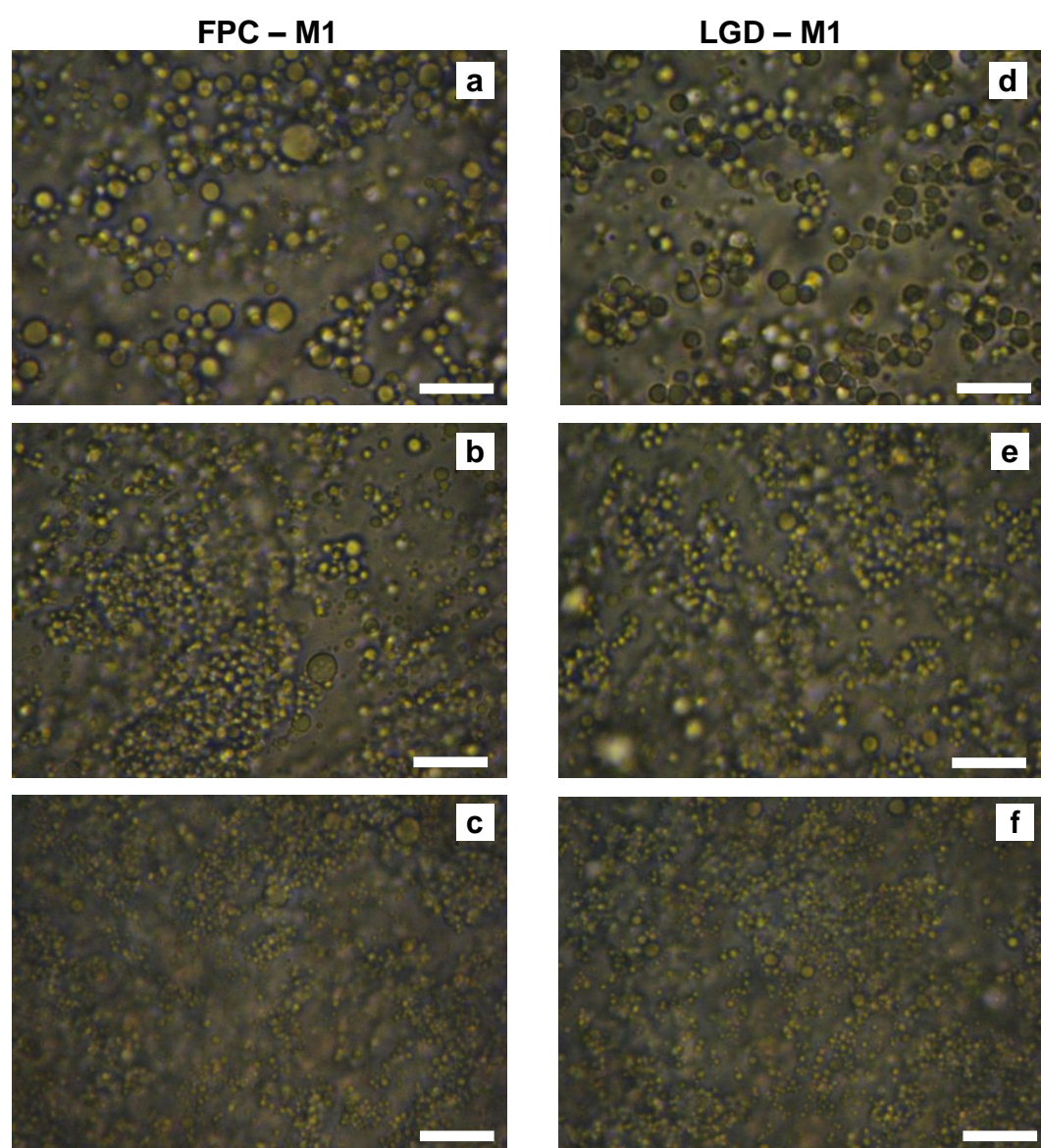


Figura 4.19. Micrografías ópticas (100 X, 2,5 X) de emulsiones O/W estabilizadas con mucílago de chía (M1) y diferentes concentraciones de FPC: (a) 0,5%; (b) 1,0%; (c) 2,0% y LGD: (d) 0,5%; (e) 1,0%; (f) 2,0%. Barras en blanco: 10 μm

4.4. CONCLUSIONES PARCIALES

Emulsiones O/W con lecitinas modificadas de girasol (FPC, LGD)

➤ Las emulsiones O/W formuladas sólo con lecitinas modificadas de girasol presentaron procesos de desestabilización por cremado, siendo más estables aquellas formuladas con FPC. Dicha estabilidad aumentó en función del incremento de la concentración del agente emulsificante.

➤ Las emulsiones O/W con FPC presentaron menores valores de diámetros promedio (D [4,3], D [3,2]) y una mayor área interfacial que las obtenidas con LGD. Estas diferencias podrían atribuirse a las variaciones en la composición de fosfolípidos, evidenciándose las mejores características de FPC como agente emulsificante.

Emulsiones O/W con mucílago de chía (M1, M2)

➤ Las emulsiones O/W estabilizadas sólo con mucílago de chía exhibieron una buena estabilidad debido al aumento de la viscosidad de la fase acuosa. La caracterización óptica de las mismas reflejó perfiles diferenciales de QuickScan sin cambios durante el periodo de almacenamiento refrigerado.

➤ Los distintos tipos de mucílago de chía evaluados permitieron obtener emulsiones con una estabilidad y tamaño de partículas similares, no obstante las variaciones en su contenido de proteínas y de lípidos.

Emulsiones O/W con lecitinas modificadas de girasol (FPC, LGD) y mucílago de chía (M1, M2)

➤ Se obtuvieron emulsiones O/W con un alto grado de estabilidad mediante la incorporación de mucílago de chía M1 como agente espesante y lecitinas modificadas de girasol (FPC, LGD) como agentes emulsificantes en función del tiempo. Este hecho puede asociarse al aporte del mucílago de chía M1 (aumento de la viscosidad de la fase acuosa) y a la contribución registrada en función del incremento de la concentración de lecitinas modificadas de girasol (FPC, LGD).

➤ El tipo de mucílago de chía empleado en la obtención de emulsiones O/W con lecitinas modificadas de girasol (FPC, LGD) tuvo influencia en la estabilidad global de las mismas, posiblemente debido a su distinto tenor de lípidos y de proteínas.

4.5. DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Presentaciones en congresos y/o jornadas

- ✓ “Stability of Functional Oil in Water Emulsions with Chia and Sunflower By-products”. Guiotto E N, Capitani M I, Nolasco S M, Tomás M C. 105th AOCS Annual Meeting & Expo. San Antonio, Texas, USA; 4 al 7 de mayo 2014

Conclusiones generales

El presente trabajo de Tesis Doctoral permitió alcanzar las siguientes conclusiones generales:

Fraccionamiento de lecitina nativa de girasol

➤ Se modificaron lecitinas nativas de girasol mediante el proceso de fraccionamiento con mezclas etanol:agua a diferentes niveles de pH y “deoiling”. En virtud de ello, se obtuvieron fracciones enriquecidas en fosfatidilcolina (FPC) y en fosfatidilinositol (FPI) así como lecitina “deoiled” (LGD).

➤ Se realizó la caracterización composicional de las diferentes lecitinas modificadas de girasol obtenidas por fraccionamiento bajo distintas condiciones operativas (distintas mezclas etanol:agua, pH) mediante espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de ^{31}P (^{31}P NMR).

➤ Se evidenció la relevancia del contenido de agua en el solvente de extracción a nivel del rendimiento másico, la composición de fosfolípidos y la capacidad emulsificante de las fracciones enriquecidas en PC (FPC).

➤ El nivel de pH de la porción acuosa del sistema del solvente de extracción tuvo incidencia en la composición de fosfolípidos de las fracciones FPC y FPI obtenidas especialmente con mezclas etanol absoluto:agua 96:4 v/v. A su vez, la relación PC/PE se modificó en función del pH del solvente de extracción con un nivel significativamente superior asociado a las fracciones FPC obtenidas con un sistema de solventes etanol absoluto:agua 96:4 v/v, pH 7,5.

➤ Los resultados obtenidos proveen una interesante información para el desarrollo de procesos de fraccionamiento con sistemas de solventes etanol absoluto:agua a mayor escala destinados a aumentar el valor agregado de las lecitinas nativas de girasol.

Aceites mezcla Girasol-Chía

➤ Se formularon y caracterizaron aceites mezcla girasol:chía (80:20, 90:10 p/p) con una relación de ácidos grasos ω -6: ω -3 (2,7:1; 5,3:1) acorde a la recomendada por la FAO/OMS, evaluándose su conservación en función de la temperatura y tiempo de almacenamiento, así como mediante la adición de antioxidantes.

- La evaluación sensorial de los aceites mezcla G-C mostró una buena aceptabilidad de los mismos en cuanto a sus atributos (apariencia, aroma, sabor).
- La adición de antioxidantes (extracto de romero -ER- y palmitato de ascorbilo -AP-) produjo un aumento de la estabilidad oxidativa de los aceites mezcla, la cual fue determinada mediante un ensayo acelerado de oxidación (Rancimat). Los mejores efectos se registraron con la mezcla de antioxidantes AP:ER (1:1) (2000:2000 ppm).
- La termooxidación de los aceites estudiada mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) evidenció -a través de los respectivos termogramas- las transiciones correspondientes a la formación de hidroperóxidos y su posterior descomposición en otros productos. Se determinaron los parámetros cinéticos de oxidación de los aceites mezcla girasol:chía, los valores de E_a -a partir de las T_e -, registrándose los mayores incrementos en los mismos con la adición de extracto de romero (5000 ppm).
- Los aceites mezcla G-C sin adición de antioxidantes alcanzaron dicho límite a partir de 150 d de almacenamiento a $4\pm 1^\circ\text{C}$. Ambos sistemas control mostraron incrementos significativos ($p \leq 0,05$) con respecto a las mezclas de aceite con la adición de antioxidantes a partir de los 30 d.
- El almacenamiento de los aceites mezcla girasol:chía permitió evaluar la influencia de los distintos tratamientos ensayados a fin de lograr su adecuada conservación. Se observó un efecto muy relevante de la temperatura sobre la velocidad de oxidación de los aceites. Los aceites almacenados a $T = 4\pm 1^\circ\text{C}$ con la incorporación de antioxidantes presentaron valores de peróxido (PV) inferiores al límite de aceptabilidad aplicable a aceites vegetales con alto tenor de AGPIs y al valor máximo permitido por el Código Alimentario Argentino para aceites refinados. Los aceites mezcla control alcanzaron dicho límite a partir de 150 d. En contraste, las muestras almacenadas a $20\pm 2^\circ\text{C}$ alcanzaron el límite legal entre 120 y 240 d de almacenamiento en el orden siguiente: aceites mezcla control (120 d), aceites mezcla con ER (150 d), aceites mezcla con AP (180 d 90:10 p/p, 210 d 80:20 p/p), aceites mezcla con AP:ER (240 d). La mezcla de antioxidantes AP:ER exhibió la mayor eficiencia antioxidante para la conservación de los aceites mezcla G-C (80:20 y 90:10 p/p) para ambas temperaturas de almacenamiento estudiadas.

Emulsiones alimentarias funcionales O/W con subproductos de chía y girasol

➤ Se formularon emulsiones O/W con aceites mezcla girasol-chía (fase oleosa) y con distintos agentes emulsificantes/estabilizantes tales como lecitinas modificadas de girasol (FPC, LGD) o mucílago de chía o bien con lecitinas modificadas de girasol (FPC, LGD) y mucílago de chía (M1 o M2), evaluándose la estabilidad física de las mismas.

➤ Se evidenció una mayor actividad emulsificante de la fracción enriquecida en fosfatidilcolina (FPC) en las emulsiones O/W formuladas sólo con lecitinas modificadas de girasol, siendo más estables que las LGD.

➤ El mucílago de chía (M1, M2) exhibió propiedades estabilizantes, obteniéndose emulsiones O/W estables en el tiempo, lo cual se atribuye principalmente a su contribución en lo que se refiere al aumento de la viscosidad de la fase acuosa.

➤ El tipo de mucílago de chía y su interacción con lecitinas modificadas de girasol (FPC, LGD) tuvo una importante influencia en la estabilidad de las emulsiones O/W estudiadas. Así, las emulsiones obtenidas con el mucílago de chía de menor contenido de proteínas y de lípidos (M1) registraron un nivel de estabilidad superior a las formuladas con FPC, LGD y M2 y también con respecto a las constituidas sólo por mucílago en función del periodo de almacenamiento estudiado.

Perspectivas futuras

En función de los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral, se propone continuar con el estudio de la aplicación de subproductos derivados de la semilla de chía y de girasol.

Dado el importante nivel de producción de aceites de girasol y considerando que la lecitina (subproducto de la refinación) es una interesante alternativa a la de soja debido a sus propiedades funcionales y características no GMO, se propone obtener y caracterizar lecitinas modificadas de girasol de composición y funcionalidad determinadas mediante hidrólisis enzimática. Así, estudiar su aplicación en productos alimenticios tales como productos panificados. En este sentido, las modificaciones enzimáticas permiten la obtención de lisolecitinas (mezcla de lisofosfolípidos/fosfolípidos) las cuales presentan interesantes propiedades funcionales tales como capacidad de absorción de agua, interacción con el gluten -al lograr un mayor volumen y elasticidad de la masa- y extensión de la vida útil de los productos panificados debido a la formación de un complejo amilosa-lisolecitina.

Por otra parte, teniendo en cuenta la caracterización global y las investigaciones realizadas acerca de la conservación de los aceites mezcla girasol-chía, se propone complementar su evaluación sensorial mediante la determinación del perfil de aroma (nariz electrónica) y nivel de compuestos volátiles en función de las condiciones de almacenamiento (temperatura, tiempo, adición de diversos antioxidantes).

Además, se implementarán las gestiones tendientes a la incorporación de los aceites mezcla estudiados dentro de las normativas del Código Alimentario Argentino (CAA).

En lo que se refiere a la aplicación de dichos aceites mezcla en emulsiones alimentarias funcionales con el agregado de subproductos de chía (mucílago) y girasol (lecitinas modificadas por fraccionamiento), se propone continuar con el estudio reológico de las mismas, determinar su viscosidad y evaluar la influencia del tenor de proteínas y lípidos del mucílago sobre su estabilidad fisicoquímica.

Seguidamente, para la incorporación de dichos aceites en alimentos funcionales se formularán aderezos tipo mayonesa evaluando el perfil de textura, comportamiento reológico y características organolépticas.

Paralelamente, en el grupo de investigación se continúa abordando el estudio de la incorporación de otros subproductos de la semilla de chía (harinas residuales del prensado en frío constituidas por "fibra dietética antioxidante", proteínas con un buen balance de aminoácidos y aceite rico en ácidos grasos omega-3) en diversos alimentos funcionales. Para ello, se plantea desarrollar harinas de premezcla y productos panificados a base de cereales con la adición de las harinas residuales, así como de fracciones enriquecidas en proteínas o en "fibra dietética antioxidante" o en mucílago (fibra dietética soluble) como ingredientes con compuestos bioactivos, contemplando la inclusión de lecitinas hidrolizadas de girasol (lisolecitinas). Así, se posibilitará la fortificación de dichos alimentos con proteínas de alto valor biológico, lípidos con ácidos grasos esenciales, fosfolípidos/lisofosfolípidos y "fibra dietaria antioxidante", evaluando la calidad y los atributos sensoriales de los productos finales.

En virtud de lo expuesto, la aplicación de dichos ingredientes multifuncionales en los sistemas alimentarios propuestos contribuirá a satisfacer los requerimientos de la industria alimentaria local, del mercado internacional y de los consumidores en cuanto a la relación nutrición-salud.

Bibliografía

- Alexander A E, Johnson P (1949). Colloid science, Oxford University Press, Londres (UK)
- Al-Kahtani H A M (1984). Effect of water quality on degumming and stability of soybean oil. *J Am Oil Chem Soc*, 61: 94–102
- Álvarez Cerimedo MS, Huck Iriart C, Candal R, Herrera ML (2010). Stability of emulsions formulated with high concentration of sodium caseinate and trehalose. *Food Res Int*, 43: 1482-1493
- AOCS (1998). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. AOCS Press, Champaign (USA)
- Aruoma O I, Halliwell B, Aeschbach R, Löliger J (1992). Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. *Xenob*, 22: 257-268
- ASAGIR, Asociación Argentina de Girasol (2008). <http://www.asagir.org.ar> (acceso 04/2013)
- Autino H (2009). Capítulo 2. Preparación de semillas oleaginosas. En *Temas Selectos en aceites y grasas*. Eds. JM Block y D Barrera Arellano, Editorial Blücher, San Pablo (Brasil) pp. 31-95
- Ayerza R (Jr) (1995). Oil Content and Fatty Acid Composition of Chía (*Salvia hispanica* L.) from Five Northwestern Locations in Argentina. *J Am Oil Chem Soc*, 72: 1079-1081
- Ayerza R (Jr), Coates W (2004). Protein and oil content, peroxide index and fatty acid composition of chía (*Salvia hispanica* L.) grown in six tropical and sub-tropical ecosystems of South America. *Trop Sci*, 44: 131-135
- Ayerza R (Jr), Coates W (2005). Chía. Rediscovering a Forgotten Crop of the Aztecs(1st ed.). The University of Arizona Press, Tucson (USA) 197 p
- Azcona J O, Schang M J, Cortamira O (2003). Pellets de girasol baja fibra: caracterización químico-biológica. Cuadernillo Informativo N° 4. Usos Alternativos del girasol en alimentación animal. ASAGIR. <http://www.asagir.org.ar> (acceso 10/2011)

- Beltrán-Orozco M C, Romero M R (2003). Chía, alimento milenario. *Rev Ind Alim*, septiembre/octubre: 20-29
- Bengoechea Ruiz C (2006). Estudio reológico de emulsiones alimentarias estabilizadas con proteínas vegetales. Tesis Doctoral, Facultad de Química, Sevilla
- Betancur-Ancona D, López-Luna J, Chel-Guerrero L (2003). Comparison of the chemical composition and functional properties of Phaseolus lunatus prime and tailing starches. *Food Chem*, 82(2): 217-225
- Bockisch M (1998). Extraction of vegetable oils. En *Fats and oils handbook*. AOCS Press, Champaign (USA)
- Braginsky L M, Belevitskaya M A (1996). Kinetics of droplets breakup in agitated vessels, en *Liquid-Liquid Systems*, Kulov, N N (ed.), Nova Science, Commack, Nueva York, cap. 1
- Brewer M S (2011). Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(4): 221-247
- Bueschelberger H G (2004). Lecithins. En: *Emulsifiers in Food Technology*. Ed. J. Whitehurst, Blackwell Publishing, West Sussex (UK)
- Burger J C, Chapman M A, Burke J M (2008). Molecular insights into the evolution of crop plants. *Am J Bot*, 95(2): 113–122
- Burkart A (1979). Flora Ilustrada de Entre Ríos (Argentina). Vol. 5. Colección Científica INTA, Buenos Aires (Argentina) 606 p
- Cabezas D M (2010). Modificaciones tecnológicas de lecitinas de girasol. Aplicaciones en el área alimentaria. Tesis Doctoral. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (FCE-UNLP)
- Cabezas D M, Diehl B, Tomás M C (2009a). Sunflower Lecithin: Application of a Fractionation Process with Absolute Ethanol. *J Am Oil Chem Soc*, 86: 189–196

- Cabezas D M, Diehl B, Tomás M C (2009b). Effect of processing parameters on sunflower PC enriched fractions extracted with aqueous-ethanol. *Eur J Lipid Sci Technol*, 111: 993-1002
- Cabezas D M, Madoery R, Diehl B W K, Tomás M C (2012). Emulsifying properties of different modified sunflower lecithins. *J Am Oil Chem Soc*, 89: 355-361
- Cahill J P (2004). Genetic diversity among varieties of chía (*Salvia hispanica* L.) *Gen Res Crop Evol*, 51: 773
- Cahill J P (2005). Human selection and domestication of chía (*Salvia hispanica* L.). *Gen Res Crop Evol*, 51: 773-781
- Campbell I, Norton I, Morley W (1996). Factors controlling the phase inversion of oil-in-water emulsions. *Neth Milk Dairy J*, 50:167-182
- Cao Y, Dickinson E, Wedlock D J (1990). Creaming and flocculation in emulsions containing polysaccharide. *Food Hydrocolloid* 4(3): 185-195
- Capitani M I, Spotorino V, Nolasco S M, Tomás M C (2012). Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. *LWT – J Food Sci Technol*, 45: 94-102
- Capitani M I (2013). Caracterización y funcionalidad de subproductos de chía (*salvia hispanica* L.) aplicación en tecnología de alimentos. Tesis Doctoral. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (FCE-UNLP)
- Capitani M I, Ixtaina V Y, Nolasco S M, Tomás M C (2013). Microstructure, chemical composition and mucilage exudation of chia (*Salvia hispanica* L.) nutlets from Argentina. *J Sci Food Agric*, 93(25): 3856-3862
- Carelli A A, Frizzera L M, Forbito P R, Crapiste G H (2002). Wax composition of sunflower seed oils. *J Am Oil Chem Soc*, 79(8): 763-768
- Carlsson A (2008). Physical properties of phospholipids. En: *Phospholipid Technology and Applications*, First edition. Eds. Gunstone F D, The Oily Press, Bridgwater (UK)
- Christie W W (2003). *Lipid analysis: Isolation, separation, identification, and structural analysis of lipids* (3rd ed). Oily Press, Bridgwater (UK)

- Coates W, Ayerza R (Jr) (1996). Production Potential of Chía in Northwestern Argentina. *Ind Crops Prod*, 5: 229–233
- Coates W, Ayerza R (Jr) (1997). New crop trials in the Patagonian region of Argentina. Abstracts of an International Conference of the Association for the Advancement of Industrial Crops, 23, Saltillo (México)
- Coates W, Ayerza R (Jr) (1998). Commercial production of chía in Northwestern Argentina. *J Am Oil Chem Soc*, 75: 1417–1420
- Codex Alimentarius Commission: Codex Stan (1999). Codex standard for edible fats and oils not covered by individual standards. *Codex Stan* 19-1981, Rev 2-1999. http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do (acceso 08/2012)
- Código Alimentario Argentino, CAA (2008). Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos y Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. www.anmat.gov.ar/codigoa/Capitulo_XI.pdf (acceso 07/2010)
- Contreras-Calderón J, Calderón-Jaimes L, Guerra-Hernández E, García-Villanova B (2010). Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*, In Press, Corrected Proof
- Dagorn-Scaviner C, Gueguen J, Lefebvre J (1987). Emulsifying properties of pea globulins as related to their adsorption behaviors. *J Food Sci*, 52(2): 335-341
- Dalgleish D G (1996). Food emulsions, En *Emulsions and Emulsion Stability*, Sjoblom, J. ed. Marcel Dekker, Nueva York (USA)
- Dashiell G (2001). Fuentes, métodos de proceso y usos comerciales de la lecitina. *Aceites Grasas*, 43: 197-204
- Davidovich L A, Sulé C L, Lupín H M (1980). Kinetics of fish meal oxidation. *J Am Oil Chem Soc*, 57: 43-47
- Davis H T (1994). Factors determining emulsion type: hydrophile-lipophile balance and beyond. *Colloids Surf A*, 91: 9-24
- Davis R H, Schonberg J A, Rallison J M (1989). The lubrication force between two viscous drops. *Physics of Fluids A: Fluid Dynamics*, 1: 77

- deMan J M, Tie F, deMan L (1987). Formation of short chain volatile organic acids in the automated AOM method. *J Am Oil Chem Soc*, 64(7): 993-996
- Demarco A (2009). Extracción por solvente. En: Temas Selectos en Aceites y Grasas - Volumen 1/ Procesamiento (Eds) Jane Mara Block, Daniel Barrera-Arellano. AOCS Press, São Paulo, (Brasil)
- Devlin T M (2004). Bioquímica: Libro de texto con aplicaciones clínicas. Ed. Reverte, Barcelona (España)
- Di Sapio O, Bueno M, Busilacchi H, Severin C (2008). Chía: importante antioxidante vegetal <http://www.fcagr.unr.edu.ar/Extension/Agromensajes/24/3AM24.htm> (acceso 04/2013)
- Diario Oficial de la Unión Europea (2009). Autorización de la comercialización de semillas de chía (*Salvia hispanica*) como nuevo ingrediente alimentario con arreglo al Reglamento (CE) N° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo
- Dickinson E (1992). Introduction to food colloids. Oxford University Press, Oxford
- Dickinson E (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hyd*, 17(1): 25-39
- Dickinson E, Flint F O, Hunt J A (1989). Bridging flocculation in binary protein stabilized emulsions. *Food Hydrocolloid*, 3(5): 389-397
- Dickinson E, Hunt J A, Horne D S (1992). Calcium induced flocculation of emulsions containing adsorbed β -casein or phosvitin. *Food Hydrocolloid*, 6(4): 359-370
- Dickinson E, Stainsby G (1982). Colloids in food. Applied Science Publishers, Londres (UK)
- Dickinson E, Pawlowski K (1997). Effect of i-carrageenan on flocculation, creaming, and rheology of a protein-stabilised emulsion. *J Agric Food Chem*, 45:3799
- Diehl B W K (1997). Multinuclear high-resolution magnetic resonance spectroscopy. En: Lipid Analysis in Oils and Fats. Ed. R J Hamilton, Blackie Academic y Professional, London (UK), pp. 87-135
- Diehl B W K (2001). High resolution NMR spectroscopy. *Eur J Lipid Sci Technol*, 103: 830-834

- Diehl B W K, Ockels W (1995). Quantitative Analysis of Phospholipids. En: Proceeding of the 6th International Colloquium Phospholipids. Characterization, Metabolism and Novel Biological Applications. Eds. G. Cevc, F. Paltauf, AOCS Press, Champaign, (USA), pp. 29-32
- Dijkstra A J (2011). Edible Oil Processing – Refining. Deguming. <http://lipidlibrary.aocs.org/processing/degum-intro/index.htm> (acceso 03/2013)
- Dijkstra A J, De Kock J (1993). Process for fractionating phosphatide mixtures. U.S. Patent N° 5,214,171. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office
- Dijkstra A J, van Opstal M (1989). The total degumming process. *J Am Oil Chem Soc* 66:1002-1009
- Dolde D, Vlahakis C, Hazebroek J (1999). Tocopherols in Breeding Lines and Effects of Planting Location, Fatty Acid Composition, and Temperature During Development. *J Am Oil Chem Soc*, 76: 349-355
- Dorrell G D, Vick B A (1997). Properties and processing of oilseed sunflower. En Sunflower Technology and Production, Schneiter (ed.), Wisconsin (USA), pp. 709-746
- Dorsa R (2009). Desodorización. En: Temas selectos en aceites y grasas, Vol 1- Procesamiento (Eds) Jane Mara Block, Daniel Barrera-Arellano. AOCS Press, São Paulo, (Brasil)
- Dudrow F A (1983). "Deodorization of Edible Oil", *J Am Oil Chem Soc*, 60: 272-274
- Earle F R, Clark T F, Vanetten C H, Wolff I A (1968). Compositional data on sunflower seed. *J Am Oil Chem Soc*, 45: 876–879
- EFSA, European Food Safety Authority (2009). Opinion on the safety of “Chia seeds (*Salvia hispanica* L.) and ground whole Chia seeds” as a food ingredient. EFSA J 996, 1-26
- Engel F A (1987). De las begonias al maíz: vida y producción en el Perú antiguo. Centro de Investigaciones de Zonas Áridas. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima (Perú)
- Evans D F, Wennerström H (1994). The Colloidal Domain. Where Physics, Chemistry, Biology and Technology Meet. VCH Publishers, N.York.

- FAO/WHO Food Agricultural Organization/World Health Organization of the United Nations (1997). Food and nutrition paper n° 57. Fats and oils in human nutrition report of a joint expert consultation FAO/OMS. Las Grasas y Aceite en la Nutrición Humana. Informe de una consulta de expertos. Roma. <http://www.fao.org/docrep/V4700S/v4700s00.htm> (acceso 10/2012)
- Flider F J (1985). The manufacture of soybean lecithin. En: Lecithins. Eds. B. F. Szuhaj, G. R. List, AOCS Press, Champaign (USA), pp. 21
- Flynn J H, Wall L A (1966). A quick, direct method for the determination of activation energy from thermogravimetric data. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters*, 4(5): 323-328
- Franco D (2002). Informe de Cadenas Alimentarias: Aceite de Girasol. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Página web: www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/olea/a_girasol_3/Aceite_girasol.htm (acceso 09/2012)
- Franco D (2008). Informe de Cadenas Alimentarias: Sector Oleaginoso. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Página web: www.alimentosargentinos.gov.ar/03/revistas/r_41/cadenas/Oleaginosos_Olea_ginosas.htm (acceso 11/2010)
- Franco J M, Berjano M, Guerrero A, Muñoz J, Gallegos C (1995). Flow Behavior and Stability of Light Mayonnaise containing a mixture of egg-yolk and sucrose atearate as emulsifiers, *Food Hydrocoll*, 9: 111
- Frankel E N (2005). Lipid Oxidation. Ed. The Oily Press, Bridgewater, UK
- Frankel E N, Huang S W (1994). Improving the Oxidative Stability of Polyunsaturated Vegetable Oils by Blending with High Oleic Sunflower Oil. *J Am Oil Chem Soc*, 71: 255-259
- Freese R, Mutanen M (1997). α -Linolenic acid and marine long-chain n-3 fatty acids differ only slightly in their effects on hemostatic factors in healthy subjects. *Am J Clin Nutr*, 66: 591-598
- Funk V A, Bayer R J, Keeley S, Chan R, Watson L, Gemeinholzer B, Schilling E, Panero J L, Baldwin B G, Garcia-Jacas N, Susanna A y Jansen R (2005).

- Everywhere but Antarctica: using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. *Biologiske Skrifter*, 55: 343-374
- Gallegos C, Sanchez M C, Guerrero A, Franco J M (1996). Effect of process parameters on the rheological properties of O/W emulsions. *Asme applied mechanics division-publications-amd*, 217: 177-184
- Garti N (1997). Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food applications. *LWT - Food Sci Techn*, 30: 222-235
- Gibon V, Tirtiaux A (1998). El proceso de degomado Soft. *Aceites Grasas*, 32: 446-453
- Gober K H, Guenther B R, Lunebach E M (1995). Isolation and analysis of phospholipids and phospholipids derivatives. In: phospholipids Handbook (G Cevc, ed), Marcel Dekker, New York, pp. 1-22
- González L (2011). Protocolo de calidad para el aceite de girasol. Alimentos argentinos. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación. Página web: www.alimentosargentinos.gov.ar/Protocolo_Aceite_Girasol.pdf (acceso 05/2013)
- González-Pérez S (2003). Physico-chemical and functional properties of sunflower proteins. Ph.D. Thesis Wageningen University, The Netherlands
- Grompone M A (1991) El Índice de Anisidina como Medida del Deterioro Latente de un Material Graso. *Grasas Aceites*, 2: 8-13
- Gunstone F D (2002). Vegetable oils in food technology: composition, properties and uses. Ed. Blackwell Publishing, CRC Press, Oxford (UK)
- Gupta M K (2002) Sunflower oil. En: Vegetable oils in food technology: composition, properties and uses. Eds.Gunstone F D., Blackwell Publishing
- Gutiérrez Rosales F (1989). Determinación de la estabilidad oxidativa de aceites de oliva vírgenes: Comparación entre el método del Oxígeno Activo (AOM) y el método Rancimat. *Grasas Aceites*, 40(1): 1-5
- Halling P J (1981). Protein-stabilized foams and emulsions, *CRC Crit Rev Food Sci Nutr*, 15(1)

- Haraldsson G (1983). Degumming, dewaxing and refining. *J Am Chem Soc*, Vol. 60, Issue 2, pp 251-256
- Harispe R (2000). Degomado acuoso de aceites de girasol. Efecto de las condiciones operativas. Tesis de grado. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata (FI, UNLP)
- Haros M (2013). La chía en Europa sigue siendo una gran desconocida, y por ende sus propiedades. *Grasas Aceites*, 92 (3): 384-385
- Harter A V, Gardner K A, Falush D, Lentz D L, Bye R A, Rieseberg L H (2004). Origin of extant domesticated sunflowers in eastern North America. *Nature*, 430: 201–205
- Heiser C B (Jr) (2008). The sunflower (*Helianthus annuus L.*) in Mexico: further evidence for a North American domestication. *Genet Resour Crop Evol*, 55: 9–13
- Heller W, Pugh T L (1954). Steric protection of hydrophobic colloidal particles by adsorption of flexible macromolecules. *J Chem Phys*, 22(10): 1778-1778
- Helmholtz H L F (1879). Studies of electric boundary layers. *Wied. Ann, Phys Chem*, 7: 337-382
- Hentry H S, Mittleman M, McCrohan PR (1990). Introducción de la chía y la goma de tragacanto en los Estados Unidos. En *Avances en Cosechas Nuevas*. Editado por Janick J, y Simon J E. Prensa de la Madera, Pórtland, O. 252-256
- Hernández E, Quezada N (2008). Uses of phospholipids as functional ingredients. En: *Phospholipid Technology and Applications*, Cap. 4. Ed: Gunstone F D, The Oily Press, Bridgwater (UK)
- Heywood V H (1978). *Flowering plants of the world*. Englewood Cliffs, N. J., PrenticeHall
- Hicks S (1966). *Desert plants and people*. Naylor Company, San Antonio (USA)
- Hiemenz P C (1986). *Principles of Colloid and Surface Chemistry*, 2nd edn Marcel Dekker, New York (USA), 13: 737

- Holló J, Perédi J, Ruzics A, Jeránek M, Erdélyi A (1993). Sunflower Lecithin and Possibilities for Utilization. *J Am Oil Chem Soc*, 70: 997-1001
- Howell R W, Collins F I (1957). Factors affecting linolenic and linoleic acid content of soybean. *Agron J*, 49: 593-597
- Huang X, Kakuda Y, Cui W (2001). Hydrocolloids in emulsions: particle size distribution and interfacial activity. *Food Hyd*, 15: 533-542
- Ingaramo J (2013). Crece la intención de siembra de girasol. <http://www.asagir.org.ar> (acceso 08/2013)
- Israelachvili J N (1992). Intermolecular and Surface Forces, Academic Press, Londres (UK)
- Israelachvili J, Wennerström H (1996). Role of hydration and water structure in biological and colloidal interactions. *Nature*, 379, 219
- IUPAC (1992). Standard Methods for the Analysis of oils, Fats and Derivates. (7thed.) Eds. Paquot C, Hautffenne A. International Union of Pure and Applied Chemistry, Blackwell Scientific Publications Inc., Oxford (UK)
- Ixtaina V Y (2010). Caracterización de la semilla y el aceite de chía (*Salvia hispánica* L.) obtenido mediante distintos procesos. Aplicación en tecnología de alimentos Tesis Doctoral. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (FCE-UNLP)
- Ixtaina V Y, Martínez M L, Spotorno V, Mateo C M, Maestri D M, Diehl B W, Nolasco S M, Tomás M C (2011). Characterization of Chía (*Salvia hispánica* L.) Crude Seed Oils Obtained by Pressing and Solvent Extraction. *J Food Compos Anal*, 24: 166-174
- Ixtaina V Y, Nolasco S M, Tomás M C (2012). Oxidative Stability of Chía (*Salvia hispánica* L.) Seed Oil: Effect of Antioxidants and Storage Conditions. *J Am Oil Chem Soc*, 89: 1077-1090
- Izquierdo N G, Aguirrezábal L A N, Andrade F H, Geroudet C, Valentinuz O, Pereyra Iraola M (2009). Intercepted solar radiation affects oil fatty acid composition in crop species. *Original Research Article Field Crops Research*, 114(1): 66-74

- Izquierdo N G, Aguirrezábal L A N (2008). Genetic variability in the response of fatty acid composition to minimum night temperature during grain filling in sunflower. *Field Crops Research*, 106(2): 116-125
- Jiménez Márquez A, Beltrán Maza G, Aguierra Herrera M P, Uceda Ojeda M (2007). Calorimetría diferencial de barrido. Influencia de la composición del aceite de oliva virgen en su perfil térmico. *Grasas Aceites*, 58: 122-129
- Johnson L E (1995). Food technology of the antioxidant nutrients. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 35: 149
- Kabalnov A S, Shchukin E D (1992). Ostwald ripening theory: applications to fluorocarbon emulsion stability. *Adv Colloid Interface Sci*, 38: 69-97
- Karbstein H, Schubert H (1995). Developments in the continuous mechanical production of oil-in-water macro-emulsions. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 34 (3): 205-211
- Karlberg M, Thuresson K, Lindman B (2005). Hydrophobically modified ethyl (hydroxyethyl) cellulose as stabilizer and emulsifying agent in macroemulsions. *Colloids and surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, 262: 158-167
- Kesseli R V, Michelmore R W (1997). The Compositae: systematically fascinating but specifically neglected. En *Genome Mapping in Plants*.(Paterson AH). Georgetown, TX, R. G. Landes Co. pp. 179-191
- Kleiner L (2013). Chía (*Salvia hispánica* L.): Una buena fuente de ácidos grasos omega-3. *Grasas Aceites*, 92 (3): 396-400
- Koocheki A, Kadkhodae R, Mortazavi S, Shahidi F, Taherian A (2009). Influence of *Alyssum homolocarpum* seed gum on the stability and flow properties of O/W emulsion prepared by high intensity ultrasound. *Food Hyd*, 23: 2416-2424
- Kuksis A, Ravandi A, Schneider M (2005). Covalent binding of acetone to aminophospholipids “*in vitro*” and “*in vivo*”. *Annals New York Academy of Science*, 1043: 471-439
- Kullenberg F W (1989). Lecithin in animal health and nutrition, en Szuhaj BF (Ed.) *Lecithins: Sources, Manufacture y Uses*. AOCS Press, Champaign (USA), 237–252

- Labuza T P, Mc Nayli L, Gallagher D, Hawekes J, Hurtado F (1972). Stability of intermediate moisture foods. 1. Lipid Oxidation. *J Food Sci*, 37: 154-159
- Larsson K (1994). Liquid crystalline lipid-water phases. En: Lipids, molecular organization, physical functions and technical applications. Eds. Larsson K, The Oily Press, Glasgow (UK), pp. 62
- Lawless H T, Heymann H (1998). Sensory Evaluation of Food: Practices and Principals
- Lentz D L, Pohl M D L, Alvarado J L, Tarighat S, Bye R (2008). Sunflower (*Helianthus annuus* L.) as a pre-Columbian domesticate in Mexico. *PNAS*, 105(17): 6323-6237
- Lin K Y, Daniel J R, Whistler R L, (1994). Structure of chia seed polysaccharide exudate. *Carbohydrate Polymers*, 23(1): 13–18
- List G R (1989). Commercial manufacture of lecithin, in Lecithins: Sources, Manufacture and Uses, Szuhaj B F (ed), American Oil Chemists Society, Chicago (USA)
- List G R, Evans C D, Kwolek K, Warner K, Bound B K (1974). Oxidation and quality of soybean oil: A preliminary study of the anisidine test. *J Am Oil Chem Soc*, 51: 17-21
- List G R, Mounts T L, Lanser A C (1992). Factors promoting the formation of nonhydratable soybean phosphatides. *J Am Oil Chem Soc*, 69: 443-446
- Litwinienko G (2007). DSC Study of Linolenic Acid Autoxidation Inhibited by BHT, Dehydrozingerone and Olivetol. *J Therm Anal Calorim*, 88: 781-785
- Litwinienko G, Kasprzycka-Guttman T (1998). A DSC study on thermoxidation kinetics of mustard oil. *Thermochim Acta*, 319: 185-191
- Litwinienko G, Kasprzycka-Guttman T, Jamaneck D (1999). DSC study of antioxidant properties of dihydroxyphenols. *Thermochim Acta*, 331: 79-86
- Litwinienko G, Kasprzycka-Guttman T, Jarosz-Jarszewska (1995). Dynamic and isothermal DSC investigation of the kinetics of thermooxidative decomposition of some edible oils. *J Therm Anal*, 45: 741-750

- Lucas R, Comelles F, Alcantara D, Maldonado O S, Curcuroze M, Parra J L, Morales JC (2010). Surface-active properties of lipophilic antioxidants tyrosol and hydroxytyrosol fatty acid esters: a potential explanation for the nonlinear hypothesis of the antioxidant activity in oil-in-water emulsions. *J Agric Food Chem*, 58: 8021–8026
- Lutterodt H, Luther M, Slavin M, Yin J J, Parry J, Gao J M, Yu L (2010). Fatty acid profile, thymoquinone content, oxidative stability, and antioxidant properties of cold-pressed black cumin seed oils. *LWT-Food Sci Technol*, 43: 1409–1413
- Marin Flores F M, Acevedo M J, Tamez R M, Nevero M J, Garay AL (2008). Patent WO/2008/0044908 Method for obtaining mucilage from *Salvia hispanica* L. Word Internacional Property Organization
- Márquez A (2009). Obtención y caracterización de cremas formuladas a base de leche de soja y fortificadas con calcio. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Quilmes (UNQ)
- Márquez-Ruiz G (2008). Oxidação Lipídica em Alimentos: Avaliação Analítica e Nutricional. Estratégias para sua Prevenção. En: III Simpósio Internacional: Tendencias e Innovaciones en Tecnología de Aceites y Grasas, Campinas, Sao Paulo (Brasil)
- Martínez M (1959). Plantas Útiles de la Flora Mexicana. Ediciones de Botas, DF (México) pp. 198-202
- Matt B (2008). Chía: The Ord Valley's new super crop. ABC Rural. <http://www.abc.net.au/rural/content/2008/s2367335.htm> (acceso 10/2010)
- Matthäus B (2002). "Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds". *J Agric Food Chem*, 50 (12): 3444-3452
- McClements D J (1999). Food Emulsions: principles, practice and techniques. Ed. CRC Press, New York (USA)
- Melgarejo M (2003). Girasol: Usos. Cuadernillo Informativo ASAGIR (Argentina), N°4. www.asagir.org.ar (acceso 03/2013)
- Melik D H, Fogler H S (1988). Fundamentals of colloidal stability in quiescent media. *Encyclopedia of emulsion technology*, 3: 3-78

- Mengual O, Meunier G, Cayré I, Puech K, Snabre P (1999). Turbiscan MA 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. *Talanta*, 50: 445-456
- Metrohm Ionenanalytik (2001). 743 Rancimat – Instrucciones para el Uso. Harisau (Suiza)
- Miraliakbaru H, Shahidi F (2008). Oxidative stability of tree nut oils. *J Agric Food Chem*, 56: 4751–4759
- Mohamed F R (2013). Healthy Blends of High Linoleic Sunflower Oil with Selected Cold Pressed Oils: Functionality, Stability and Antioxidative Characteristics. *Ind Crops Prod*, 43: 65-72
- Moreau L, Kim H J, Decker E A, McClements D J, (2003). Production and Characterization of Oil-in-Water Emulsions Containing Droplets Stabilized by Beta-Lactoglobulin-Pectin Membranes. *J Agric Food Chem*, 51(22): 6612-6617
- Muñoz J, Alfaro M C (2000). Rheological and phase behaviour of amphiphilic lipids. *Grasas Aceites*, 51: 6-25
- Muñoz J, Alfaro M C, Zapata I (2007). Avances en la formulación de emulsiones. *Grasas Aceites*, 58(1): 64-73
- Muñoz L A, Cobos A, Diaz O, Aguilera J M (2012). Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration. *J Food Eng*, 108: 216–224
- National Research Council (1989). Lost crops of the Incas: little-known plants of the Andes with promise for worldwide cultivation. National Academic Press, Washington DC (USA)
- Nawar W W (1996). Lipids. En *Food Chemistry*, Cap. 15. Ed. Fennema O., Marcel Dekker Inc., New York (USA)
- Nolasco S M, Aguirrezábal L A N, Mateo C, Lúquez J (2006). Variability in Oil Tocopherol Concentration and Composition of Traditional and High Oleic Sunflower Hybrids (*Helianthus annuus* L.) in the Pampean Region (Argentina). *Grasas Aceites* (España) 57(3): 260-269

- Nolasco S M (2008). La naturaleza al servicio de la salud. *Énfasis. Alimentación Latinoamericana*, XIV (4): 68-74
- Nolasco S M, Rodríguez J C, Bartosik R E (2002). Manejo en poscosecha. En: Diaz Zorita M, Duarte YG (Eds.), *Manual Práctico del cultivo de girasol*. Hemisferio Sur S.A., Buenos Aires (Argentina) pp. 241–252
- O'Brien R (1998). *Fats and Oils. Formulating and Processing for Applications*. Technomic Publishing Co, Inc., Pennsylvania (USA)
- Oomah B D, Kenasehuk E O (1995). Cultivars and agronomic aspects. En *Flaxseed in Human Nutrition*. Eds. SC Cunnane and LU Thompson. AOCS Press, Champaign (USA) pp. 43-45
- Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, Flanagan J A, Deemer E K (2002). "Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study". *J Agric Food Chem*, 50(11): 3122-3128
- Ozawa T (1965). A new method of analyzing thermogravimetric data. *Bull Chem Cos Jpn*, 38: 1881-1885
- Ozawa T (1970). Kinetic analysis of derivative curves in thermal analysis. *J Therm Anal*, 2: 301-324
- Pacheco-Aguirre J (2010). Evaluación de una matriz hidrocoloide obtenida a partir de flamboyán (*Delonix regia*) para encapsular sustancias nutraceuticas. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Yucatán (UADY)
- Padley F B (1994). Occurrence and Characteristics of Oils and Fats, En *The Lipid Handbook* (Gunstone FD, Harwood J L, Padley F B, eds.) pp. 47–146
- Palazolo G G (2006). Formación y estabilidad de emulsiones O/W preparadas con proteínas nativas y desnaturalizadas de soja. Tesis Doctoral. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (FCE-UNLP)
- Pan L G, Tomás M C, Añón M C (2002). Effect of Sunflower Lecithins on the Stability of Water in Oil (W/O) and Oil in Water (O/W) Emulsions. *J Surfact Deterg*, 5: 135-143

- Pandolfe W D (1995). Effect of premix condition, surfactant concentration, and oil level on the formation of oil-in-water emulsions by homogenization. *J Disper Sci Technol*, 16(7): 633-650
- Parry J, Su L, Moore J, Cheng Z, Luther M, Rao J N, Wang J Y, Yu L (2006). Chemical compositions, antioxidant capacities, and antiproliferative activities of selected fruit seed flours. *J Agric Food Chem*, 54: 3773–3778
- Penci C (2009). Modificación Enzimática de Lecitinas. Tesis Doctoral. Planta Piloto de Ingeniería Química (PlaPIQui). Universidad Nacional del Sur (UNS)
- Phillips G O, Williams P A, (2000). Introduction to food hydrocolloids. In: Phillips, G.O., Williams, P.A. (Eds.), *Handbook of Hydrocolloids*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England
- Phipps L W (1985). The high pressure dairy homogenizer (Vol. 6). National Institute for Research in Dairying
- Plants for a Future (2002). <http://www.pfaf.org/database/> (acceso 07/2010)
- Pongracz G, Weiser H, Matzinger D (1995). Tocopherole–Antioxidantien der Natur. *Lipid/Fett*, 97(3): 90-104
- Prosise W E (1985). Commercial Lecithin Products: Food Use of Soybean Lecithin. En: Lecithins. Eds. B. F. Szuhaj and G. List, AOCS Press, Champaign (USA), pp. 163-181
- Ramadán M F, Amer M M A, Awad A (2008). Coriander (*Coriandrum Sativum* L.) seed oil improves plasma lipid profile in rats fed diet containing cholesterol. *Eur Food Res Technol*, 227: 1173–1182
- Ramamoorthy T P (1985). *Salvia* L. En Flora Fanerógama del Valle de México. Volumen II (Dicotiledóneas). Eds. J Rzedowski, GC De Rzedowski, Instituto Politécnico Nacional de México, DF (México) pp. 298-310
- Rawle A (2005). Basic principles of particle size analysis. Malvern Instruments Limited, technical paper
- Regitano-d´Arce M A B, Ferreira T M (2009). Fuentes de aceites y grasas. En: Temas selectos en aceites y grasas, Vol 1-Procesamiento (Eds) Jane Mara Block, Daniel Barrera-Arellano. AOCS Press, São Paulo, (Brasil)

- Reische D W, Lillard D A, Eitenmiller R R (2008). Antioxidants (Cap. 15). En: Food Lipids. Chemistry, Nutrition and Biotechnology. Eds. Casimir Akoh y David Min, CRC Press, Boca Ratón (USA) pp. 409-433
- Relkin P, Sourdets S (2005). Factors affecting fat droplets aggregation in whipped frozen protein-stabilized emulsions. *Food Hydrocolloid*, 19: 503-511
- Reyes-Caudillo E, Tecante A, Valdivia-López M A (2008). Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *J Agric Food Chem*, 107(2): 656–663
- Reynoso-Cortés L B (2002). Extracción, separación y caracterización reológica del mucilage de la semilla de chíá (*Salvia* spp.). Tesis de grado. Universidad Simón Bolívar (México)
- Riego Martín M B, Gómez Herrera C (1988). Química-física interfacial de emulsificantes alimentarios. Parte I. Solubilidad e interacción con medios acuosos. *Grasas Aceites*, 39(111)
- Risso J P (2012). Valor agregado: en lo que va de 2012 las exportaciones de lecitina crecieron un 15%. <http://www.valorsoja.com> (acceso 06/2012)
- Rodríguez Vallejo J (1992). Historia de la agricultura y de la fitopatología, con referencia especial a México. Colegio de Post-graduados en Ciencias Agrícolas, Ciudad de México (México)
- Rossell J B (1983). Measurements of rancidity. En Rancidity in Foods. Eds. JC Allen and J Hamilton, Applied Science Publisher, London (UK) pp. 21-45
- Ruiz C, Díaz C, Anaya J, Rojas R (2013). Análisis proximal, antinutrientes, perfil de ácidos grasos y de aminoácidos de semillas y tortas de 2 especies de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* y *Plukenetia huayllabambana*). *Rev Soc Quím Perú*, 79 (1)
- Sahagún B (1579). Historia general de las cosas de Nueva España (*Codex Florentino*). Eds. A.M. Garibay, 1989. Editorial Porrúa (México)
- Sánchez M C, Berjano M, Guerrero A, Brito E, Gallegos C (1998). Evolution of the microstructure and rheology of O/W emulsions during the emulsification process. *Can J Chem Eng*, 76(3): 479-485

- Sánchez M C, Berjano M, Guerrero A, Gallegos C (2001). Evolución de la cinética de emulsificación y de las propiedades reológicas de emulsiones aceite vegetal en agua preparadas con dos tipos de agitadores. *Grasas Aceites*, 52: 222-228
- Schneider M (1989). Fractionation and Purification of Lecithin. En: *Lecithins: Sources, Manufacture, y Uses*. Ed. B.F. Szuhaj, AOCS Press, Champaign (USA), pp. 109-130
- Schneider M (2008). Major sources, composition and processing. En *Phospholipid Technology and Applications*, Cap. 2. Ed: Gunstone F.D., The Oily Press, Bridgwater (UK)
- Schubert H, Armbruster H (1992). Principles of formation and stability of emulsions. *Int Chem Eng*, 32(1): 14-28
- Schwarz K, Ternes W (1992). Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 195(2): 99-103
- Shahidi F (1997). Natural antioxidants: an overview. En *Natural Antioxidants*, Cap. 1. Ed. Shahidi F., AOCS Press, Illinois (USA)
- Shaich K M (2005). Chapter 7: Lipid oxidation: theoretical aspects. In *Bailey's industrial oil and fat products*. Ed. Wiley-Interscience. 6^aed. New Jersey (USA)
- Shiela P M, Sreerama Y N, Gopala Krishna A G (2004) Storage Stability Evaluation of Some Packed Vegetable Oil Blends. *J Am Oil Chem Soc*, 81:1125-1129
- Sipos E P, Szuhaj B F (1996). Lecithins. En: *Bailey's industrial oil and fat products*. Ed. Y. H. Hui, Wiley, New York (USA), pp 311–395
- Sleeter R T (1985). Instrumental analysis for quality control and quality assurance. *Bailey's industrial oil and fat products*, 3, 203. TH Applewhite (Ed.) J. Wiley y Sonns Inc., New York (USA)
- Soleimanpour M, Koocheki A, Kadkhodae R (2013). Effect of *Lepidium perfoliatum* seed gum addition on whey protein concentrate stabilized emulsions stored at cold and ambient temperature. *Food Hyd*, 30: 292-301

- Song J H, Fujimoto K, Miyazawa T (2000). Polyunsaturated (n-3) fatty acids susceptible to peroxidation are increased in plasma and tissue lipids of rats fed docosahexaenoic acid-containing oils. *J Nutr*, 130: 3028-3033
- Soustelle J (1955). La vie quotidienne des aztèques à la veille de la conquête espagnole. Ed. Hachette, París (Francia)
- Statgraphics Plus Version 4.0. (1999). Statistical Graphic Corporation. Manugistics Inc., Rockville (USA)
- Sun C, Gunasekaran S, Richrads M (2007). Effects of xanthan gum on physicochemical properties of whey protein isolate stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hyd*, 21: 555-564
- Systat Software Inc. (2007). Systat version 12. Systat Software Inc, San José, California (USA)
- Taylor P (1995). Ostwald ripening in emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 99 (2): 175-185
- Tironi V A (2005). Rancidez oxidativa en salmón de mar (*Pseudoperca semifasciata*). Interacción lípidos oxidados – proteínas. Tesis Doctoral. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (FCE-UNLP)
- Tosco G (2004). Los beneficios de la chía en humanos y animales. Nutrientes de la semilla de chía y su relación con los requerimientos humanos diarios. *Actualidades Ornitológicas*, N° 119
- Ulkowski M, Musialik M, Litwinienko G (2005). Use of differential scanning calorimetry to study lipid oxidation. 1. Oxidative stability of lecithin and linolenic acid. *J Agric Food Chem*, 53: 9073-9077
- United States Department of Agriculture - USDA (2002). Nutrient Database for Standard Reference. Release 15, Nutrient. Data Laboratory, Beltsville Research Center, US Department of Agriculture, Pennsylvania (USA)
- Universidad Nacional de Córdoba (2004). Infostat Group, Infostat version 2004, Facultad de Ciencias Agrarias, Argentina

- Universidad Politécnica de Valencia (2013). Parte IV: Tema 20 (6d) Familia Compuestas = Asteráceas (*Compositae=Asteraceae*) <http://www.euita.upv.es> (acceso 08/2013)
- Valenzuela B A, Ronco A M (2004). Fitoesteroles y fitoestanoles: aliados naturales para la protección de la salud cardiovascular. *Rev Chil Nut*, 21(1): 161-169
- Valenzuela B A, Sanhueza C J, Nieto K S (2002). ¿Es posible mejorar la calidad nutricional de los aceites comestibles?. *Rev Chil Nut*, 29: 174-180
- van Nieuwenhuyzen W (1981). The Industrial Uses of Special Lecithins. *J Am Oil Chem Soc*, 58: 886-888
- van Nieuwenhuyzen W (1999). Fractionation of Lecithins. *Eur Food Drink Rev*, 27: 10-32
- van Nieuwenhuyzen W, Szuhaj B F (1998), Effects of lecithins and proteins on the stability of emulsions. *Fett/Lipid*, 100(7): 282–291
- van Nieuwenhuyzen W, Tomás M C (2008a). Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies. *Eur J Lipid Sci Technol*, 110: 472-486
- van Nieuwenhuyzen W, Tomás M C (2008b). Phospholipids. En Selected Themes on Edible Fats and Oils Books. Eds. J. Block, D. Barrera Arellano, AOCS Press, Champaign (USA)
- Villa Salinas V M (2009). Clarificación de aceites y grasas. En: Temas selectos en aceites y grasas, Vol 1-Procesamiento (Eds) J M Block, D Barrera-Arellano. AOCS Press, São Paulo, (Brasil)
- Wagner J R (2000). Propiedades superficiales. En: Caracterización funcional y estructural de proteínas. Ed. Bartholomai G B y Pilosof A M R, Eudeba, Buenos Aires (Argentina)
- Walstra P (1983). Formation of emulsion. En Encyclopedia of Emulsion Technology: Basic Theory. Ed. Becher, P., Marcel Dekker Inc., New York (USA), pp. 57-127
- Walstra P (1993). Principles of emulsion formation. *Chem Eng Sci*, 48(2): 333-349
- Walstra P (1996). Emulsion stability. En Encyclopedia of Emulsion Technology, Vol. 4. Ed. Becher, P., Marcel Dekker Inc., New York (USA)

- Wang T, Hicks K B, Moreau R (2002). Antioxidant activity of phytosterols, oryzanol, and other phytosterol conjugates. *J Am Oil Chem Soc*, 79 (12): 1201-1206
- Wang Y, Li D, Wang L J, Adhikari B (2011). The effect of addition of flaxseed gum on the emulsion properties of soybean protein isolate (SPI). *J Food Eng*, 104: 56-62
- Watson G (1938). Nahuatl word in American English. *American Speech*, 13: 108-121
- Wendel A (2000). Lecithin: the first 150 years Part I: From discovery to early commercialization. *Inform*, 11: 885-892
- Wendel A (2001). Lecitina: los primeros 150 años. Parte 1: Desde su descubrimiento al inicio de su comercialización. *Aceites Grasas*, 43: 189-195
- Wills D M, Burke J M (2006). Chloroplast DNA Variation Confirms a Single Origin of Domesticated Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J Hered*, 97(4): 403–408
- Wu Y, Wang T (2003). Soybean lecithin fractionation and functionality. *J Am Oil Chem Soc*, 80: 319–326
- Wu Y, Wang T (2004). Fractionation of crude soybean lecithin with aqueous ethanol. *J Am Oil Chem Soc*, 81: 697-70
- Yassen E I, Herald T J, Aramouni F M, Alavi S (2005). Rheological properties of selected gum solutions. *Food Res Int*, 38: 11-119
- Ziegelitz R (1995). Lecithin processing possibilities. *Inform*, 6: 1224-1230