



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA

Trabajo de Tesis Doctoral

***Aplicación de subproductos de chía
(Salvia hispanica L.) en emulsiones alimentarias
funcionales***

Tesista

Lic. Luciana Magdalena Julio

Directora

Dra. Mabel Cristina Tomás

Codirectora

Ms. Sc. Susana María Nolasco

Año

2017

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-CIC) bajo la dirección de la Dra. Mabel Cristina Tomás y la codirección de la Ms. Sc. Susana M. Nolasco.



CIDCA

CONICET

LA PLATA

CiC Comisión de
**Investigaciones
Científicas**

A mi familia

*“Recuerda que a veces, no conseguir lo que quieres,
es un maravilloso golpe de suerte”*

Dalai Lama



Agradecimientos

Muchas personas me han apoyado en el camino, y estas personas merecen mi sincero agradecimiento...

A mis directoras de tesis, **Mabel** y **Susana**, por confiar en mí y brindarme la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo. Por el acompañamiento en estos años, por sus palabras de aliento, consejos y experiencia. Un placer.

A mis compañeras de grupo. Mi compañera de box y consejera de estudios **Vanesa**, gracias por aconsejarme mucho más allá de los temas académicos y enseñarme a dar los primeros pasos en este trabajo. A **Estefanía** por tantos momentos compartidos dentro y fuera de CIDCA, gracias por tu amistad y haberme hecho sentir una más desde el primer día, sos una excelente persona. A **Marian** por ser tan buena compañera y persona, por ser siempre muy atenta y brindarme palabras de aliento. A **Claudia** por el empuje y el trabajo en equipo, especialmente en el último tramo de esta etapa.

A mis compañeros de box **Martín**, **Silvana**, **Gabriel**, **Micaela**, **Jimena**, por compartir el día a día en el trabajo y ayudarme con algunas dudas, consejos y el apoyo en momentos complicados, gracias.

A mis amigos de CIDCA **Camilo**, **Juani**, **Nico**, **Dario** por el acompañamiento en lo personal y laboral.

Y a mis compañeros **Ulil**, **Areli**, **Mayday**, **Stephanie**, **Julian** por hacer de mi estadía en México una gran experiencia.

A **Julia Santapaola** por tus consejos y tu confianza en mí.

Al **Dr. Jorge Wagner** por toda su ayuda y buena predisposición; y a su equipo de trabajo de la UNQ **Andrés**, **Gonzalo**, **Dario**, **Cecilia**, **Paula**, **Mariana**, **Juan** por ayudarme con los equipos.

A la **Dra. Maria Rosa Sanches-Torrez** y a su grupo de trabajo del CETMIC especialmente a **Mariela Fernandez** por permitirme hacer mediciones en su Instituto y ayudarme con los equipos, siempre con la mejor predisposición.

A la **Dra. Maira Segura-Campos**, por la buena atención y dirección en el trabajo realizado durante mi estancia de investigación en la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY).

Al **Ph.D. Bernd Diehl** (Spectral Service), a la **Dra. Margarita García** (INIBIOLP), **Daniel Russo** (CIDCA), **Prof. Christopher Young** (UNLP), **Dr. Pablo Salgado** (CIDCA) por su valioso aporte técnico a este trabajo de Tesis.

A la Facultad de Ingeniería de la **Universidad Nacional de Jujuy** (FI-UNJU) especialmente a la **Ing. Noemí Saavedra** y la **Dra. Julia Santapaola**, excelentes profesoras y personas.

Al **Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos** (CIDCA) (CONICET La Plata-UNLP), muy especialmente a los **Dres Noemí Zaritzky, Rodolfo Mascheroni**, por haberme abierto sus puertas para desarrollar el presente trabajo de Tesis.

A la **Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata** (FCE-UNLP), por brindarme la posibilidad de realizar mi trabajo de Tesis de Doctorado. Al **Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas** (CONICET), **Universidad Nacional de La Plata** (UNLP), **Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires** (UNCPBA), **Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica** (ANPCyT), **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México** (CONACYT) por posibilitar la concreción de este trabajo a través del otorgamiento de diversos tipos de financiamiento.

A **Nutracéutica Sturla** por el aprovisionamiento del aceite de chía, a **Danisco y Productos Harmony S.A.** por la provisión de enzimas y a **Spectral Service** por su aporte a este trabajo.

A **Jorgelina** por tu ayuda en el inglés.

A **Gabriela, Carla, Martín y Gustavo** por el apoyo, aprendí mucho de Uds.

A mis amigos **Iván, Dani, Tere, Mica, Juan Carlos, Mainor, Ceci y Marce** por estar siempre a pesar de la distancia, por compartir conmigo tantos momentos lindos, por el cariño y el apoyo incondicional.

A **mis padres** por estar incondicionalmente apoyándome, por forjar en mi persona el sacrificio, la entrega, la sencillez y la humildad. Son mi motor.

A **mis hermanas** por ser mis mejores amigas, siempre acompañarme en cada paso a través de consejos y palabras de aliento.

A **mis sobrinos** que son mi luz. Gracias por llenarme de amor y hacerme tan feliz.

A **Pablo** por ser mi sostén y compañero de vida. Gracias por aventurarte conmigo...por la paciencia y tanto amor.

A **Eugenio y Sancho** por ser mi cable a tierra y mis fieles compañeros.

A la distancia por enseñarme en estos 5 años a valorar mis raíces, mi origen...



Resumen

En los últimos años se registra una búsqueda de fuentes naturales que presenten componentes y/o productos derivados aplicables al desarrollo de alimentos funcionales, los cuales incidan en la nutrición mediante el aporte simultáneo de efectos benéficos para la salud. En ese contexto se encuentra la chía (*Salvia hispanica* L.), especie vegetal oriunda del sudeste de EEUU y noroeste de América Central (México, Guatemala), constituyente importante de la dieta de civilizaciones desde épocas precolombinas. En nuestro país, su creciente expansión en las provincias del NOA puede contribuir a la diversificación de la producción agrícola, con impacto en términos socioeconómicos.

Cabe señalar el aporte de los lípidos a la salud y el bienestar, lo que está determinado fundamentalmente por su composición. Así, se ha demostrado que tanto el perfil de ácidos grasos, especialmente los niveles relativos de ácidos grasos ω -9, ω -6 y ω -3 así como la presencia de ciertos componentes minoritarios, pueden ejercer una influencia positiva en las funciones fisiológicas de nuestro organismo. En este sentido, las semillas de chía son una fuente interesante ya que su aceite presenta un elevado tenor de ácidos grasos esenciales y antioxidantes naturales, cuya incorporación en la dieta permitiría disminuir la incidencia de enfermedades coronarias, así como de otras enfermedades (diabetes, síndrome metabólico, enfermedades de la piel, procesos inflamatorios, desórdenes del sistema inmunológico, cáncer, depresión). Uno de los desafíos asociados al desarrollo de alimentos funcionales a partir de este sustrato está relacionado con la adecuada preservación del alto tenor de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) ω -3 presente debido a la alta susceptibilidad de registrar rancidez oxidativa.

En función de las consideraciones realizadas, en este trabajo de Tesis se propuso estudiar la inclusión de subproductos de la semilla de chía (aceite, mucílago, proteínas) en alimentos a través del desarrollo de sistemas de provisión o vehiculización de dichos compuestos funcionales y bioactivos, evaluando diversos aspectos asociados a su calidad global.

En el **Capítulo I** se presenta una introducción sobre la *Salvia hispanica* L., describiendo el origen, antecedentes históricos de esta especie, principales características botánicas, así como la composición química y nutricional de la semilla (núculas) de chía, legislación y usos actuales. Además, se describen los aspectos más relevantes relacionados con los aceites vegetales comestibles, en

cuanto a su importancia en la alimentación, composición, estructura, así como los procesos convencionales y alternativos de extracción. Seguidamente, se aborda el concepto de los sistemas de vehiculización “*delivery systems*” de compuestos funcionales y bioactivos mediante la descripción de los fundamentos asociados a la formulación y caracterización de emulsiones y al proceso de microencapsulación. En este último caso, se describen los diversos factores más importantes a tener en cuenta, así como las propiedades a ser determinadas para evaluar la calidad y aplicación del material encapsulado.

En el **Capítulo II** se estudia la obtención y caracterización de emulsiones O/W con subproductos de la semilla de chía (aceite, fracción rica en proteínas y/o mucílago) mediante técnicas convencionales de emulsificación, evaluando la influencia de la composición de la fase acuosa, así como de ciertas variables operativas (presión de homogeneización) sobre sus propiedades fisicoquímicas.

En el **Capítulo III** se detalla la obtención y caracterización de emulsiones O/W mediante la técnica de deposición electrostática “*layer-by-layer*” (LBL) con aceite de chía, evaluando la influencia del tipo de agente emulsificante, la adición de maltodextrina y de quitosano.

En el **Capítulo IV** se investiga la aplicación del proceso de microencapsulación mediante el secado por aspersion de emulsiones O/W convencionales analizando el efecto de las condiciones del proceso y del empleo de distintos materiales de pared sobre las propiedades fisicoquímicas del material encapsulado. Asimismo, se describe la microencapsulación de aceite de chía mediante el secado por liofilización de emulsiones O/W multicapa con su respectiva caracterización.

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

CAPÍTULO 1

Introducción general.....	1
1. La chía.....	2
1.1. Origen y antecedentes históricos.....	2
1.2. La introducción de la chía en la Argentina	4
1.3. Descripción botánica y taxonómica	5
1.4. Distribución geográfica y producción	7
1.5. Producción mundial	10
1.6. Composición química y aspectos nutricionales de la semilla de chía.....	11
1.6.1. Contenido de aceite y composición de ácidos grasos.....	12
1.6.2. Contenido de proteínas y composición de aminoácidos.....	13
1.6.3. Vitaminas y minerales	14
1.6.4. Fibra dietaria	16
1.6.5. Antioxidantes.....	16
1.7. Aspectos legislativos y usos actuales	17
2. Aceites vegetales comestibles	19
2.1. La importancia de las grasas y aceites	19
2.2. Composición y estructura de las grasas y aceites y sus derivados	19
2.3. Ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)	21
2.4. Aceites especiales “gourmet”	26
2.5. Procesamiento de aceites vegetales mediante procesos convencionales.....	28
2.5.1. Etapas incluidas en el proceso de preparación de las semillas oleaginosas	31
2.5.2. Extracción de aceite por prensado	32
2.5.3. Extracción de aceite sólido-líquido	33
2.5.3.1. Extracción.....	33

2.5.3.2. Desolventizado.....	35
2.5.4. Extracción mediante fluidos supercríticos (EFSC).....	36
2.6. Oxidación lipídica.....	37
2.6.1. Autooxidación lipídica.....	37
2.6.2. Factores que afectan la velocidad de autooxidación lipídica	40
2.7. Sistemas de provisión “ <i>delivery systems</i> ”	42
3. Emulsiones alimentarias.....	44
3.1. Importancia de las emulsiones en el área alimentaria	44
3.2. Definiciones	45
3.3. Formación de emulsiones	46
3.4. Dispositivos de homogeneización	48
3.5. Características de gota	51
3.6. Agentes emulsificantes	54
3.7. Balance Hidrofílico-Lipofílico (HLB)	54
3.8. Procesos de desestabilización de emulsiones.....	55
3.9. Oxidación lipídica en emulsiones.....	57
4. Microencapsulación.....	59
4.1. El proceso de microencapsulación.....	60
4.2. Materiales de encapsulación.....	64
4.3. Propiedades de las microcápsulas.....	65
5. Objetivos	66
 CAPÍTULO 2	
Emulsiones O/W con subproductos de chía.....	67
1. Introducción	68
1.1. Factores que determinan las características y estabilidad de las emulsiones O/W.....	69
1.2. Subproductos de chía (<i>Salvia hispanica</i> L.).....	73

2. Materiales y Métodos.....	75
2.1. Materiales y reactivos.....	75
2.2. Preparación de las emulsiones O/W	76
2.3. Almacenamiento de las emulsiones O/W	78
2.4. Caracterización y tratamiento de las emulsiones O/W	78
2.4.1. Distribución de tamaño de partículas y diámetros medios De Sauter y/o De Brouker.....	78
2.4.2. pH y ζ -potencial	79
2.4.3. Propiedades reológicas.....	80
2.4.4. Estabilidad global.....	81
2.4.5. Oxidación de lípidos en emulsiones O/W.....	83
2.4.5.1. Determinación de productos primarios de oxidación (PV).....	83
2.4.5.2. Determinación de productos secundarios de oxidación (<i>p</i> -AV)	83
2.5. Análisis estadístico	84
3. Resultados y Discusión	85
3.1. Caracterización de emulsiones O/W con aceite de chía. Influencia de la concentración de caseinato de sodio, agregado de lactosa y de las variables operativas del proceso de homogeneización.....	85
3.1.1. Distribución de tamaño de partículas y diámetros medios.....	86
3.1.2. pH y ζ -potencial	89
3.1.3. Propiedades reológicas.....	90
3.1.4. Estabilidad global.....	93
3.1.5. Oxidación de lípidos en emulsiones O/W.....	96
3.1.5.1. Productos primarios (PV) y secundarios (<i>p</i> -AV) de oxidación.....	96
3.2. Caracterización de emulsiones O/W con subproductos de chía. Influencia de la composición de la fase acuosa	98
3.2.1. Distribución de tamaño de partículas y diámetros medios.....	98
3.2.2. ζ -potencial.....	101

3.2.3. Propiedades reológicas.....	102
3.2.4. Estabilidad global.....	104
4. Conclusiones parciales.....	107
5. Difusión de Resultados	110

CAPÍTULO 3

Emulsiones O/W multicapa con subproductos de chía y girasol.....	112
1. Introducción	113
1.1. Principios y aplicaciones de la técnica “ <i>layer-by-layer</i> ” (LBL).....	114
1.2. Factores que afectan las propiedades de las emulsiones multicapa.....	117
1.3. Factores que afectan la estabilidad de las emulsiones multicapa.....	122
1.4. Aplicaciones	122
2. Materiales y métodos	124
2.1. Materiales.....	124
2.2. Obtención de lecitinas modificadas de girasol (LGD, FPC)	124
2.2.1. Composición de fosfolípidos de las lecitinas modificadas de girasol.....	124
2.3. Preparación de dispersiones “stock”	125
2.4. Preparación de emulsiones O/W multicapa.....	125
2.5. Caracterización de las emulsiones O/W multicapa	128
2.5.1. Distribución de tamaño de partículas y diámetro medio	128
2.5.2. ζ -potencial.....	128
2.5.3. Propiedades reológicas.....	128
2.5.4. Perfiles de “Back Scattering” (%BS) o luz dispersada	128
2.5.5. Análisis por microscopía confocal láser de barrido (CSLM)	129
2.5.6. Oxidación lipídica de emulsiones multicapa O/W	129
2.5.6.1. Determinación de productos de oxidación	129
2.5.6.2. Determinación de productos secundarios de oxidación.....	129

2.6. Análisis estadístico	130
3. Resultados y discusión.....	131
3.1. Composición de fosfolípidos de las lecitinas modificadas de girasol.....	131
3.2. Caracterización de emulsiones O/W mono y multicapa de aceite de chía con lecitinas de girasol modificadas y maltodextrina	132
4. Conclusiones parciales.....	144
5. Difusión de Resultados	147

CAPÍTULO 4

Aplicación de emulsiones O/W mono y multicapa en la microencapsulación de aceite de chía.....

1. Introducción	149
1.1. Técnicas de microencapsulación.....	151
1.1.1. Secado por aspersion.....	151
1.1.2. Secado por liofilización.....	154
1.2. Materiales de pared.....	155
1.3. Oxidación de lípidos en aceites microencapsulados	156
2. Materiales y Métodos.....	158
2.1. Materiales y reactivos.....	158
2.2. Obtención de microcápsulas de aceite de chía	158
2.2.1. Microencapsulación de aceite de chía mediante secado por aspersion de emulsiones O/W convencionales.....	158
2.2.2. Microencapsulación de aceite de chía mediante secado por liofilización de emulsiones O/W multicapa.....	160
2.3. Caracterización de las emulsiones O/W previo secado	162
2.3.1. Distribución de tamaño de partícula y diámetro medio	162
2.3.2. Propiedades reológicas.....	162
2.3.3. Estabilidad global.....	162

2.4. Almacenamiento de las microcápsulas de aceite de chía	162
2.5. Caracterización fisicoquímica de las microcápsulas de aceite de chía.....	163
2.5.1. Contenido de humedad.....	163
2.5.2. Actividad de agua (a_w).....	163
2.5.3. Análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	163
2.5.4. Eficiencia de la microencapsulación (EM %)	163
2.5.5. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	164
2.5.6. Color	164
2.5.7. Índice de estabilidad oxidativa acelerada.....	164
2.5.8. Dispersabilidad	165
2.5.9. Distribución de tamaño de partículas, diámetro medio, ζ -potencial y estabilidad física de las emulsiones reconstituidas a partir de las microcápsulas.....	165
2.6. Análisis estadístico	166
3. Resultados y Discusión	167
3.1. Microencapsulación de aceite de chía mediante secado por aspersión de emulsiones O/W convencionales.....	167
3.1.1. Efecto de las condiciones de homogeneización y secado sobre las propiedades fisicoquímicas de microcápsulas con aceite de chía	167
3.1.2. Efecto de distintos materiales de pared sobre las propiedades fisicoquímicas de microcápsulas con aceite de chía.....	180
3.2. Microencapsulación de aceite de chía mediante secado por liofilización de emulsiones O/W multicapa (LBL)	191
4. Conclusiones Parciales	202
5. Difusión de Resultados	206
Conclusiones generales.....	207
Perspectivas futuras.....	215
Bibliografía	218



Listado de abreviaturas

a*	parámetro a del sistema de determinación de color CIELab
a _w	actividad acuosa
A ₁	absorbancia de las muestras
A ₂	absorbancia del blanco
AA	ácido araquidónico
ALA	ácido α -linolénico
ANOVA	análisis de varianza
AOCS	American Oil Chemists' Society
AS	aceite superficial
AT	aceite total
b*	parámetro b del sistema de determinación de color CIELab
b.s.	base seca
BHT	2,6-di-tertbutil-4-metilfenol
BS	"Back Scattering"
BS _{AV}	valor medio de "Back Scattering"
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
Ch	Quitosano
CI	índice de cremado

Cl ₀	índice de formación de la fase crema a tiempo inicial
Cl _t	índice de formación de la fase crema a tiempo t
CL	Emulsiones O/W de aceite de chía con caseinato de sodio y lactosa
CL+Mg	Emulsiones O/W de aceite de chía con caseinato de sodio, lactosa y mucílago de chía
CM	Emulsiones O/W de aceite de chía con caseinato de sodio y maltodextrina
CM+Mg	Emulsiones O/W de aceite de chía con caseinato de sodio, maltodextrina y mucílago de chía
CSLM	microscopía confocal láser de barrido
CO ₂	dióxido de carbono
CS	caseinato de sodio
D	diámetro medio
[D _{3,2}]	diámetro medio de Sauter
[D _{4,3}]	diámetro medio De Brouker
DHA	ácido docosahexanoico
DHGLA	ácido dihomo-γ-linolénico
DPA	ácido docosapentanoico
DSC	calorimetría diferencial de barrido
DT	desolventizador-tostador
DTP	distribución de tamaño de partículas
ED	equivalente de dextrosa
EFSC	extracción mediante fluidos supercríticos
ELS	“Electrophoretic Light Scattering”

EM	eficiencia de microencapsulación
EO	estabilidad oxidativa
EPA	ácido eicosapentanoico
ETA	ácido eicosatetraenoico
FDA	“Food and Drug Administration”
FPC	fracción enriquecida en fosfatidilcolina
FRF	fracción de harina de chía rica en fibra
GA	goma arábica
GC	cromatografía gaseosa
GLA	ácido γ -linolénico
GRAS	“Generally recognized as safe”
H	altura de la capa de suero formado en la base del tubo de muestra
H ₀	altura inicial de la emulsión
H•	radical hidrógeno
HLB	balance hidrofílico-lipofílico
H NMR	Resonancia Magnética Nuclear
I	iniciadores
IUPAC	“International Union of Pure and Applied Chemistry”
K	coeficiente de consistencia
L	D-lactosa monohidratada
L	Emulsión O/W primaria con lecitina de girasol “deoiled”
LM	Emulsión O/W primaria con lecitina de girasol “deoiled” y maltodextrina
LQ	Emulsión O/W secundaria con lecitina de girasol “deoiled” y

	quitosano
LQ+M	Emulsión O/W secundaria con lecitina de girasol “deoiled”, quitosano y maltodextrina
L*	parámetro L del sistema de determinación de color CIELab
L•	radical libre lipídico
LBL	<i>“layer-by-layer”</i>
LA	ácido linoleico
LGD	lecitina de girasol “deoiled”
LH	lípidos insaturados
LO•	radical alcóxido
LOO•	radical peróxido
LOOH	hidroperóxido
M	maltodextrina
MG	goma de mesquite
Mg	mucílago de chía
n	índice de comportamiento de flujo
NOA	noroeste argentino
OH•	radical hidroxilo
OHC	capacidad de retención de aceite
O/W	aceite en agua
P	polidispersidad
p	nivel de significación
<i>p-AV</i>	valor de <i>p</i> -ansidina
pI	punto isoeléctrico

PC	Emulsión O/W primaria con fracción enriquecida en fosfatidilcolina
PC+M	Emulsión O/W primaria con fracción enriquecida en fosfatidilcolina y maltodextrina
PCQ	Emulsión O/W secundaria con fracción enriquecida en fosfatidilcolina y quitosano
PCQ+M	Emulsión O/W secundaria con fracción enriquecida en fosfatidilcolina, quitosano y maltodextrina
PM	Emulsiones O/W de aceite de chía con fracción rica en proteínas de chía y maltodextrina
PM+Mg	Emulsiones O/W de aceite de chía con fracción rica en proteínas y mucílago de chía y maltodextrina
PUFAs	ácidos grasos poliinsaturados
PV	índice de peróxido
R	coeficiente de correlación
RE	emulsión reconstituida
RH	humedad relativa
ROOH	hidroperóxidos lipídicos
SDA	ácido estearidónico
SEM	Microscopía electrónica de barrido
T	Transmitancia
t	tiempo
t _i	tiempo de inducción
TBA	ácido 2-tiobarbiturico
TBARs	sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TCA	ácido tricloroacético
TE	equivalente Trolox
TEP	tetraetoxipropano
Tg	temperatura de transición vítrea
USDA	“United States Department of Agriculture”
W	ancho de la distribución
WPC	proteína de suero concentrado
WHC	capacidad de retención de agua
β	velocidad de calentamiento (DSC)
φ	fracción volumétrica de fase dispersa
φ_m	fracción másica de fase dispersa
V_d	volumen de la fase dispersa
m_d	masa de la fase dispersa
V_e	volumen de la emulsión
m_e	masa de la emulsión
δ_d	densidad de la fase dispersa
δ_c	densidad de la fase continua
η_l	viscosidad de la fase lipídica
η_a	viscosidad de la fase acuosa
η_{100}	viscosidad aparente
ζ -potencial	potencial zeta
μ	movilidad electroforética
ε	constante dieléctrica
τ	esfuerzo de deformación

$\dot{\gamma}$	velocidad de deformación
λ	longitud de onda
ω -3	ácidos grasos omega-3
ω -6	ácidos grasos omega-6
%Vd>1	porcentaje de partículas con diámetros mayores a 1 μ m



CAPÍTULO 1

Introducción general

1. La chía

1.1. Origen y antecedentes históricos

Salvia hispanica L. es una especie herbácea anual de la familia Lamiaceae o labiadas. Esta planta es comúnmente conocida como chía, siendo esta palabra una adaptación española al término nahua *chian* o *chien* (plural), término que en náhuatl significa “semilla de la que se obtiene aceite” (Watson, 1938). La chía es un cultivo autóctono de Mesoamérica, definida como una zona de influencia de culturas mexicanas en la época precolombina y su origen se remonta a los 3500 años a.C. Si bien ninguna fuente afirma de manera categórica que la chía sea originaria de un lugar específico, existe una alta probabilidad relacionada con los territorios que actualmente ocupan la República Mexicana y Guatemala (Tecante, 2010).

Durante siglos esta pequeña semilla -denominando semilla al grano entero- fue uno de los principales componentes de la dieta de los aztecas junto con la quínoa, el amaranto, el maíz y alguna variedad de porotos (Rodríguez Vallejo, 1992). La importancia de estos cuatro cultivos en la dieta azteca está bien fundamentada en el Codex Florentino escrito en tiempos de la conquista de América entre 1548 y 1585 por Fray Bernardino de Sahagún, titulado “Historia general de las cosas de Nueva España”, en el cual se describen algunos aspectos relacionados con la producción, comercialización y usos de la chía (**Figura 1.1**). 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). Tenochtitlán, la capital del Imperio Azteca, recibía entre 5.000 y 15.000 tn de chía anualmente como tributo de los pueblos conquistados (Codex Mendoza, 1542). Con respecto a los Mayas, no existe evidencia que la chía fuera cultivada en el apogeo de su civilización (800 a.C. a 900 d.C.), aunque la existencia de un intenso comercio entre los centros Teotihuacanos y Mayas durante varios siglos hacen suponer que la chía también era conocida por este pueblo precolombino, el cual ocupó una gran parte de México, Guatemala, Honduras y El Salvador (Ayerza y Coates, 2005).



Figura 1.1. Imagen del Codex Florentino ilustrando la planta de chía (Sahagún, 1579)

Con la llegada de los españoles, las tradiciones de los nativos fueron suprimidas y la mayor parte de su agricultura intensiva y de su sistema de comercialización destruidos. Los cereales introducidos por los españoles (trigo, cebada, arroz, entre otros) desplazaron muchos cultivos que habían tenido la mayor preponderancia en las dietas precolombinas. Así, de los cuatro cultivos básicos de la dieta azteca, la chía y el amaranto perdieron sus lugares privilegiados y casi desaparecieron, siendo los efectos de la persecución española mayores sobre la chía que sobre el amaranto. El desarrollo paralelo del cultivo en las dos civilizaciones favoreció la supervivencia del amaranto comparado con el de la chía (National Research Council, 1989). Teniendo en cuenta que la chía es una planta de día corto, cuya floración sólo puede ser lograda en los países europeos durante el periodo de heladas o cercano a ellas y a las cuales no es tolerante, este requerimiento fisiológico impidió que la misma fuera cultivada en el Viejo Mundo (Ayerza y Coates, 2005). Sin embargo, esta especie logró sobrevivir a la persecución de los conquistadores españoles debido a la conservación de algunas tradiciones precolombinas por parte de pequeños grupos de descendientes de las naciones Nahua. Así, estos pueblos lograron vencer a los conquistadores y las presiones de la cultura impuesta, permaneciendo aislados en el sudoeste de México y las zonas montañosas de Guatemala.

Con respecto al periodo postcolombino, existen algunas referencias tales como datos censales de 1780, así como la Nueva farmacopea de México (1874) y las estadísticas del Departamento de Agricultura publicadas por la Secretaría

mexicana de Agricultura y Promoción desde 1932 a 1935 que citan a la chía entre los cultivos realizados en México (Cortéz y Larraz, 1958; American Journal of Pharmacy, 1885; Rulfo, 1937). Durante muchos años las semillas de chía fueron comercializadas solamente en los mercados mexicanos y utilizadas 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 inició la comercialización en los Estados Unidos de un alimento para mascotas (Chia Pets), con lo que se incrementó la demanda de las semillas y posibilitó la venta mayoritaria de su producción.

1.2. La introducción de la chía en la Argentina

En los últimos años, la chía resurgió adquiriendo particular importancia debido a la composición química de su semilla. Posee entre un 30-35% de lípidos, destacándose el ácido α -linolénico (~ 64 %), ~ 25 % de fibra, ~ 20 % de proteínas. Es también fuente de otros compuestos de gran importancia para la salud, tales como antioxidantes, vitaminas y minerales. Por otra parte, no contiene componentes tóxicos ni gluten, por lo que es apta para celíacos y la convierte en un alimento completo y saludable (EFSA, 2005; EFSA, 2009). El aceite de chía es excelente como agente secante para la protección de pinturas, artesanías y maderas finas (Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de plagas, 2014). Estas propiedades fueron redescubiertas recientemente e impulsaron la demanda de esta semilla por parte de los países más desarrollados, especialmente Estados Unidos y la Unión Europea.

En América del Sur el interés de su cultivo fue promovido por el desarrollo del “Proyecto Regional del Noroeste de Argentina” en la primera mitad de la década de los 1990s. En esta iniciativa, organizaciones privadas y gubernamentales tanto de los Estados Unidos como de Argentina trabajaron en forma cooperativa con el objetivo de identificar y desarrollar comercialmente nuevos cultivos industriales que pudieran diversificar la producción agrícola e incrementar los beneficios de los productores del noroeste argentino (NOA), entre ellos la chía. A tal fin, se introdujeron materiales genéticos y se aportaron sistemas de siembra y

cultivos promoviendo el modelo de la “agricultura por contrato”, el cual garantizaba la compra de la cosecha a un precio fijado al momento de la siembra. Así, esta modalidad restringió el cultivo de la chía en nuestro país hasta la llegada de diversas empresas nacionales y multinacionales dedicadas a su producción, procesamiento y comercialización (Busilacchi y col., 2015). De esta manera, en el periodo 2010/11 la superficie sembrada se limitaba a la agricultura por contrato y el total de la producción respondía a ese modelo, mientras que entre 2011/12 una sequía histórica en la región y el crecimiento de los precios internacionales del producto provocaron un incremento explosivo de la superficie sembrada con chía (Scalise, 2014).

1.3. Descripción botánica y taxonómica

La planta chía (*Salvia hispanica* L.) pertenece a la familia Lamiaceae, que a su vez es parte de la familia de la menta. Su descripción taxonómica 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*

S. hispanica es una planta herbácea anual que florece durante los meses de verano. La planta tiene un porte erecto, alcanza entre 1-1,5 m de altura, con tallos ramificados de sección cuadrangular con pubescencias cortas y blancas. Las hojas opuestas con bordes aserrados miden 8-10 cm de longitud y 4-6 cm de ancho (**Figura 1.2**). Las flores son hermafroditas púrpuras o blancas, pedunculadas y se encuentran reunidas en grupos de seis o más, en verticilos sobre el raquis de la inflorescencia (Martínez, 1959; Ramamoorthy, 1985).



Figura 1.2. Cultivo y planta de *Salvia hispanica* L.

El fruto 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, como se muestra en la **Figura 1.3** (Ayerza y Coates, 2005). Las semillas son pequeñas, miden entre 2-2,5 mm de largo, 1,2-1,5 mm de ancho y 0,8-1 mm de espesor; una vez limpias y secas pueden mantenerse durante años ya que contienen antioxidantes que previenen el deterioro del aceite retenido en su interior. En general, las semillas blancas son mayores en peso, ancho y grosor que las oscuras (Ixtaina y col., 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 largas, presencia de dominancia apical y uniformidad en los periodos de floración y maduración (Cahill, 2005). Como en la mayoría de las plantas cultivadas, en la chía ha existido una ligera pérdida de variabilidad genética en el proceso de domesticación. En la actualidad, los esfuerzos se han dirigido hacia la selección de plantas domesticadas, a partir de una porción pequeña del total de la diversidad genética (Cahill, 2004).



Figura 1.3. Semillas de chía (*Salvia hispanica* L.)

1.4. Distribución geográfica y producción

El cultivo de la *S. hispanica* se debe ajustar a determinadas condiciones agroecológicas. En este sentido, el crecimiento de la chía se ve favorecido en suelos arenosos-limosos, aunque puede crecer en suelos arcillosos-limosos si tiene un buen drenaje. La planta es bastante resistente a suelos alcalinos y pocos profundos, y se adapta bien en suelos con diferentes niveles de nutrientes. Sin embargo, un bajo contenido de nitrógeno puede ser un factor limitante para obtener buenos rendimientos (Ayerza y Coates, 2005). Si bien la semilla de chía necesita suelos húmedos para germinar, una vez que se han establecido las plántulas, se comporta adecuadamente con cantidades limitadas de agua siendo capaz de crecer bajo un amplio rango de precipitaciones (Ayerza y Coates, 2005). Presenta un ciclo de aproximadamente 150 días entre la siembra y la cosecha, según la zona geográfica de producción, siendo considerados críticos los primeros 45 días debido a que la chía crece muy despacio y las malezas pueden competir por luz, nutrientes y agua. La planta de chía se induce a floración con días cortos y menos de 12 horas de luz. En ese periodo es clave la ausencia de lluvias que afecten las flores y el polen, ya que es una especie de fecundación cruzada. Durante la etapa de fructificación, cuando el grano se encuentra en estado lechoso (a partir de mayo y parte de junio en el NOA) debe evitarse la exposición a heladas que podrían provocar mermas en el contenido de aceite de la semilla, afectando así la calidad del producto. Esta

situación limita la siembra del cultivo a zonas con poca o nula ocurrencia de heladas en ese periodo (Scalise, 2014).

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 del ácido graso α -linolénico, tal como ocurre en otras oleaginosas (Howell y Collins, 1957). La **Tabla 1.1** muestra el contenido y la composición acídica del aceite de 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 1.1. 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/100g 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

La cosecha debe practicarse dentro de periodos secos, con contenidos de humedad inferiores al 11% en la semilla para posibilitar su posterior almacenamiento ya que, si el fruto maduro queda expuesto a lluvias, el mucílago que recubre las semillas provoca que estas queden pegadas dentro del aquenio, dificultando la cosecha y ocasionando una disminución de la calidad industrial (Scalise, 2014).

En Argentina la chía se cultiva fundamentalmente en el NOA, ya que esta región cumple con los requisitos básicos para el cultivo de la misma, periodos

libres de heladas muy intensas y clima monzónico (lluvias desde octubre a mayo y seca desde junio a octubre). La época de siembra comprende desde mediados de enero hasta principios de marzo. Las áreas de cultivo más propicias están ubicadas en la zona que se extiende desde el norte de Santiago del Estero hasta al norte del país y desde Catamarca hasta el oeste de Formosa (Scalise, 2014). Las mayores superficies de producción se ubican en el norte de Salta (Gral. José de San Martín, Orán y Anta), el este de Jujuy y el oeste de Formosa (**Figura 1.4**).

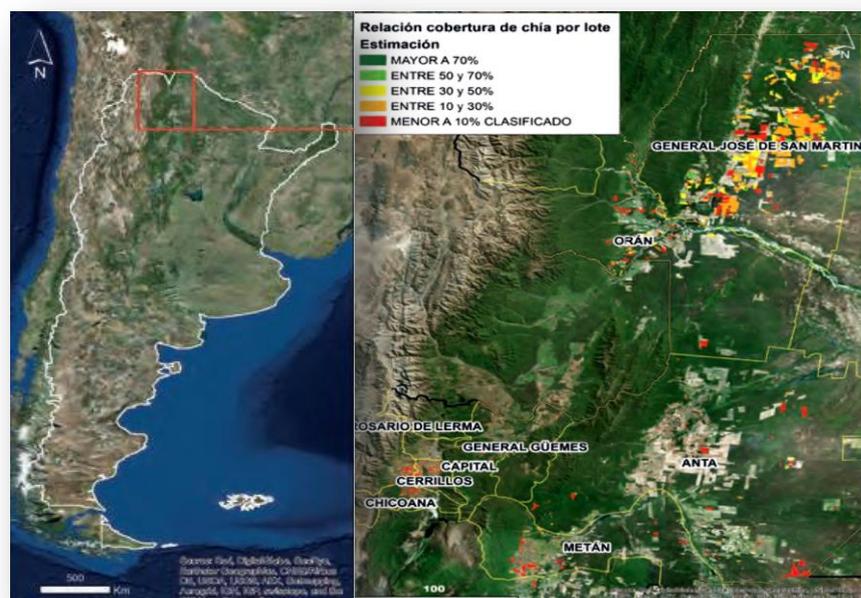


Figura 1.4. Mapa de los departamentos de Salta con la clasificación de lotes con características espectrales asociados al cultivo de chía (Scalise, 2014)

En estos casos, la implantación obedece a criterios económicos distintos de los estrictamente ordenados por la productividad y la calidad, definiéndose por la necesidad de cubrir parte de la inversión realizada en la siembra ante la pérdida de los cultivos privilegiados por los grandes establecimientos de la zona, tales como los porotos y la soja. Es decir que el calendario de siembra de estos cultivos (octubre, noviembre y diciembre para los porotos y la soja; enero y febrero para la chía) permite la resiembra de chía en los mismos lotes previamente sembrados con soja o porotos, como forma de recuperar el costo de los insumos aplicados (herbicidas pre-emergentes) (Scalise, 2014).

1.5. Producción mundial

A nivel mundial, la producción de chía registró un aumento vertiginoso. En el periodo 2011-2014 experimentó un crecimiento promedio anual del 106% (Scalise, 2014). En la actualidad Argentina, Paraguay y Bolivia concentran cerca del 80% de la producción mundial, seguido por México, Nicaragua, Australia, Perú y Ecuador (**Tabla 1.2**).

Tabla 1.2. Producción mundial de chía. Evolución del volumen de producción de chía en los principales países productores. Periodo 2011-2014 (Scalise, 2014)

Principales países productores	Miles de toneladas			
	2011	2012	2013	2014
Argentina	5,000	28,000	17,520	47,000
Paraguay	1,200	1,400	25,000	32,000
Bolivia	1,600	1,460	14,500	27,500
México	3,449	2,060	8,430	11,000
Nicaragua	0,201	0,215	0,440	8,165
Australia	3,600	1,485	2,200	3,055
Perú	0,127	0,520	1,600	2,880
Ecuador	0,300	0,700	1,010	1,400
Resto del mundo	0,073	0,160	1,800	3,000
Total mundial	15,550	36,000	72,500	136,000

Alrededor del 96-97% de la producción de chía tiene como destino la exportación realizada por empresas especializadas en el comercio de “specialities” (Scalise, 2014). En el periodo 2011/2014 el volumen de exportaciones (en toneladas) creció siete veces registrando una tasa de crecimiento promedio anual del 94%. En el año 2014 se observó que Bolivia, Paraguay y Argentina concentraron algo más de dos tercios de las exportaciones mundiales, totalizando 36.300 ton, seguidos por México con el 11 %, Nicaragua y Ecuador, cada uno con el 5%, Perú con el 4%, Australia y Chile con el 3% cada uno y el resto (una decena de países) con el 2% restante (Scalise, 2014). Las importaciones de ese año reflejaron que los principales compradores son Estados Unidos (53%) y la Unión Europea (17%), seguidos por Chile y Perú (con 6% cada uno), Australia (4%), Bolivia (3%), Canadá y China (2% cada uno), Paraguay, Israel y Sudáfrica (con el 1% cada uno).

Hasta el momento, los países de la Unión Europea no se han incorporado sustancialmente a la demanda mundial de chía, entre otras razones debido a la prohibición del consumo humano de la semilla años atrás. Además, la incorporación al consumo de otras regiones del mundo, como Asia y en especial China, no ha sido trascendente y en la actualidad no constituye un importante polo de demanda (Scalise, 2014).

En Argentina el consumo local de chía no es muy alto en relación a la producción. Se estima que en el año 2014 de las 47.000 toneladas cosechadas, 150 fueron destinadas al consumo directo (sin tratamiento industrial), otras 350 se utilizaron para la extracción de 70.000 litros de aceite (elaboración de cápsulas de aceite) y el resto de la producción fue exportada (Scalise, 2014).

1.6. Composición química y aspectos nutricionales de la semilla de chía

La **Tabla 1.3** muestra la composición correspondiente a las semillas de chía y a los cereales de mayor importancia a nivel mundial (arroz, cebada, avena, trigo, maíz).

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)

Puede verse que el contenido de proteínas, lípidos, fibra y energía de la semilla de chía es mayor que los presentes en los demás cultivos. Asimismo, es importante remarcar que si bien la chía es conocida principalmente como una importante fuente natural de ácidos grasos ω -3 (~65 % de su aceite es ácido graso α -linolénico), también posee otros compuestos de importancia a nivel nutricional.

La semilla contiene concentraciones significativas de antioxidantes naturales y fibra dietética. Se ha observado que cuando la semilla se coloca en un medio acuoso, exuda un polisacárido mucilaginoso que rodea la semilla. Se ha informado que el consumo de este mucílago ayuda a la digestión y que, junto con la semilla, constituye una fuente alimenticia nutritiva (Muñoz y col., 2012). Además, la semilla es una fuente importante de vitaminas y minerales, está libre de gluten y no contiene componentes tóxicos.

1.6.1. Contenido de aceite y composición de ácidos grasos

El contenido de aceite de la semilla de chía es del 25 - 40%, presentando el mayor porcentaje de ácido α -linolénico (ALA, ω -3) conocido hasta el momento (~65%) y ~20% de ácido linoleico (ω -6), ambos requeridos por el organismo humano para una buena salud (Muñoz y col. 2013). Así, esta semilla posee el tenor más elevado (~82 - 84%) de ácidos grasos esenciales (ácidos α -linolénico y linoleico), seguida por el cártamo, el lino y el girasol con 75, 72 y 67%, respectivamente (Ciftci y col., 2012). Por su parte, los aceites de colza y de oliva presentan un alto tenor de ácidos grasos insaturados (67 y 82%, respectivamente) debido al gran contenido de ácido oleico, si bien registran niveles de ácidos grasos poliinsaturados del 27 y 11%, respectivamente.

La **Tabla 1.4** muestra una caracterización comparativa del perfil de ácidos grasos de diversas fuentes ricas en ω -3 asociadas al pez “menhaden” (*Brevoortia tyrannus*), la semilla de lino, la semilla de chía y las algas marinas. Cabe señalar que de estas cuatro materias primas el lino (*Linnum usitatissimum* L.) y la chía (*Salvia hispanica* L.) son los cultivos agrícolas que presentan la mayor concentración de ALA ω -3 conocida hasta el presente (Ayerza, 1995; Ayerza y Coates, 1996; Oomah y Kenasehuk, 1995). Las otras dos fuentes son de origen marino y contienen DHA y EPA, ambos ácidos grasos ω -3 de cadena larga. Puede observarse que la chía y el lino tienen un contenido de ω -3 mucho mayor y un menor tenor de ácidos grasos saturados respecto de las fuentes marinas. El aceite de chía presenta un contenido de ácidos grasos saturados 2,8 y 5,1 veces menor que el aceite del pez “menhaden” y las algas, respectivamente. Adicionalmente, los aceites de chía, lino y algas marinas -al ser especies vegetales- se diferencian principalmente del obtenido a partir del pez “menhaden”, ya que éste último -al ser

un recurso de origen animal- contiene cantidades apreciables de colesterol (521 mg/100 g) (United States Department of Agriculture, 2002).

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
Pez "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:** ácido araquidónico; **20:5:** ácido eicosapentanoico (EPA); **22:5:** ácido docosapentanoico (DPA); **22:6:** ácido docosahexanoico (DHA);
¹ ω -7; ² ω -9; ³ ω -6; ⁴ ω -3

Los efectos benéficos del pescado han recibido mucha atención; sin embargo, los ácidos grasos EPA y DHA son fácilmente peroxidados formando hidroperóxidos, cuyos productos de degradación secundaria son perjudiciales a nivel celular desde el punto de vista toxicológico (Sugihara y col., 1994). La evidencia científica muestra que tanto EPA como DHA pueden ejercer efectos benéficos en cuanto a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, sólo si la protección contra el estrés oxidativo es suficiente para minimizar el daño a nivel tisular (Song y col., 2000).

Por otra parte, en lo que respecta al enriquecimiento de alimentos con ω -3, la chía presenta la ventaja de no transmitir el característico "olor a pescado", lo que la diferencia de las otras fuentes previamente mencionadas, con un menor contenido de sodio (Ayerza y Coates, 2005).

1.6.2. Contenido de proteínas y composición de aminoácidos

La chía posee un contenido de proteínas que oscila entre 19 y 23% (Tabla 1.3), el cual es mayor que el asociado a los cereales tradicionales, presentando como ventaja adicional el no contener gluten, motivo por el cual ha sido aprobada

por la Asociación Celíaca Argentina como apta para su uso en pacientes celíacos (Ayerza y Coates, 2001). Los aminoácidos de las proteínas de la chía también se muestran en la **Tabla 1.5**.

Tabla 1.5. Contenido de aminoácidos correspondientes a hidrolizados de proteínas de semillas de chía (Ayerza y Coates, 2005)

Aminoácido	g/16 g N	Aminoácido	g/16 g N
Ácido aspártico	7,64	Isoleucina	3,21
Treonina	3,43	Leucina	5,89
Serina	4,86	Triptófano	-
Ácido glutámico	12,40	Tirosina	2,75
Glicina	4,22	Fenilalanina	4,73
Alanina	4,31	Lisina	4,44
Valina	5,10	Histidina	2,57
Cisteína	1,47	Arginina	8,90
Metionina	0,36	Prolina	4,40
Total			80,64

Cabe señalar el contenido de lisina, así como mayores porcentajes de metionina y cistina que los presentes en proteínas de otras semillas oleaginosas (Ting y col., 1990).

1.6.3. Vitaminas y minerales

La semilla de chía es una buena fuente de vitaminas B (**Tabla 1.6**). Investigaciones recientes muestran que bajos niveles de vitamina B en sangre están asociados a un aumento en el riesgo de sufrir una enfermedad cardiocoronaria fatal y apoplejía (American Heart Association, 1999). La comparación del contenido de vitaminas de la chía con respecto al de otros cultivos tradicionales muestra que el nivel de niacina es mayor que el presente en maíz, soja, arroz y cártamo, mientras que su tenor de vitamina A es inferior al de maíz. Las concentraciones de tiamina y riboflavina son similares a las del arroz y el maíz, aunque menores que las de soja y de cártamo (Ayerza y Coates, 2005).

Con respecto al contenido de minerales, las semillas de chía son una excelente fuente de calcio, fósforo, magnesio, potasio, hierro, zinc y cobre (**Tabla**

1.6). Además, contienen entre 13-354, 2-12 y 1,6-9 veces más calcio, fósforo y potasio, respectivamente que el trigo, arroz, cebada, avena y maíz. Asimismo, en comparación con la leche, las semillas de chía presentan un contenido 6 veces mayor de calcio, el doble de fósforo y 4,6 veces más de potasio (United States Department of Agriculture (USDA), 2002; Instituto Nacional de Alimentos, 2003).

Los niveles de hierro en las semillas y la harina desgrasada de chía son muy elevados, en comparación con los informados para otras semillas (Bushway y col., 1981).

Tabla 1.6. Contenido de vitaminas y minerales presentes en semillas de chía y en harina residual desgrasada

Nutriente	Semilla de chía	
	Entera ¹	Harina desgrasada ²
Macroelementos (mg/100g)		
Calcio	714	1180
Potasio	700	1100
Magnesio	390	500
Fósforo	1067	1170
Microelementos (mg/100g)		
Aluminio	2	4,3
Boro	-	1,4
Cobre	0,2	2,6
Hierro	16,4	20,4
Manganeso	2,3	6,8
Molibdeno	0,2	-
Sodio	-	2,9
Zinc	3,7	8,5
Vitaminas (mg/100)		
Niacina	6,13	11,30
Tiamina	0,18	0,79
Riboflavina	0,04	0,46
Vitamina A	44 IU	-

¹ Instituto Nacional de Alimentos (2003); ² Brown (2003)

1.6.4. Fibra dietaria

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 dietaria que la cebada, trigo, avena, maíz y arroz, respectivamente (**Tabla 1.3**). El contenido de fibra en la harina residual de chía representa alrededor del 40%, del cual ~5% corresponde a fibra dietaria soluble, denominada mucílago. Al ser sumergidas en agua, las semillas de chía quedan envueltas por un material de aspecto gelatinoso conocido como mucílago, el cual es de interés no sólo desde el punto de vista nutricional sino de importancia como agente espesante en la industria alimentaria. Dicho mucílago es un tetrapolisacárido lineal compuesto por D-xilosa, D-glucosa, 4-o-metil-D-ácido glucurónico en proporciones de 2:1:1, cuyo peso molecular varía entre 0,8 a 2×10^3 kDa. D-xilosa y D-glucosa son los principales azúcares con cantidades significativas de ácidos urónicos (ácidos glucurónico y galacturónico) y otros azúcares neutros tales como arabinosa y galactosa (Timilsena y col., 2016). Presenta una elevada viscosidad en agua con posibles y benéficos efectos metabólicos con respecto a fuentes de fibra dietaria de menor viscosidad tales como la goma guar o β -glucano (Lin y col., 1994).

1.6.5. Antioxidantes

La **Tabla 1.7** muestra los compuestos polifenólicos presentes en extractos hidrolizados y no hidrolizados obtenidos a partir de la semilla de chía (Taga y col., 1984).

Vázquez-Ovando y col. (2009) obtuvieron una fracción de harina de chía rica en fibra (FRF) y evaluaron su actividad antioxidante, la cual fue de 488,8 mmol equivalentes Trolox (TE)/g, valor similar al informado para el salvado de sorgo con alto contenido de taninos (Awika y col., 2003), mayor que el de algunos granos de trigo (Iqbal y col., 2005) y la mitad que el informado para el vino tinto, el que presenta uno de los niveles más altos de actividad antioxidante (Saura-Calixto y Goñi, 2006). La elevada actividad antioxidante de la FRF es atribuible a la presencia de los compuestos polifenólicos citados en la **Tabla 1.7**, principalmente los ácidos cafeico y clorogénico (Taga y col., 1984) y en menor proporción a la

quercetina, la cual es uno de los compuestos más potentes y estables que inciden en la actividad antioxidante (Huang y col., 2005).

Tabla 1.7. Concentración de antioxidantes fenólicos presentes en extractos de semilla de chía (Taga y col., 1984)

Compuesto	g/kg de semilla de chía
Extracto no hidrolizado	
<i>Flavonoles</i>	nd
<i>Ácidos cinámicos</i>	
Ácido cafeico	6,6 x 10 ⁻³
Ácido clorogénico	7,1 x 10 ⁻³
Extracto hidrolizado	
<i>Flavonoles</i>	
Mircetina	3,1 x 10 ⁻³
Quercetina	0,2 x 10 ⁻³
Kaempferol	1,1 x 10 ⁻³
<i>Ácidos cinámicos</i>	
Ácido cafeico	13,5 x 10 ⁻³

Asimismo, Ixtaina (2010) registró un contenido total de tocoferoles de 95-110 ppm en las semillas de chía, siendo el principal compuesto γ -tocoferol. Además, se encontraron menores concentraciones de δ -tocoferol, así como trazas de α -tocoferol (Ixtaina, 2010).

1.7. Aspectos legislativos y usos actuales

Mediante la Resolución Conjunta 201/2008 y 567/2008 se realizó una modificación del Artículo 896 bis, a fin de incorporar la semilla de chía en el Código Alimentario Argentino (CAA). En dicho artículo, se denomina semillas de chía a las semillas sanas, limpias y bien conservadas de *Salvia hispanica* L., de color marrón oscuro, tamaño muy pequeño y de buena fluidez, con aroma suave, agradable y propio de la semilla. El máximo contenido de agua permitido (determinado a 100-105 °C) es de 7%, con un mínimo de 33% de materia grasa, menos de 0,5% de semillas dañadas y libres de insectos vivos. Las semillas no deben contener más de 1% de materias extrañas, de las cuales el material mineral debe ser inferior a 0,25%, mientras que los insectos muertos, fragmentos o restos de insectos y/u

otras impurezas de origen animal no deben superar el 0,1% (Código Alimentario Argentino, 2008).

En el año 2009, se incorporó al CAA el Artículo 1407 bis, en el cual se incluyó con la denominación de harina de chía al producto proveniente de la molienda de la semilla de chía (*Salvia hispanica* L.), debiendo presentar ésta última, características de semillas sanas, limpias y bien conservadas, que hayan sido sometidas a prensado para la remoción parcial o prácticamente total del aceite que contienen. En el mismo, se tienen en cuenta dos tipos de harina de chía, según lo especificado en la **Tabla 1.8**.

En el mismo año, 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).

Tabla 1.8. Composición de diversos tipos de harina de chía autorizadas en el Código Alimentario Argentino (Art. 1407 bis, CAA)

	Harina de chía	
	Parcialmente desgrasada	Desgrasada
Humedad (100-105 °C) (%)	9	5
Proteína (N x 6,25) mín (%)	20	29
Grasa (Extracto etéreo) máx (%)	18	7
Fibra total máx (%)	35	52
Cenizas (500-550 °C) máx	5	6

A nivel internacional, la semilla de chía es considerada como un suplemento dietario por la FDA (Food and Drug Administration, 2009). Por otra parte, en el año 2009 quedó autorizada en el mercado comunitario (Unión Europea) la comercialización de semillas de chía (*S. hispanica*) y semillas de chía trituradas, para ser utilizadas como un nuevo ingrediente alimentario en productos de panadería con un contenido máximo del 5% (Comisión de las Comunidades Europeas, 2009). En 2013, este contenido fue modificado extendiendo el nivel de este ingrediente hasta un 10% en las categorías de alimentos tales como productos de panadería, cereales y mezcla de frutos secos para desayuno (Comisión de las Comunidades Europeas, 2013).

2. Aceites vegetales comestibles

2.1. La importancia de las grasas y aceites

Las grasas y aceites comestibles constituyen una fuente muy importante para la nutrición de los seres humanos y su demanda se ha incrementado en función del tiempo, lo cual, dado que el crecimiento de la población mundial trae aparejado este tipo de necesidades, depara un desafío permanente (Autino, 2009a). La importancia de los aceites vegetales comestibles radica en su alto valor energético, así como en su capacidad de ser vehículo de las vitaminas liposolubles y fuente de ácidos grasos esenciales, los cuales son indispensables para el organismo. Además, es importante su contribución ya que tienen impacto en la palatabilidad de los alimentos (Bockisch, 1998).

Las grasas también proporcionan una consistencia suave y cremosa, la cual se traduce en una agradable sensación bucal. El mejoramiento del sabor es el motivo principal por el cual las grasas y los aceites han sido apreciados durante largo tiempo.

2.2. Composición y estructura de las grasas y aceites y sus derivados

A fin de comprender las reacciones que involucran a las grasas y aceites y las tecnologías aplicadas e influir sobre sus características y comportamiento durante el procesamiento, es importante conocer las propiedades de los mismos. Los aceites y grasas más comunes están compuestos por un número pequeño de unidades constitutivas principales, motivo por el cual la mayoría de las diferentes características puede atribuirse a la presencia de componentes minoritarios y a la gran cantidad de posibles combinaciones de estas unidades de construcción (Bockisch, 1998).

Las grasas son ésteres de ácidos grasos con el glicerol. Debido a la estructura simétrica de la molécula de glicerol, existen dos posiciones idénticas exteriores (1-, 3-) y una posición central (2-), en las cuales se esterifican los ácidos grasos. El tipo de ácido graso, así como su distribución en estas posiciones, determina las características del triacilglicerol. Así, no sólo es de gran importancia la composición ácida sino también la estructura de los triacilgliceroles, la cual da origen a la respectiva composición triacilglicerídica (Bockisch, 1998).

En los últimos años, los avances en el conocimiento de la genética vegetal, así como el desarrollo de la ingeniería genética han ampliado la posibilidad de modificar la composición de los ácidos grasos de los aceites de manera más rápida, precisa que las técnicas de mejoramiento tradicionales. Así, se han obtenido aceites más estables, con un mayor contenido de ácidos grasos monoinsaturados y una menor proporción de ácidos grasos poliinsaturados, mientras que otros proyectos se han enfocado en la obtención de cultivos oleaginosos con un mayor contenido de ácidos grasos de la serie de los ω -6 y ω -3 (Bockisch, 1998).

Las composiciones de ácidos grasos de los principales aceites vegetales se presentan en la **Tabla 1.9**. Así, el espectro de ácidos grasos de dichos aceites está constituido por alrededor de 10-12 compuestos, los cuales representan más del 98 % de todos los ácidos grasos presentes en los alimentos.

Tabla 1. 9. Composición ácida de los principales aceites vegetales (Bockisch, 1998)

Aceite vegetal	Cantidades relativas de ácidos grasos (%)				
	Saturados	Oleico	Linoleico	α -linolénico	Otros
Girasol	12,3	18,6	68,2	0,5	0,4
Girasol alto oleico	8	87	5	0	0
Oliva	17,4	71,1	10	0,6	0,9
Soja	15,2	23,4	53,2	7,8	0,4
Maíz	14,5	27,5	57	0,9	0,1
Canola	6	64,1	18,7	9,2	2
Lino	9,4	19,9	15,9	52,7	2

Las diferentes características físicas y químicas de las grasas y aceites pueden ser atribuidas parcialmente a las características propias de los ácidos grasos. Uno de los principales parámetros que influyen dichas características es el grado de insaturación de los ácidos grasos y la distribución de los 10-12 principales ácidos grasos en las tres diferentes posiciones de la molécula del glicerol. Por tal motivo, distintas investigaciones orientan sus esfuerzos para lograr la separación de ciertos triacilgliceroles o bien cambiar su distribución en la molécula de glicerol (Bockisch, 1998).

2.3. Ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)

Actualmente, si bien se conocen más de 200 ácidos grasos, son pocos los que participan con un porcentaje > 3% en la conformación de los triacilgliceroles de los aceites y grasas comestibles. El resto, generalmente se presenta a nivel de trazas o en mayores cantidades en ciertas especies.

Todos los ácidos grasos que predominan en las grasas y aceites presentes en alimentos pertenecen a las familias de los ácidos grasos derivados de los alcanos y alquenos. Su estructura y nomenclatura siguen las reglas comunes de la Química Orgánica (Bockisch, 1998).

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) poseen dos o más pares de átomos de carbono con dobles enlaces. El término omega-3 (también denotado como ω -3 o n-3) es un descriptor estructural, para una familia de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), el cual indica la posición del doble enlace sobre el carbono-3, contando al carbono del grupo metilo terminal como el carbono-1 de la cadena carbonada del ácido graso (Jacobsen y col., 2013) (**Figura 1.5**).

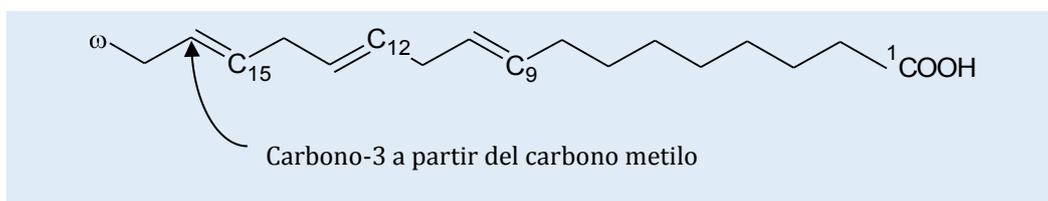


Figura 1.5. Estructura genérica de los ácidos grasos omega-3 (ácido α -linolénico)

En común con todos los ácidos grasos, los ácidos de la familia ω -3 tienen nombres sistemáticos y comunes (**Tabla 1.10**). Sin embargo, también pueden mencionarse a través de una nomenclatura abreviada que indica el número de átomos de carbono en la cadena, el número y posición del primer doble enlace respecto al grupo metilo carbono (**Tabla 1.10**). Por lo tanto, el ácido α -linolénico (18:3 ω -3) es el ácido ω -3 más simple (Jacobsen y col., 2013).

Los ácidos grasos poliinsaturados pueden ser mejor descritos en términos de familias debido a que su metabolismo permite la interconversión dentro pero no entre familias de PUFAs. El ácido α -linolénico se sintetiza a partir del ácido linoleico (18:2 ω -6) mediante la desaturación catalizada por la enzima desaturasa Δ^{15} (las desaturasas son nombradas de acuerdo al primer carbono que lleva el

doble enlace recién insertado y contando al carbono carboxilo como el carbono-1). Así como otros animales, los seres humanos no poseen la enzima Δ^{15} desaturasa y por lo tanto no pueden sintetizar el ácido α -linolénico *de novo*. Es por esta razón que el ácido α -linolénico es considerado un ácido graso esencial.

Tabla 1.10. Familia de ácidos grasos poliinsaturados ω -3 (PUFAs) (Jacobsen y col., 2013)

Nombre sistemático	Nombre común	Nomenclatura abreviada
<i>cis</i> -9,12,15-ácido octadecatrienoico	Ácido α -linolenico (ALA)	18:3 ω -3
<i>cis</i> -6,9,12,15-ácido octadecatetraenoico	Ácido estearidónico (SDA)	18:4 ω -3
<i>cis</i> -8,11,14,17- eicosatetraenoico	Ácido eicosatetraenoico (ETA)	20:4 ω -3
<i>cis</i> -5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	Ácido eicosapentaenoico (EPA)	20:5 ω -3
<i>cis</i> -7,10,13,16,19- docosapentaenoico	Ácido docosapentaenoico (DPA)	22:5 ω -3
<i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	Ácido docosahexaenoico (DHA)	22:6 ω -3

Otro ácido graso esencial es el ácido linoleico (18:2 ω -6). La esencialidad de los ω -6 se conoce desde los años 1920s. Los signos de deficiencia de ω -6 incluyen la disminución en el crecimiento, el incremento en la pérdida de agua epidérmica, el deterioro en la cicatrización de las heridas, alteraciones en la reproducción (Mead y col., 1986; Chapkin, 1992). El ácido linoleico es el ácido graso ω -6 más común de nuestra dieta, el cual es el primero en ser desaturado a 18:3 ω -6. Se estima que la velocidad de esta primera desaturación se encuentra limitada en los bebés prematuros, ancianos y bajo ciertos estados de enfermedad. Por este motivo, ha habido un gran interés por los escasos aceites que contienen 18:3 ω -6, ácido γ -linolénico (GLA). Algunas fuentes ricas en este ácido graso incluyen la grosella negra (*Ribes nigrum* L.), la onagra o prímula (*Oenothera biennis* L.) y la borraja (*Borago officinalis* L.). GLA es elongado a 20:3 ω -6, ácido dihomo- γ -linolénico (DHGLA), el cual es una molécula precursora de las prostaglandinas serie 1. DHGLA es posteriormente desaturado a 20:4 ω -6, precursor de las prostaglandinas serie 2. Luego pueden ocurrir la elongación y desaturación a 22:4 ω -6 y 22:5 ω -6, aunque la función de estos ácidos grasos aún no se conoce con exactitud.

Debido a que las plantas poseen enzimas desaturasas Δ^{12} y Δ^{15} pueden sintetizar *de novo* e interconvertir las familias de ácidos ω -3 y ω -6. Por otra parte, si bien los animales son incapaces de sintetizar los ácidos ω -3 y ω -6 *de novo*,

pueden metabolizarlos mediante elongaciones y desaturaciones que ocurren principalmente a nivel hepático. La elongación y desaturación de los ácidos grasos insaturados 18:2 ω -6 a 18:3 ω -3 y la conversión del 18:3 ω -3 a 20:5 ω -3 al 22:6 ω -3 se muestran en la **Figura 1.6** (Jacobsen y col., 2013).

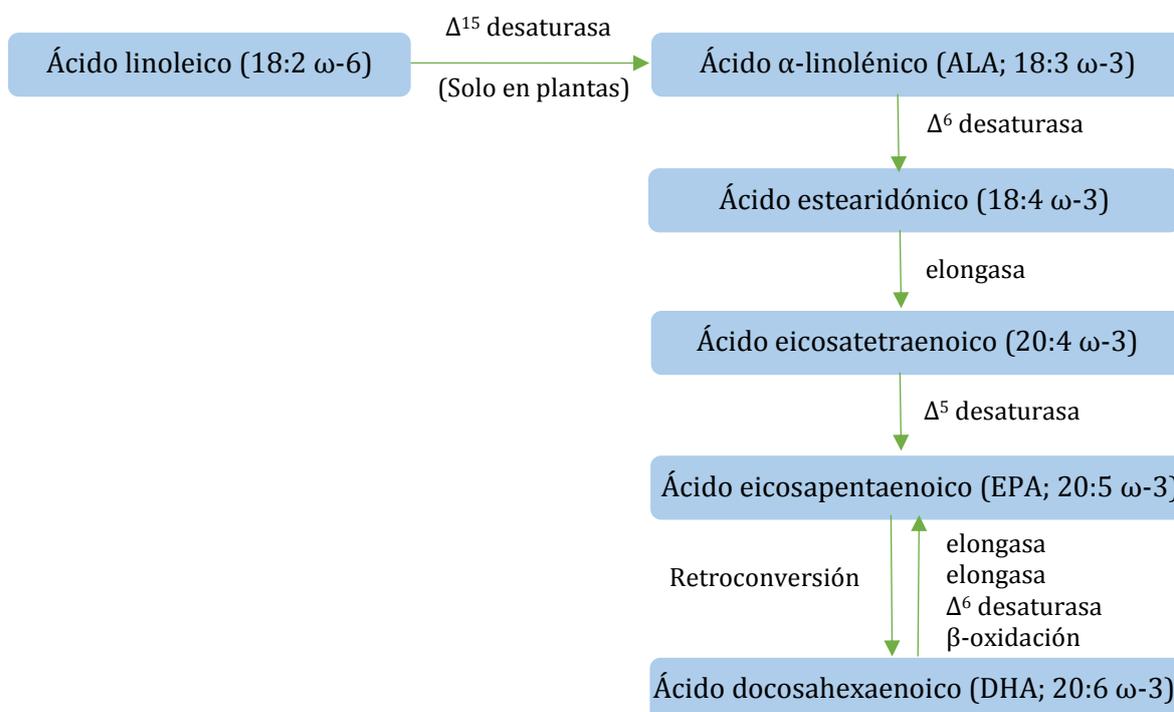


Figura 1.6. Conversión del ácido linoleico a ácido α -linolénico y del ácido α -linolénico a ácidos grasos omega-3 más insaturados y de cadena más larga (Jacobsen y col., 2013).

A través de esta vía, el ácido α -linolénico se convierte en ácido estearidónico (18:4 ω -3) por acción de la desaturasa Δ^6 y luego el ácido estearidónico se elonga a ácido eicosatetraenoico (20:4 ω -3), el cual es posteriormente desaturado por la desaturasa Δ^5 para producir EPA (20:5 ω -3) (**Figura 1.6**). Es importante señalar que esta vía de conversión del ácido α -linolénico a EPA está en competencia directa con la conversión del ácido linoleico en ácido araquidónico (20:4 ω -6) ya que ambas utilizan las mismas enzimas. La reacción de la desaturasa Δ^6 constituye el paso limitante de la velocidad en esta vía y, debido a que el ácido linoleico es mucho más frecuente en la mayoría de las dietas humanas que el ácido α -linolénico, el metabolismo de los ácidos grasos ω -6 es cuantitativamente mayor. Adicionalmente, existe una vía bastante compleja

para la conversión de EPA (20:5) ω -3 en DHA (22:6 ω -3) la cual involucra una doble elongación, desaturación y β -oxidación (**Figura 1.6**). Los ácidos EPA y DPA también pueden ser sintetizados a partir de DHA por retro-conversión debido a β -oxidación peroxisomal limitada (Jacobsen y col., 2013) (**Figura 1.6**).

Los PUFAs constituyen un sustrato fácilmente oxidable, presentando una mayor susceptibilidad al deterioro oxidativo a medida que aumenta el número de dobles enlaces. Ahora bien, teniendo en cuenta la importancia de los PUFAs en el aceite de chía, en la **Tabla 1.11** se presentan las principales propiedades físicas y químicas de los mismos.

Tabla 1.11. Propiedades físicas y químicas de los principales ácidos grasos poliinsaturados ($C_nH_{2n-2}O_2$) (Bockisch, 1998)

n	Nombre común	Denominación química	Desde CH ₃	ω	Peso molecular	Punto de fusión (°C)	Densidad (g/mL a °C)	Índice de refracción (unidad/°C)	Índice de iodo	Número ácido
12	Linoleico	9,12-octadecadienoico (LA)	n-6	6	280,44	-5,2	0,9020/20	1,4699/20	181	200
18	α -linolénico	9, 12, 15-octadecatrienoico (ALA)	n-3	3	278,42	-1,1	0,9046/20	1,4780/20	274	202
18	γ -linolénico	6, 9, 12-octadecatrienoico (GLA)	n-6	6	278,42	-6	-	-	274	202
18	Elaeostearico	9c,11t,13t-octadecatrienoico	n-5	5	278,42	-49	0,9028/50	1,5112/50	274	202
20	Araquidónico	5,8,11,14-eicosatetraenoico (AA)	n-6	6	304,46	-49,5	0,9219/20	1,4824/20	304	184
20	Timnodonoico	5,8,11,14, 17-eicosapentaenoico (EPA)	n-3	3	302,45	-	-	1,4977/23	-	186
22	Clupadonoico	4,8,12,15,19-docosapentaenoico (DPA)	n-3	3	330,50	<-78	0,9290/20	1,5014/20	464	170
22	Cervónico	4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico (DHA)	n-3	3	328,49	<<-75	-	1,5017/20	-	172

2.4. Aceites especiales “gourmet”

Los aceites “gourmet” son caracterizados por su aroma y sabor, principalmente resultantes del hecho que estos aceites no son refinados. El aceite “gourmet” más popular es el aceite de oliva. Otros aceites usados actualmente como aceites “gourmet” en restaurantes de distintas partes del mundo incluyen el aceite de palta y algunos obtenidos a partir de frutos secos (nuez, almendra, etc.). Sin embargo, muchos de ellos retienen su aroma y sabor debido a que son producidos en pequeña escala y no son sometidos a métodos convencionales de refinación, blanqueado y desodorización, habitualmente empleados para lograr la remoción de impurezas y prolongar la vida útil de los aceites vegetales “comodities” consumidos por los seres humanos (Moreau y Kamal-Eldin, 2009).

La distinción entre aceites especiales y “comodities” requiere una definición precisa de dichos términos. Una revisión reciente sobre los “aceites especiales menores” ha sugerido que aquel aceite con una producción anual inferior a 1 millón de toneladas por año podrían ser considerado un aceite “menor” (Gunstone, 2006).

Los aceites “gourmet” son alternativamente descriptos como aceites vírgenes o prensados en frío. Los aceites vírgenes son definidos como aquéllos obtenidos sin la participación de agentes químicos que puedan alterar la naturaleza del aceite, es decir, mediante prensado bajo calentamiento suave y sucesiva purificación mediante lavado con agua, asentamiento, filtración y centrifugación (FAO/WHO, 1993). Cabe señalar que la aplicación de calor excesivo puede conducir a la destrucción de vitaminas y clorofilas u otros pigmentos asociados a la designación de “virgen”. Los aceites prensados en frío, aceites vírgenes de grado máximo, son comercializados en el mercado a precios muy superiores a los de los aceites “comodities” y se consideran la mejor opción para la cocción y utilización como aderezo de ensaladas. Estos aceites son reconocidos por su elevada calidad y particularmente apreciados por su aroma, color, flujo viscoso y connotaciones benéficas para la salud. Los aceites vírgenes y prensados en frío se obtienen a partir de varias partes de las plantas que incluyen a las semillas, nueces y mesocarpios. Muchos de los aceites “gourmet” y “health-promoting” son producidos por prensado en frío, pero también son utilizadas otras tecnologías de extracción (**Tabla 1.12**) (Moreau y Kamal-Eldin, 2009).

Tabla 1.12. Procesos de extracción de aceites especiales y “comodities” (Moreau y Kamal-Eldin, 2009)

Proceso de extracción	Ventajas	Desventajas	Refinación, desodorización y blanqueo	Ejemplos
Prensado en frío o centrifugación	Retiene compuestos minoritarios (compuestos volátiles, fenólicos y clorofilas)	Bajo rendimiento de aceite	No	Aceite virgen de oliva, palta, cáñamo
Extracción mediante fluidos supercríticos (CO ₂)	Proceso no tóxico y más seguro que la extracción con hexano. No requiere eliminar solventes de la miscela o de la harina residual	Más caro. Los rendimientos pueden ser menores a los obtenidos con hexano	Opcional	Aceite de avena
Extracción con etanol	Solvente menos tóxico y más seguro que el hexano	Más difícil de remover los extractos no lipídicos de la miscela y la harina	Si	Aceite de grano de maíz
Prensado estándar	Tecnológicamente simple y económico para producción a gran escala industrial	Menor rendimiento que la extracción con hexano, las altas temperaturas pueden causar algunos cambios químicos en el aceite y la harina	Si	Aceites “comodities”
Extracción sólido-líquido con hexano	Bajo costo, altos rendimientos	Problemas para la salud y de seguridad	Si	Aceites “comodities”
Pre-prensado + extracción con hexano	Bueno para semillas con >20% aceite	Requiere más equipamiento	Si	Aceites “comodities”
Extracción acuosa enzimática	Técnica suave, ambientalmente limpia	Alto costo de las enzimas, rendimiento menor a la extracción con hexano	Opcional	En desarrollo

La composición de ácidos grasos de los aceites vegetales es generalmente la característica que recibe la mayor atención, aunque tal como se vio anteriormente, existe una serie de compuestos minoritarios que contribuyen significativamente a las propiedades nutricionales de los mismos. Los aceites vegetales constituyen una buena fuente de ácidos grasos esenciales (ácidos linoleico y α -linolénico) y otros ácidos grasos derivados de éstos. Es sabido que se requiere un adecuado balance de los ácidos grasos esenciales como precursores de las prostaglandinas y leucotrienos, con el objeto de proveer al organismo humano un estatus óptimo pro-inflamatorio y antiinflamatorio. Luego de la revolución agrícola, el consumo de ácido linoleico aumentó y consecuentemente los productos inflamatorios dinoprostona (o prostaglandina E2) y cierto número de leucotrienos. Por ello, se aconseja mejorar el balance de consumo de aceites ricos en ω -6 mediante la ingesta relativa de otros ácidos grasos incluyendo los ácidos oleico, α -linolénico, γ -linolénico, EPA y DHA (Simopoulos, 2004).

2.5. Procesamiento de aceites vegetales mediante procesos convencionales

La extracción de aceites vegetales a nivel industrial se lleva a cabo básicamente mediante dos métodos: prensado mecánico y extracción con sólido-líquido.

El prensado mecánico se realiza a través de las denominadas prensas continuas, las cuales comprimen la masa de la semilla a presión elevada, logrando de esta manera liberar el aceite contenido en su interior, el cual escurre a través del barril de la prensa. El material residual que sale de las prensas con un bajo contenido de aceite residual (6-7%) se denomina "torta o expeller", mientras que el aceite separado que contiene impurezas debe ser clarificado a través del uso de decantadoras y separadoras centrífugas antes de ser derivado a los tanques de almacenamiento (Autino, 2009b).

Por su parte, la extracción sólido-líquido se basa en la separación del aceite de la masa previamente preparada y acondicionada, utilizando un solvente orgánico (generalmente hexano) el cual se hace pasar a través del material en proceso en cantidad y temperatura adecuadas para asegurar una correcta extracción del aceite.

A fin de llevar a cabo de manera correcta el proceso de extracción, el material a extraer debe ser convenientemente preparado, mientras que el disolvente debe ser puro para evitar la incorporación de contaminantes y emplearse a la temperatura adecuada (Autino, 2009b). Todas las semillas oleaginosas tienen que ser preparadas para la extracción de acuerdo a los requerimientos asociados a cada clase de semilla y a la tecnología elegida. La preparación consiste en una serie de tratamientos mecánicos y físicos, aplicados a las semillas con el objetivo de optimizar la extracción, ya sea a través del prensado mecánico o utilizando en forma directa la extracción sólido-líquido.

En muchas semillas durante el proceso de preparación se realiza un acondicionamiento, cuya finalidad es la de calentar el grano para darle plasticidad o bien romper los tejidos que envuelven al glóbulo graso, con el propósito de optimizar el laminado o prensado de la semilla (Autino, 2009b). Todos los pasos realizados en la preparación tienen el fin de “liberar” el aceite del tejido que lo recubre y además, acondicionar el grano para lograr una óptima extracción del mismo.

El proceso de extracción de aceite de semillas oleaginosas consta de cuatro pasos básicos:

- limpieza de la semilla y pretratamiento
- extracción de aceite (prensado o extracción sólido-líquido)
- tratamiento de la miscela o del aceite extraído
- tratamiento de la harina de extracción

En la **Figura 1.7** se muestran las etapas del proceso de extracción de aceite de semilla mediante un diagrama de flujo (Bockisch, 1998).

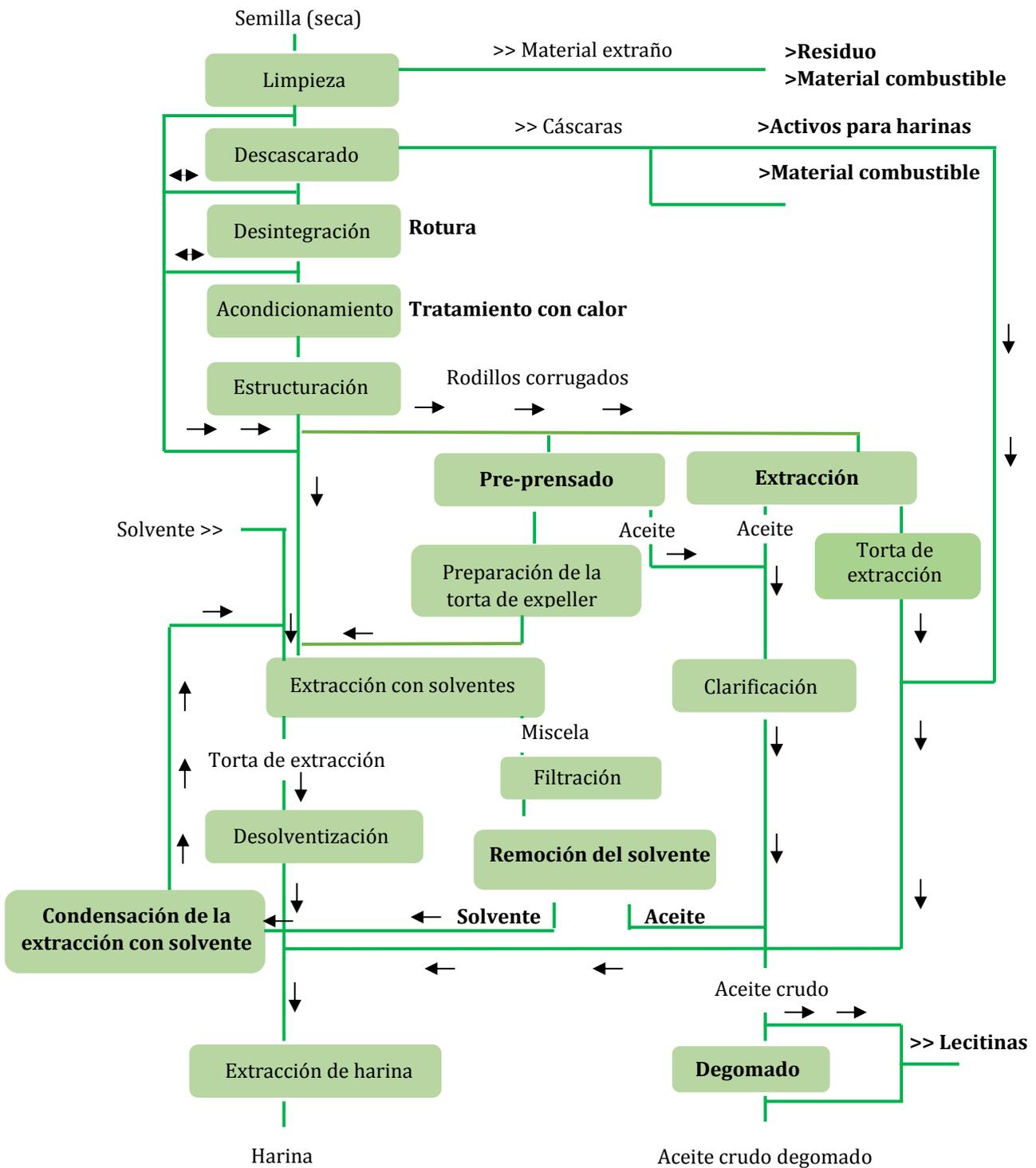


Figura 1.7. Diagrama de flujo de la extracción de aceite de semillas oleaginosas (Bockisch, 1998)

2.5.1. Etapas incluidas en el proceso de preparación de las semillas oleaginosas

El primer paso es la *limpieza*, cuya función es despojar a los granos de partículas indeseables que aún permanezcan en los mismos, entre los cuales se incluyen metales, hojas, pequeñas ramas y otros materiales extraños, utilizando zarandas, cernidores rotativos, separadores magnéticos y sistemas de aspiración. Luego, el pesaje de los granos nos permitirá conocer la cantidad que vamos a procesar.

El *triturado* es la reducción del tamaño a través del uso de los molinos quebradores o trituradores. Si bien la mayoría de las oleaginosas son descascaradas, la extracción sin descascarado es posible. Sin embargo, las cáscaras usualmente no contienen aceite y reducen la capacidad de la planta de extracción o bien pueden presentar componentes que disminuyen la calidad del aceite y/o el contenido de proteínas en la harina residual. La conveniencia económica del descascarado depende de la proporción de cáscara en el total de peso de las semillas (Bockisch, 1998).

El *acondicionamiento* del grano partido a través del uso del calor previo al laminado tiene como propósito otorgarle condiciones de plasticidad facilitando, a consecuencia de ello, su procesamiento (Autino, 2009b).

El *laminado* consiste en someter las partículas a la acción del molino laminador, con la finalidad de producir la rotura fibrilar y facilitar la liberación del aceite contenido en las células oleíferas, durante el proceso de extracción por solventes o bien por prensado (Autino, 2009b).

La *cocción* es utilizada en el caso de los granos con elevado contenido de aceite, cuyo propósito radica en disminuir el tenor de humedad del grano, incrementar su plasticidad por incremento de la fluidez del aceite, producir la ruptura de las células grasas complementarias, coagular las proteínas del grano, esterilizar los granos destruyendo bacterias y otros microorganismos, desactivar enzimas termosensibles, destruir sustancias tóxicas.

En algunas semillas (soja y algodón) se realiza el *expandido* cuya finalidad es mejorar el manejo y la extractabilidad del material, llevándose a cabo el posterior secado y enfriado.

2.5.2. Extracción de aceite por prensado

En la mayoría de los molinos aceiteros la extracción se realiza con prensas de tornillo, como paso previo a la extracción sólido-líquido o directamente como proceso en sí. Si bien hasta los años 1990s la extracción directa mediante prensado era raramente llevada a cabo debido a sus bajos rendimientos, actualmente, bajo consideraciones de protección ambiental, este proceso está cobrando nuevamente interés (Bockisch, 1998).

Las prensas abiertas son comúnmente utilizadas en la actualidad para la extracción de aceite de oliva; para las semillas oleaginosas, se usan casi exclusivamente las prensas de tornillo sinfín (Bockisch, 1998).

Una prensa consta de una jaula que posee un diámetro constante desde el comienzo al final, la cual aloja al tornillo sinfín cuyo eje aumenta en esta dirección, con el fin de mantener la presión como compensación de la reducción de volumen causada por la pérdida del aceite extraído. El diámetro de la salida de la torta y el diseño del tornillo determinan la presión dentro de la prensa. Se pueden alcanzar presiones de hasta 3000 bar provocando temperaturas de hasta 170°C dependiendo del tipo de prensa. En condiciones normales, para pre-prensado se alcanzan 30-40 bar en combinación con una temperatura de aproximadamente 95°C; para prensado directo el objetivo es alcanzar 400 bar en combinación con 115-125°C y por lo tanto, no puede ser denominado “prensado en frío”. El proceso de extracción por prensado es influenciado por varios parámetros tales como el contenido de humedad de la semilla, la capacidad de la prensa y la potencia aplicada. El aceite obtenido por prensado debe ser posteriormente purificado mediante el uso de separadores, filtros y decantadores (Bockisch, 1998).

Por otra parte, la torta o “expeller” debe ser desintegrada mediante trituradores para la posterior utilización de la harina ya sea en la extracción con solventes o para procesarla como tal.

Una alternativa al prensado convencional es el proceso de **prensado en frío**, en el cual la materia prima no se somete a calentamiento previo o durante la extracción, lo cual permite la retención de una mayor cantidad de compuestos fitoquímicos de interés como algunos antioxidantes naturales. La prensa utilizada comúnmente es la de tornillo helicoidal, aplicando una presión de molienda a las semillas. Otro tipo de prensa es la que aplica presión directamente sobre las

semillas ubicadas en un barril con orificios a los costados lo cual permite el escurrimiento del aceite (Parker y col., 2003).

2.5.3. Extracción de aceite sólido-líquido

La extracción sólido-líquido es el proceso de obtención del aceite crudo con un solvente a partir de semillas oleaginosas previamente tratadas mediante una adecuada preparación.

Diferentes tipos de transferencia se llevan a cabo en cada una de las secciones del proceso de extracción siendo la transferencia de masa, la más trascendente. La parte más importante de la extracción sólido-líquido es el extractor, ya que es allí donde se produce el desaceitado del material entrante previamente acondicionado. El otro equipamiento u operación inseparable de la extracción -en los métodos utilizados industrialmente- es la desolventización. En ambos casos, la transferencia de masa es fundamental, si bien no es la única.

2.5.3.1. Extracción

En la transferencia del aceite desde el sólido hasta el solvente/miscela se presentan distintos mecanismos: el material a extraer se pone en contacto con el solvente, el cual inunda los poros intra-partícula y disuelve el aceite formando la miscela, cuya composición queda establecida por el equilibrio logrado con el aceite contenido en el sólido. A través de esta miscela, el aceite difunde hacia el exterior de la partícula y posteriormente, es transportado hacia la salida del lecho por la corriente global. Cabe señalar que el lavado o arrastre del aceite desde su superficie es tan importante como la difusión del aceite dentro del sólido. El tipo de contacto es un factor de relevante importancia en la eficiencia de esta operación (Demarco, 2009).

Los extractores comerciales disponibles operan mediante dos métodos básicos de contacto para disolver el aceite en el solvente. El primero es el método de inmersión, donde el solvente es bombeado a través de la semilla preparada, de forma de asegurar que ésta quede totalmente sumergida en el mismo. El segundo es el método de percolación, en el cual el solvente se esparce desde la parte superior del lecho de semillas, a una velocidad determinada por la resistencia del lecho al flujo por gravedad del solvente. En general, siempre se encuentran los dos

métodos combinados si bien alguno de ellos prevalece (Demarco, 2009). La percolación asegura que el solvente saturado sea permanentemente reemplazado por solvente/miscela no saturado.

A diferencia del proceso de percolación, en el proceso de inmersión la semilla se encuentra completamente sumergida en el solvente. El principio implica que la miscela altamente concentrada sea reemplazada por solvente fresco si no hay desplazamiento forzado del disolvente. Así, el sistema estático necesita agitación para asegurar que el solvente concentrado sea reemplazado. Este hecho conduce al incremento en la formación de partículas de semillas muy pequeñas las que luego deben ser removidas de la miscela. Generalmente, el proceso de inmersión es más apropiado que el de percolación si el aceite tiene que ser extraído a partir de matrices dificultosas, como aquéllas con alto contenido de fibra o baja concentración de aceite (Bockisch, 1998).

En las células, hay una zona de aceite la cual es fácil de extraer ya que está cerca de la pared celular. Esta parte de la extracción ocurrirá en muy poco tiempo de contacto entre el solvente y el material a extraer. Sin embargo, hay otra parte del aceite que tendrá que recorrer una mayor distancia para alcanzar la pared celular y poder ser arrastrada por el solvente hasta la corriente de la miscela. En cada uno de los movimientos del aceite se encontrará con diferentes “obstáculos” (carbohidratos, paredes celulares, etc.) a los que le tomará tiempo poder superar. Es por ello que el tiempo de contacto durante esta operación de extracción es importante, independientemente del tipo de extractor utilizado (Demarco, 2009).

El tiempo de extracción influye sobre la velocidad de extracción debido a que los procesos de disolución y difusión requieren de un cierto tiempo operativo. El tiempo requerido depende de la clase de semilla, su pretratamiento y el equipo utilizado. Por otra parte, siempre existe un factor económico que limita el tiempo de extracción. En líneas generales, a mayor tiempo de extracción será mejor el desempeño de la planta en su conjunto (**Figura 1.8**).

La temperatura de extracción también es importante, ya que al aumentar la misma disminuye la viscosidad y se incrementa la solubilidad del extracto. Menores viscosidades y mayores solubilidades resultan en mayores velocidades de extracción. La temperatura no sólo afecta este último parámetro, sino también la

proporción entre los componentes lipídicos y no-lipídicos del aceite crudo (Bockisch, 1998; Demarco, 2009).

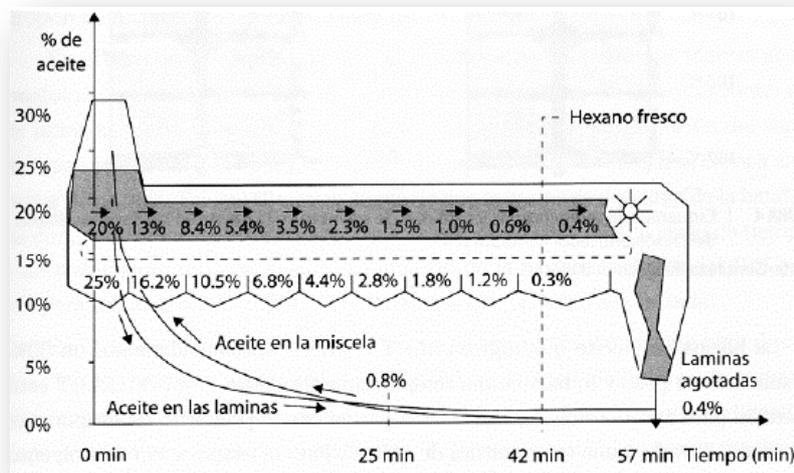


Figura 1.8. Curva de extracción típica (Demarco, 2009)

2.5.3.2. Desolventizado

El disolvente asociado a la fracción de aceite se puede eliminar a niveles residuales muy bajos utilizando una evaporación de efecto múltiple y tecnología de recuperación de capa fina con vapor bajo vacío. Por otra parte, el disolvente presente en la fracción harina es mucho más difícil de remover. Generalmente, se retira mediante un equipo desolventizador-tostador en contracorriente, normalmente denominado DT.

La miscela proveniente de la percolación tiene un contenido de solvente de 70-80%, mientras que en la procedente de la inmersión el contenido es mayor (87-93%). Por ende, puede observarse que las cantidades de disolvente a ser destilado son elevadas. Así, con el aumento en el contenido de aceite, la presión de vapor del sistema aumenta y también el punto de ebullición, lo cual se traduce en incrementos en la cantidad de energía (Bockisch, 1998).

La remoción del aceite debería ser realizada a bajas temperaturas a fin de proteger al mismo y propender al ahorro energético. La calidad del aceite también puede verse influenciada por un excesivo tiempo de contacto con los intercambiadores de calor. Así, es necesario encontrar una solución de

compromiso entre los parámetros tiempo de contacto y temperatura (Bockisch, 1998).

2.5.4. Extracción mediante fluidos supercríticos (EFSC)

Los productos extraídos con fluidos supercríticos son de calidad superior a los obtenidos por extracción sólido-líquido, fundamentalmente por la ausencia de residuos de solvente en los mismos, y por las condiciones de procesamiento (temperaturas moderadas). No obstante, el empleo de altas presiones requiere altos costos de inversión y de operación. En la actualidad, los procesos supercríticos presentan ventajas frente a los procesos de extracción tradicionales cuando se aplican en la obtención de productos de alto valor agregado (materiales térmicamente inestables como ácidos grasos poliinsaturados, aceites cítricos esenciales, etc.) o cuando se procesan grandes volúmenes de materiales, como en el caso del café y del té, entre otros (Espinosa, 2001).

Darr y Poliakoff (1999) definen a un fluido supercrítico como cualquier sustancia cuya temperatura y presión son más altas que sus valores críticos y su densidad aproximada o mayor que su densidad crítica. Por encima del punto crítico de una sustancia pura, no puede existir equilibrio líquido-vapor por ello, los fluidos supercríticos exhiben propiedades intermedias entre aquéllas correspondientes a gases y líquidos. Densidades similares a las de los líquidos y propiedades de transporte que se aproximan más a aquéllas de los gases, son algunas de las características que los hacen aptos para la extracción (Espinosa, 2001). Adicionalmente, en regiones donde un fluido supercrítico es altamente compresible, su densidad (y por lo tanto su poder solvente) puede ser ajustada sobre un amplio rango, con pequeñas variaciones de temperatura y/o presión. La habilidad de los fluidos supercríticos de modificar su poder solvente constituye una característica clave, la cual puede ser usada para controlar su comportamiento de fase, procesos de separación (extracción supercrítica, desolventización), velocidades y selectividades en reacciones químicas y morfologías en el procesado de materiales (ej. en la industria farmacéutica) (Espinosa, 2001).

Otras propiedades relacionadas con la utilización de fluidos supercríticos en procesos de extracción son:

- **Baja temperatura de extracción:** muchos de los fluidos comúnmente utilizados presentan temperaturas críticas inferiores a 100 °C y otros como el CO₂, el etano y etileno son aún menores de 50 °C (Espinosa, 2001).

- **Selectividad:** la posibilidad de ajustar el poder solvente de un fluido supercrítico modificando levemente la temperatura y presión, hace que los fluidos supercríticos tengan el potencial para disolver y extraer en forma preferencial clases seleccionadas de compuestos. (Espinosa, 2001).

- **Productos finales libres de solventes:** después que un fluido supercrítico ha extraído los componentes deseados de una mezcla, el mismo puede separarse totalmente del producto con sólo disminuir la temperatura y/o presión de operación, lo que permite su reutilización en unidades de procesos continuos y semicontinuos (Espinosa, 2001).

Los tres fluidos más populares en la tecnología de fluidos supercríticos son: dióxido de carbono, agua y propano. El dióxido de carbono no es tóxico, ni inflamable, es ambientalmente benigno, ampliamente disponible con alto nivel de pureza y bajo costo, presentando una temperatura crítica de 31 °C. Por excelencia, el fluido supercrítico es adoptado para el procesamiento de productos naturales con aplicaciones en la industria de alimentos, nutracéutica, farmacéutica y cosmética.

Una de las aplicaciones de los fluidos supercríticos al procesamiento de productos naturales es la extracción, refinación y fraccionamiento de aceites comestibles, grasas y ceras. La extracción se refiere a la separación de algunos solutos presentes en materiales naturales sólidos, tales como semillas o frutos.

2.6. Oxidación lipídica

2.6.1. Autooxidación 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).

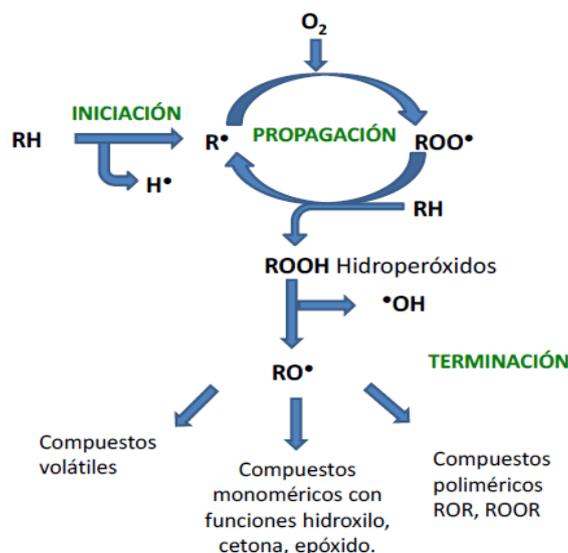


Figura 1.9. Esquema general del proceso de autooxidación lipídica (Márquez-Ruiz, 2008)

La autooxidación de lípidos se produce a través de un mecanismo de radicales libres, el cual puede describirse mediante una serie de etapas que se detallan a continuación (Nawar, 1996; Frankel, 2005) (**Figura 1.9**).

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 estar catalizada. En presencia de factores de iniciación o iniciadores (I), los lípidos insaturados (LH) pierden un radical hidrógeno (H^*) de la posición α con respecto a los dobles enlaces del ácido graso para formar un radical libre lipídico (L^*) según la reacción:



Los iniciadores pueden producir radicales por disociación térmica de hidroperóxidos presentes 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 en 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

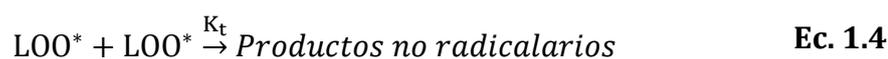
El radical libre lipídico (L^*) reacciona muy rápidamente con el oxígeno molecular para formar radicales peroxilos (LOO^*) (**Ec. 1.2**). Esta reacción es mucho más rápida que la siguiente, en la cual se transfiere un hidrógeno de otra molécula lipídica LH para dar un hidroperóxido LOOH y otro radical L^* (**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 peroxilos. Debido a la estabilización por resonancia de las especies L^* , pueden formarse hidroperóxidos isoméricos. Los hidroperóxidos son los productos primarios fundamentales de la oxidación lipídica. Son relativamente inestables y por ello 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 estadios se registra la relación inversa (Frankel, 2005).

Terminación

En las últimas etapas de la oxidación lipídica, luego de alcanzar un máximo, la velocidad disminuye, los radicales peroxilos reaccionan unos con otros formando productos no radicalarios (**Ec. 1.4**).



Los hidroperóxidos pueden sufrir reacciones tales como la homólisis catalizada por metales o calor, generando radicales peroxilos y alcoxilos 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 peroxilos (LOO^*), alcoxilos (LO^*) o alquilos (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 complejas rutas de reacción 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).

2.6.2. 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 con la presencia de otros componentes, tienen efecto sobre el proceso de oxidación lipídica. A continuación, se enumeran y describen los principales factores involucrados.

Composición de los ácidos grasos

El número, posición y geometría de los dobles enlaces afecta la velocidad de oxidación. Las menores energías de disociación para 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 peroxilos, 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.

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).

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).

Área superficial

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

Humedad

En alimentos con muy baja actividad acuosa ($a_w < 0,1$) la oxidación ocurre a alta velocidad. 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).

Agentes prooxidantes

La presencia de trazas de metales de transición, 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).

Energía radiante

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

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 a distintos niveles de la secuencia de reacciones del proceso de oxidación lipídica: 1) disminuyendo la concentración de oxígeno, 2) interceptando al oxígeno singulete, 3) atrapando (“scavenging”) radicales libres tales como los radicales hidroxilo (OH•), 4) uniéndose a metales que actúan como agentes prooxidantes, 5) favoreciendo la descomposición de productos primarios a compuestos no radicalarios y 6) por interrupción de la cadena de iniciación o propagación transfiriendo átomos de hidrógeno a los radicales lipídicos (L•) y peroxilos (LOO•) (Shahidi, 1997; Frankel, 2005).

2.7. Sistemas de provisión “*delivery systems*”

A partir de los documentados beneficios para la salud que produce la ingesta de ácidos grasos ω -3, se han realizado grandes esfuerzos en la promoción de un consumo adecuado de los mismos, más aún en el caso de las dietas occidentales, que se caracterizan por una dieta alta en ácidos grasos ω -6 y baja en ω -3 (Simopoulos, 2002).

Para paliar estas dificultades, en los últimos años el desarrollo y empleo de sistemas de provisión o vehiculización “*delivery systems*” de compuestos esenciales y sensibles (entre ellos los ácidos grasos ω -3) han recibido una gran atención (Perry y Metzger, 1980; Jansen y col., 1991). La idea conceptual vinculada a la implementación de estos sistemas está orientada a lograr el enriquecimiento de alimentos en dichos compuestos, con la respectiva y eficiente protección que pueden brindar estos sistemas si están apropiadamente diseñados (Gaybor Tobar y Casas Velasquez, 2008; Ribotta y col., 2009).

En este sentido, la emulsificación puede constituir una alternativa tecnológica válida para tal fin. Las emulsiones O/W presentan una serie de ventajas potenciales como sistemas de provisión de componentes bioactivos. En principio, estos sistemas están constituidos por tres regiones diferentes: la fase oleosa, fase acuosa y la capa interfacial. Por lo tanto, es posible incorporar agentes bioactivos polares, no polares y anfífilos dentro del mismo sistema de provisión (McClements, 2005a). Además, la estructura de las emulsiones posibilita el desarrollo de nuevas estrategias a fin de incidir en la estabilidad química de los componentes bioactivos, por ejemplo, mediante la ingeniería de la interfase y/o el estudio de la localización física de los diferentes compuestos (Coupland y McClements, 1996; McClements y Decker, 2000). Asimismo, es posible preparar emulsiones con diferentes propiedades reológicas de manera conveniente para cada aplicación específica (Genovese y col., 2007). A su vez, las emulsiones pueden utilizarse directamente o bien ser sometidas a un proceso de secado para obtener polvos, lo que facilita su transporte y utilización en ciertas aplicaciones (Soottitawat y col., 2003; Desai y Park, 2005; Klinkesorn y col., 2005c; Vega y Roos, 2006). Finalmente, la obtención de estos sistemas puede lograrse a partir de ingredientes de grado alimentario (agua, aceite, fosfolípidos, proteínas y polisacáridos) empleando operaciones de procesamiento de baja complejidad (mezclado y homogeneización).

Ahora bien, las emulsiones convencionales son usualmente el sistema considerado para lograr la vehiculización de lípidos bioactivos debido a su relativa facilidad de preparación y bajo costo. No obstante, éstas pueden ser a menudo propensas a sufrir procesos de desestabilización física al ser expuestas a calentamiento, refrigeración, congelación, secado, pH extremos y altas concentraciones de minerales. Además, pueden exhibir un control limitado sobre la capacidad de proteger y alcanzar la liberación controlada de los diversos componentes funcionales. A su vez, existe un número limitado de agentes emulsificantes que puede ser usado para formar las capas interfaciales que rodean las gotas de aceite, lo cual condiciona la capacidad de obtener “*delivery systems*” con una amplia gama de características de protección y liberación. En consecuencia, existe un gran interés tanto en la identificación de nuevos agentes emulsificantes como en el desarrollo de enfoques que permitan su utilización más

eficaz facilitando la formación de la emulsión y por ende, mejorando su estabilidad (Benichou y col., 2002; Drusch y Schwarz, 2006; Drusch, 2007). En este sentido, el desarrollo de emulsiones multicapa “multilayer” mediante la técnica de deposición electrostática capa por capa (“*layer-by-layer*” LBL) representa una novedosa tecnología de ingeniería interfacial que posibilita el recubrimiento de las gotas de aceite mediante múltiples capas de emulsificante (Klinkesorn y col., 2005). Así, las emulsiones originadas consisten en gotas de aceite rodeadas por membranas interfaciales multicapa las cuales comprenden a su vez, una capa interior emulsionada y una o más capas exteriores constituidas por biopolímeros (ej. quitosano). Esta metodología basada en la deposición electrostática de biopolímeros con una cierta carga eléctrica de signo opuesto sobre la superficie de gotas de aceite, puede ser implementada eficientemente mediante un adecuado control de las características interfaciales (carga, espesor, composición) y ser aplicada en la industria de alimentos como una alternativa tecnológica innovadora para mejorar la estabilidad y vida útil de este tipo de productos (Jamboonsri y col., 2012).

Paralelamente, el proceso de microencapsulación a través de diversas tecnologías ha contribuido a la producción de alimentos enriquecidos de alta calidad, protegiendo a los ácidos grasos poliinsaturados de la oxidación lipídica (Schrooyen y col., 2001). De este modo han surgido varias líneas de alimentos funcionales y nutraceúticos, muchos de los cuales se encuentran actualmente al alcance de los consumidores a nivel mundial.

3. Emulsiones alimentarias

3.1. Importancia de las emulsiones en el área alimentaria

En los últimos años, la industria alimentaria debió adecuarse a los cambios en las preferencias y requerimientos de los consumidores mediante la elaboración de nuevos productos, así como a través del mejoramiento de los ya existentes, con propiedades organolépticas y textura adecuadas, saludables y de costo relativamente bajo. Estos hechos han implicado cambios no sólo en el desarrollo de los productos en sí mismos sino también en la tecnología de los procesos de elaboración. Así la cantidad de alimentos emulsionados se ha diversificado

notablemente (Palazolo, 2006). En el mercado existen emulsiones alimentarias tradicionales de contenido lipídico reducido o “light” (crema de leche, mayonesa, manteca, cremas heladas) con adición de componentes benéficos para la salud, bebidas (“soft drinks”), sustitutos de leche o crema de leche (“coffee whiteners”), leche de soja y derivados, aderezos, salsas y alimentos especiales para determinados segmentos de la población (niños, ancianos) (Palazolo, 2006; Márquez, 2009). En este contexto, es fundamental la obtención de aditivos acordes a las necesidades del mercado actual, llevando a cabo su caracterización en cuanto al conocimiento de los factores que determinan las propiedades fisicoquímicas y organolépticas de los productos emulsionados.

3.2. Definiciones

Una *emulsión* consiste en dos líquidos al menos parcialmente inmiscibles, con uno de ellos disperso como pequeñas gotas esféricas en el otro (McClements y Weiss, 2005). El material contenido dentro de la gota se denomina *fase dispersa, discontinua o interna*, mientras que la sustancia que compone el líquido circundante normalmente se denomina *fase continua o externa* (McClements y Weiss, 2005).

Si bien una emulsión puede formarse a partir de dos líquidos inmiscibles, el contacto entre el aceite y las moléculas de agua es termodinámicamente desfavorable debido al efecto hidrofóbico (Israelachvili, 1992). Como resultado, las emulsiones se consideran sistemas *termodinámicamente inestables*. Sin embargo, es posible formar emulsiones que son cinéticamente estables (metaestable) por un periodo de tiempo razonable (días, semanas, meses o años), mediante la inclusión de un *agente emulsificante* antes de su formación. Los agentes emulsificantes son moléculas tensioactivas que se adsorben en la superficie de las gotas formando una membrana protectora que evita la agregación de las mismas.

La *concentración de gotas* en una emulsión se describe en términos de una fracción volumétrica de fase dispersa (φ) o de una fracción másica de fase dispersa (φ_m) (McClements, 1999). Si V_d y m_d son el volumen y la masa de la fase dispersa y V_e y m_e , el volumen y la masa de la emulsión, entonces φ y φ_m se definen como (**Ecs. 1.8 y 1.9**):

$$\varphi = V_d/V_e \quad (\text{Ec. 1.8})$$

$$\varphi_m = m_d/m_e \quad (\text{Ec. 1.9})$$

Ambos parámetros pueden relacionarse conociendo las densidades de las fases dispersa (δ_d) y continua (δ_c) (Ec. 1.10):

$$\varphi_m = [(\varphi\delta_d / \varphi\delta_d + (1-\varphi) \delta_c)] \quad (\text{Ec. 1.10})$$

Los valores de φ y φ_m coinciden sólo cuando las densidades de las dos fases que constituyen el sistema son iguales (McClements, 1999).

Estos sistemas pueden clasificarse convenientemente de acuerdo a la distribución de las fases acuosa y oleosa. Así, una emulsión que consiste en gotas de aceite dispersas en una fase acuosa se denomina aceite-en-agua (“oil-in-water”, O/W) y una emulsión que consiste en gotas de agua dispersas en una fase oleosa se denomina agua-en-aceite (“water-in-oil”, W/O) (Figura 1.10). Al primer grupo corresponden, por ejemplo, la leche, la crema, la mayonesa, las sopas y las salsas, mientras que la margarina y la manteca son típicos representantes de las emulsiones W/O.

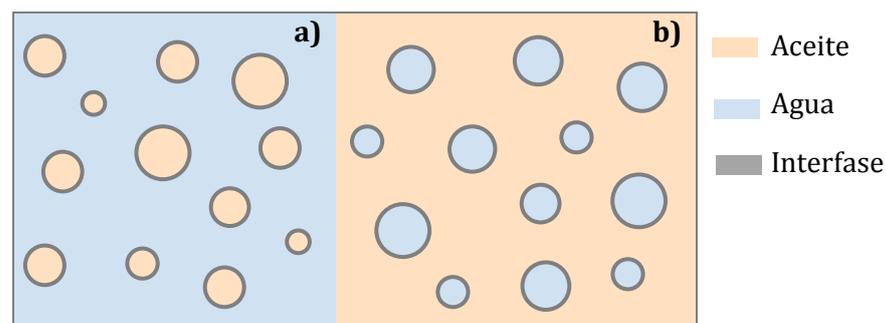


Figura 1.10. Representación esquemática de diferentes tipos de emulsiones **a)** emulsión aceite en agua (O/W); **b)** emulsión agua en aceite (W/O). El aceite y el agua están en ambos casos separados por una interfase de agente emulsificante

3.3. Formación de emulsiones

El proceso por el cual dos líquidos inmiscibles se convierten en una emulsión o la reducción del tamaño de gota en una emulsión preexistente se

denomina *homogeneización*. La formación de gotas en una emulsión es un proceso que requiere energía, la cual es suministrada por dispositivos mecánicos conocidos como *homogeneizadores*, los cuales someten a los líquidos a una intensa agitación mecánica que resultan en la disrupción de las gotas (Mootoosingh y Rousseau, 2006). 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. De esta manera, el área interfacial aumenta considerablemente, provocando que la energía libre superficial del sistema se incremente. Por ello, las gotas de un líquido en otro que es inmiscible tienden a adoptar una forma esférica para minimizar la energía libre interfacial (Palazolo, 2006).

Durante la preparación de una emulsión se pueden distinguir tres procesos críticos: formación y ruptura de las gotas, adsorción del agente emulsificante en la interfase y coalescencia de las gotas (McClements, 1999). El agente emulsificante necesario para la formación de la emulsión debe adsorberse en la interfase, disminuyendo la tensión interfacial. Además, es sumamente importante que el mismo recubra la interfase creada en una escala de tiempo similar a la del proceso de homogeneización. En el caso que la adsorción sea muy lenta en comparación con la capacidad del homogeneizador de generar área interfacial, se produce el proceso de coalescencia de las gotas recién formadas. Este hecho hace que el proceso de formación de la emulsión no sea eficiente (Ford y col., 1997).

El proceso de homogeneización puede separarse en dos categorías dependiendo de la naturaleza del material de partida. La formación de una emulsión a partir de dos líquidos separados se denomina *homogeneización primaria*, mientras que la reducción del tamaño de gota en una emulsión ya existente es llamada *homogeneización secundaria* (**Figura 1.11**). La preparación de un tipo particular de emulsión alimentaria puede involucrar una homogeneización primaria, secundaria o una combinación de ambas (McClements, 1999).

En la elaboración de alimentos a grandes escalas, usualmente es más eficiente la preparación de emulsiones en dos etapas. Primero, el aceite y la fase acuosa son convertidos en una pre-emulsión que contiene tamaños de gota considerables usando un tipo de homogeneizador (ej. Ultraturrax). Luego, el

tamaño de las gotas de la pre-emulsión es reducido es una etapa posterior de homogeneización usando otro tipo de homogeneizador (ej. homogeneizador de alta presión).

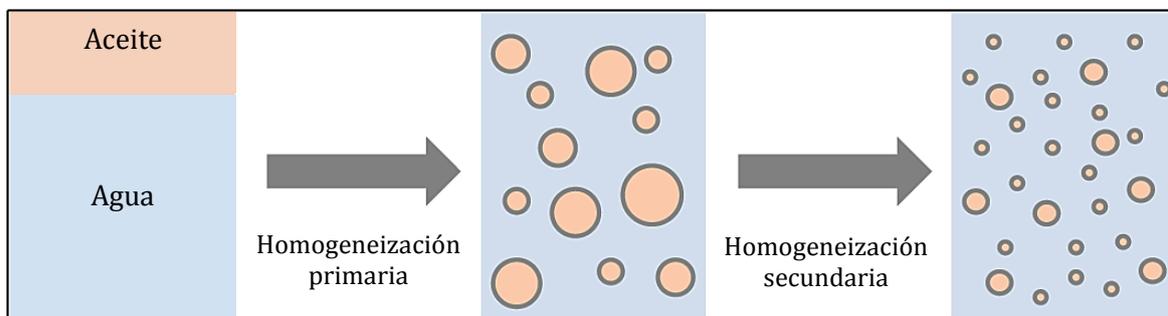


Figura 1.11. Representación esquemática del proceso de homogeneización para una emulsión aceite en agua (O/W). La homogeneización primaria implica la conversión de dos fases separadas en una emulsión, mientras que en la homogeneización secundaria se produce una reducción del tamaño de gota de la emulsión preexistente

3.4. Dispositivos de homogeneización

En el mercado existen diversos tipos de homogeneizadores. 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). La **Tabla 1.13** muestra los principales tipos de homogeneizadores utilizados a escala industrial y de laboratorio.

Tabla 1.13. Principales dispositivos de homogeneización y sus características (McClements, 2016)

Tipo de homogeneizador	Densidad de energía (ϵ) ¹	Modo de operación ²	Mecanismo de ruptura ³	Tamaño de gota (μm) ⁴	Viscosidad de la muestra ⁵
Alta velocidad (sistema cuchilla y rotor/estator)	B	D	L, T	2	B – M
Molino coloidal	M	C	L, T	1	M – A
Válvula de alta presión	A	C	T, C, L	0,1	B – M
Ultrasónico	B	D, C	C	0,1	B – M
Membrana	A	D, C	I	0,3	B – M
Micro-Fluidización	A	C	T	<0,1	B – M

¹A = alta; M= mediana; B = baja; ² C = continuo; D = discontinuo o "batch"; ³ L= flujo laminar; T= flujo turbulento; C= cavitación; I= Inyección; ⁴ tamaño de gota promedio; ⁵ B= baja; M= mediana; A=alta

La intensidad de agitación mecánica se atribuye a la densidad de energía en el líquido (ϵ), la cual es la cantidad de energía mecánica disipada por unidad de volumen y por unidad de tiempo (o la potencia por unidad de volumen). La cantidad total de energía mecánica suministrada debe ser extremadamente grande, debido a la oposición de la presión de Laplace (Walstra, 1983; Ford y col., 1997). La mayoría de la energía suministrada actúa en un tiempo muy corto y localmente, disipándose como calor. Por tal motivo, la temperatura del sistema debe controlarse, especialmente en los dispositivos de alta densidad de energía.

Los sistemas más utilizados en la obtención de emulsiones alimentarias son el rotor-estator, los sistemas de alta presión, ultrasónicos y de membrana (Schultz y col., 2004; McClements, 2005; Urban y col., 2006; Jafari y col., 2008b).

Los *homogeneizadores de alta velocidad* son sistemas utilizados para la homogeneización directa de las fases oleosa y acuosa (Urban y col., 2006; Hall y col., 2011; Singh y Heldman, 2013). La rápida rotación del cabezal mezclador genera una combinación de los gradientes de velocidad longitudinal, rotacional y radial en los fluidos, lo que hace que los líquidos se entremezclen y rompan las mayores gotas en otras más pequeñas (**Figura 1.12**). Por lo general, estos mezcladores producen tamaños de gotas entre $\sim 2\text{-}10\ \mu\text{m}$.

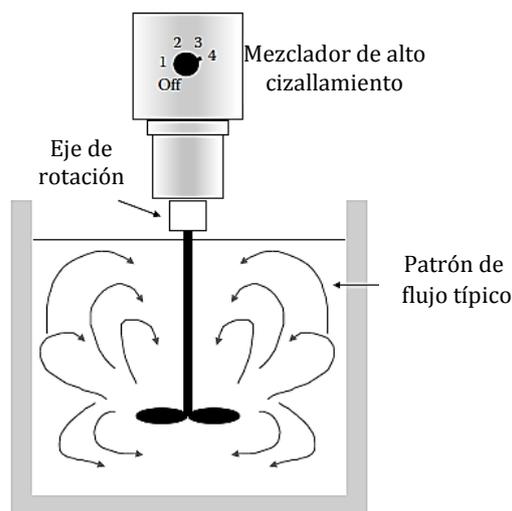


Figura 1.12 Homogeneizador de alta velocidad (sistema cuchilla y rotor/estator) (McClements, 2016)

Los *molinos coloidales* están basados en la formación de un flujo laminar de alta tensión de cizalladura entre los discos del rotor y estator, lo que permite la

reducción del tamaño de las gotas de emulsiones preexistentes (homogeneización secundaria) o de media y alta viscosidad (Walstra, 1983; Schubert, 1997; Urban y col., 2006). El tamaño de las gotas de aceite obtenidas con estos mezcladores varía entre 1-5 μm .

Los *homogeneizadores a válvulas de alta presión* son más eficaces en la reducción del tamaño de la gota en una emulsión preexistente, que en la formación de una emulsión a partir de dos líquidos separados. Una emulsión pre-existente es forzada desde una cámara de presión a pasar a través de una válvula por una bomba de alta presión. Una combinación de intensas fuerzas disruptivas de cizalla, cavitación y condiciones de flujo turbulento descomponen las gotas grandes en otras más pequeñas (Walstra y Smulder, 1988; Stang y col., 2001). El tamaño de las gotas producido está comprendido entre 0,1-2 μm . Algunos homogeneizadores comerciales utilizan un proceso de "dos etapas", en el que la emulsión es forzada a través de dos válvulas consecutivas. Si se requieren gotas muy finas usando este tipo de homogeneizador, la emulsión se hace circular a través del dispositivo varias veces (**Figura 1.13**).

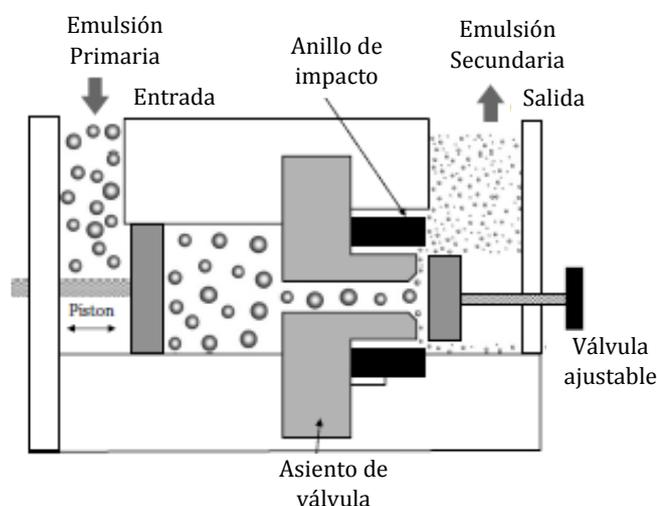


Figura 1.13. Homogeneizador a válvula de altas presiones para la obtención de emulsiones (McClements, 2016)

El aumento de temperatura en un homogeneizador a válvula de alta presión es a menudo bastante pequeño, pero puede ser apreciable si la emulsión se recircula varias veces o si se producen altas presiones de homogeneización. En

estos casos, puede ser necesario mantener la emulsión enfriada usando una homogeneización con camisa de agua en la cámara (Schubert y col., 2003).

Los *homogeneizadores ultrasónicos* son adecuados para la preparación de pequeños volúmenes de emulsiones y se utilizan principalmente en laboratorios de investigación. Este tipo de homogeneizador emplea ondas ultrasónicas de alta intensidad que generan intensos gradientes de presión y de cizallamiento provocando la disrupción de las gotas hasta tamaños de $\sim 0,1 \mu\text{m}$ (Leong y col., 2011).

Los *homogeneizadores de membrana* son utilizados principalmente en laboratorios de investigación para la obtención de partículas con dimensiones y estructuras bien definidas (Vladisavljevic y Williams, 2005; Nisisako, 2008; Nazir y col., 2010). Este sistema está basado en el pasaje forzado de una fase a otra a través de una membrana sólida de tamaño de poro definido. Pueden obtenerse tamaños de gotas entre $0,5$ y $10 \mu\text{m}$, dependiendo del tamaño de los poros de la membrana y los flujos de fase oleosa y acuosa.

La *microfluidización* es un método eficiente para lograr emulsiones con tamaños de gota muy pequeños ($\sim <100 \text{ nm}$) (Jafari y col., 2007; Qian y McClements, 2011). En este tipo de homogeneizador el fluido ingresa al equipo donde un dispositivo de bombeo lo hace circular a una alta velocidad a través de canales, y luego chocar simultáneamente entre sí sobre una superficie sólida. Así, se generan intensas fuerzas disruptivas provocando que los fluidos se entremezclen y cualquier gota mayor sea reducida (Jacobsen y col., 2013).

3.5. Características de gota

Las propiedades fisicoquímicas de las emulsiones (propiedades reológicas, ópticas, estabilidad y características de liberación) son altamente dependientes de las propiedades de las gotas que contienen. Algunas de las principales características de gota se mencionan a continuación.

Distribución de tamaño de partícula

El tamaño de gotas de una emulsión tiene gran influencia sobre muchas propiedades fisicoquímicas y sensoriales de estos sistemas, por ejemplo su vida útil, apariencia, textura y sabor. A su vez, este parámetro se ve fuertemente

influenciado por el tipo y concentración de emulsificante, las propiedades fisicoquímicas de sus fases y las condiciones de homogeneización empleados.

Una emulsión cuyas gotas de aceite poseen el mismo tamaño es denominada “monodispersa”, mientras que cuando dichas gotas se presentan en un amplio rango de tamaños se denomina “polidispersa”. Las emulsiones monodispersas son muy difíciles de obtener, por ello generalmente son preparadas y utilizadas en estudios modelo. Las emulsiones reales, sin embargo, siempre poseen una fase dispersa con distintos tamaños de gota. Las emulsiones polidispersas, según el número de poblaciones que poseen (picos presentes en su distribución), pueden caracterizarse como monomodales, bimodales o multimodales (uno, dos o más de dos picos) (McClements, 2005b).

Como el número de gotas en la mayoría de las emulsiones es muy grande, su tamaño puede variar de forma aproximadamente continua desde un valor mínimo a otro máximo. Usualmente se divide el intervalo total en una serie de rangos discretos y se informa el número de gotas que pertenece a cada categoría. Los datos resultantes se presentan en una tabla de datos, un histograma o una curva continua. En este último caso, puede plantearse una función de distribución o una función acumulativa (McClements y Weiss, 2005).

El tamaño de gotas de una emulsión polidispersa suele completarse por algunos parámetros adicionales, además de la distribución de tamaños. El más importante es el diámetro medio (D), que constituye una medida de la tendencia central de la distribución. La determinación de los diámetros promedio $D_{1,0}$, $D_{2,0}$ y $D_{3,0}$ requieren el conocimiento del número total de gotas. El conteo de gotas en una emulsión es un proceso extremadamente tedioso y complejo, de manera que se utilizan los diámetros promedio de Sauter D [3, 2] y de De Brouker D [4, 3], cuyas fórmulas no contienen el número total de gotas. 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, 1999; McClements, 2007). Los diámetros D [3, 2] y D [4, 3] se calculan empleando las siguientes fórmulas (Ec. 1.11 y 1.12):

$$D [3, 2] = \frac{\sum n_i \cdot D_i^3}{\sum n_i D_i^2} \quad \text{Ec.1.11}$$

$$D [4, 3] = \frac{\sum n_i \cdot D_i^4}{\sum n_i \cdot D_i^3} \quad \text{Ec.1.12}$$

Otros parámetros que se emplean para cuantificar emulsiones polidispersas son W , que es una medida del ancho de la distribución, y $\%Vd > 1$, el porcentaje de partículas con diámetros mayores a $1 \mu\text{m}$. W se calcula con los percentilos 90 ($D_{x,0,9}$) y 10 ($D_{x,0,1}$) y da idea de la polidispersidad (P) de la emulsión que se calcula de la siguiente forma (Ec. 1.13):

$$P = \frac{(D_{x,0,9} - D_{x,0,1})}{D_{x,0,5}} = \frac{W}{D_{x,0,5}} \quad \text{Ec. 1.13}$$

con $D_{x,0,5}$, percentilo 50.

El $D [4, 3]$ posee mayor sensibilidad a la presencia de partículas de gran tamaño en una emulsión que el $D [3, 2]$, por lo que el primero constituye un parámetro preferencial al estudiar fenómenos de agregación (Relkin y Sourdet, 2005).

Carga eléctrica superficial de las gotas

Usualmente la carga eléctrica superficial de las gotas en una emulsión es el resultado de la adsorción de las moléculas del agente emulsificante que contienen grupos ionizados o ionizables (surfactantes iónicos, fosfolípidos, proteínas y polisacáridos) (McClements y Weiss, 2005). La magnitud y el signo de la carga eléctrica en la superficie de las gotas dependen del tipo y concentración de las moléculas superficialmente activas presentes en la interface, así como del pH y la composición iónica de la fase acuosa. La carga de la gota en una emulsión es un parámetro clave que no sólo determina como una gota interactúa con otras especies cargadas (ej. gotas de otra emulsión, polímeros, iones minerales) sino también como éstas se comportan en presencia de un campo eléctrico (el cual es la base de las mediciones experimentales de la carga eléctrica). Especies cargadas con signo opuesto son atraídas entre sí, mientras aquellas con signo similar se repelen. Las emulsiones que contienen gotas fuertemente cargadas son menos propensas a la agregación debido a la repulsión electrostática entre ellas. Las propiedades de emulsiones estabilizadas por emulsificantes ionizados son particularmente sensibles al pH y la fuerza iónica de la fase acuosa.

3.6. Agentes emulsificantes

Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables. No obstante, en la interfase agua/aceite pueden estar presentes uno o varios agentes emulsificantes que permiten mantenerlas estables desde el punto de vista cinético mediante dos mecanismos: disminución de la tensión interfacial y otorgamiento de rigidez a la película (“film” interfacial) que rodea a las gotas (Florence y Rieg, 1983; Taupin, 1983; Lucassen-Reynders, 1993; McClements, 1999). Los agentes emulsificantes tienen la propiedad de ser anfifílicos, es decir, son afines tanto al agua como al aceite. Estas moléculas tienen regiones polares que interactúan con la fase acuosa y regiones no polares que se orientan hacia la fase lipídica. De esta manera, los emulsificantes conforman la película interfacial, interactuando con ambas fases y haciendo posible la formación de la emulsión.

Los emulsificantes pueden clasificarse, según su naturaleza química, en dos grupos: emulsificantes proteicos, los cuales poseen distintos grados de polaridad y carga, por lo tanto, una afinidad variable por las fases oleosa y acuosa (Damodaran, 1997) y emulsificantes no proteicos, grupo dentro del cual se encuentran los fosfolípidos (Dickinson y McClements, 1995).

3.7. Balance Hidrofílico-Lipofílico (HLB)

El concepto del balance hidrofílico-lipofílico (HLB) se basa 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 un valor en relación con 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 puede estimarse experimentalmente a partir de su “cloud point” (McClements, 1999). La forma semiempírica de calcular el HLB se presenta en la **Ecuación 1.11**:

$$\text{HLB} = 7 + \Sigma (\text{Número grupos hidrofílicos}) - \Sigma (\text{Número grupos lipofílicos}) \quad \text{Ec. 1.11.}$$

Los números de los diferentes grupos se encuentran tabulados, algunos de los cuales se muestran en la **Tabla 1.14**.

Tabla 1.14. Número de grupos para el cálculo de HLB (Davis, 1994)

Grupo hidrofílico	Número	Grupo lipofílico	Número
-SO ₄ Na ⁺	37,7	-CH-	0,475
-COO-H ⁺	21,2	-CH ₂ -	0,475
Amina terciaria	9,4	-CH ₃ -	0,475
Anillo Sorbitan	6,8		
-COOH	2,1		
-O-	1,3		

Así, un emulsificante con un bajo HLB (3-6) es predominantemente hidrofóbico, se disuelve preferentemente en la fase oleosa, estabiliza emulsiones W/O y forma micelas reversas en aceite. En contraste, un emulsificante con un elevado HLB (8-18) es predominantemente hidrofílico, 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 ó 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).

3.8. Procesos de desestabilización de emulsiones

Las emulsiones, si bien son termodinámicamente inestables desde un punto de vista fisicoquímico, son sistemas que pueden adquirir cierta estabilidad cinética cuando se controlan los procesos de desestabilización física. Dichos procesos, pueden ser: separación gravitacional, floculación, coalescencia, coalescencia parcial, desproporción e inversión de fases, los cuales se describen seguidamente (Márquez, 2009).

- **Separación gravitacional** (cremado/sedimentación). Es la separación causada por el movimiento ascendente (cremado, en emulsiones O/W); (**Figura 1.14**) o

descendente (sedimentación, en emulsiones W/O) de las gotas debido a su menor o mayor densidad que la fase continua, respectivamente (Walstra, 1996). De acuerdo a 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).

- **Floculación.** Las gotas en las emulsiones están en movimiento continuo por efecto de la energía térmica, la gravedad y las fuerzas mecánicas aplicadas, lo que favorece la colisión entre las gotas, las cuales pueden apartarse o quedar agregadas, dependiendo de la magnitud relativa de las fuerzas repulsivas y atractivas entre ellas. La floculación es el proceso en el cual dos o más gotas se unen para formar un agregado (flóculo) en el cual cada gota retiene su identidad, sin fusionarse, llevando a una disminución en el número de partículas presentes en la emulsión (**Figura 1.14**). La floculación puede ser reversible o irreversible, de acuerdo a las fuerzas que mantienen unidas a las gotas. El 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).

- **Coalescencia.** Es un proceso que genera un aumento del tamaño de las gotas y que conduce a la reducción del área interfacial. Se produce por aproximación, choque, deformación y ruptura de la película interfacial; las gotas individuales se unen perdiendo su identidad y formando gotas más grandes (**Figura 1.14**). Este proceso depende de la frecuencia, energía y eficiencia de colisión entre gotas así como también de la resistencia y viscoelasticidad de la película que rodea a las gotas. La coalescencia causa el cremado o la sedimentación más rápida de la emulsión debido al aumento en el tamaño de las gotas. En emulsiones O/W la coalescencia conduce al “oiling off” (formación de una capa de aceite en la parte

superior de la emulsión; **Figura 1.14**), mientras que en emulsiones W/O lleva a la acumulación de agua en la parte inferior del sistema (McClements, 1999).

- **Inversión de fases.** Cambio de una emulsión O/W a una W/O o viceversa. Puede producirse por una elevada fracción volumétrica de fase dispersa, por efecto de trabajo mecánico o de la temperatura (Campbell y col., 1996; McClements, 1999).

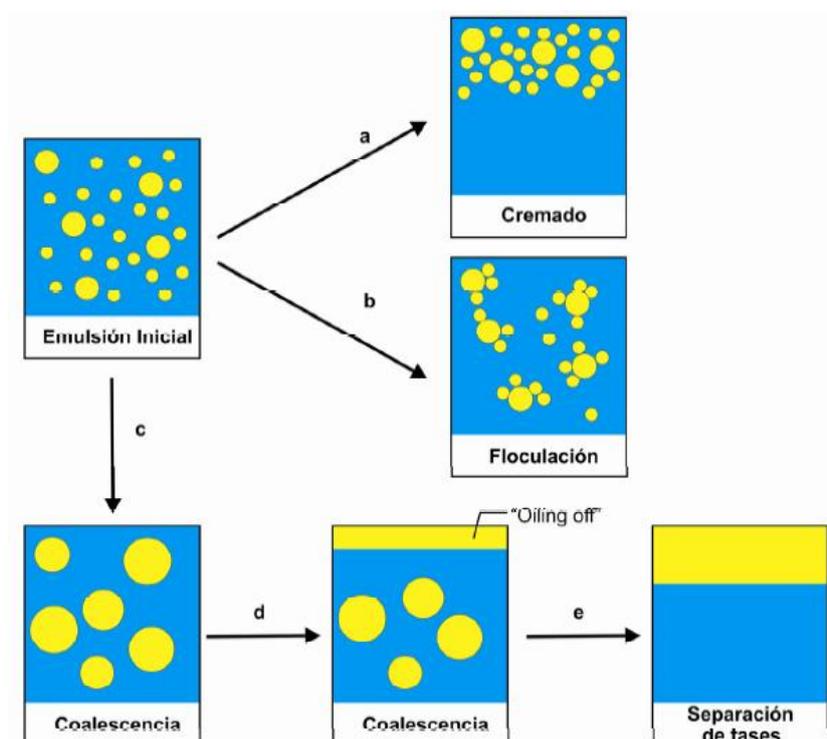


Figura 1.14. Mecanismos de desestabilización más importantes de una emulsión aceite en agua (O/W) (Wagner, 2000)

3.9. Oxidación lipídica en emulsiones

La oxidación de lípidos en una emulsión es un fenómeno interfacial inducido por metales de transición, la luz, la temperatura y el oxígeno, pudiendo verse también afectada por el pH, el tamaño de las gotas y otros factores relacionados con la composición de las fases que la constituyen (Nielsen y col., 2013). A su vez, la estabilidad oxidativa de las emulsiones alimentarias depende en gran medida de la composición química de la fase lipídica. Así, un mayor nivel de insaturación de los componentes lipídicos puede tener asociado una mayor susceptibilidad a la oxidación. Así, además de alterar la calidad sensorial (rancidez)

y nutricional (pérdida de vitaminas y ácidos grasos esenciales) de los alimentos, la oxidación lipídica puede generar compuestos altamente reactivos y de implicancia toxicológica (ej. malondialdehído, 4-hidroxinonenal) para la salud de los consumidores. Por lo tanto, diversos estudios se enfocan en la prevención de la oxidación de lípidos en emulsiones alimentarias.

Cabe señalar además, que la oxidación de lípidos en emulsiones es un proceso complejo ya que puede incluir eventos de oxidación o transferencia de electrones en las diferentes fases de dichos sistemas. En las emulsiones, la oxidación lipídica está influenciada por diversos factores tales como el tamaño de las gotas, la composición de la capa interfacial incluyendo su carga eléctrica, las estructuras coloidales en la fase acuosa, el pH, la composición de otros ingredientes además el aceite y agua, etc. En la **Figura 1.15**, se resumen los factores más importantes que ejercen influencia en la oxidación de lípidos en emulsiones O/W.

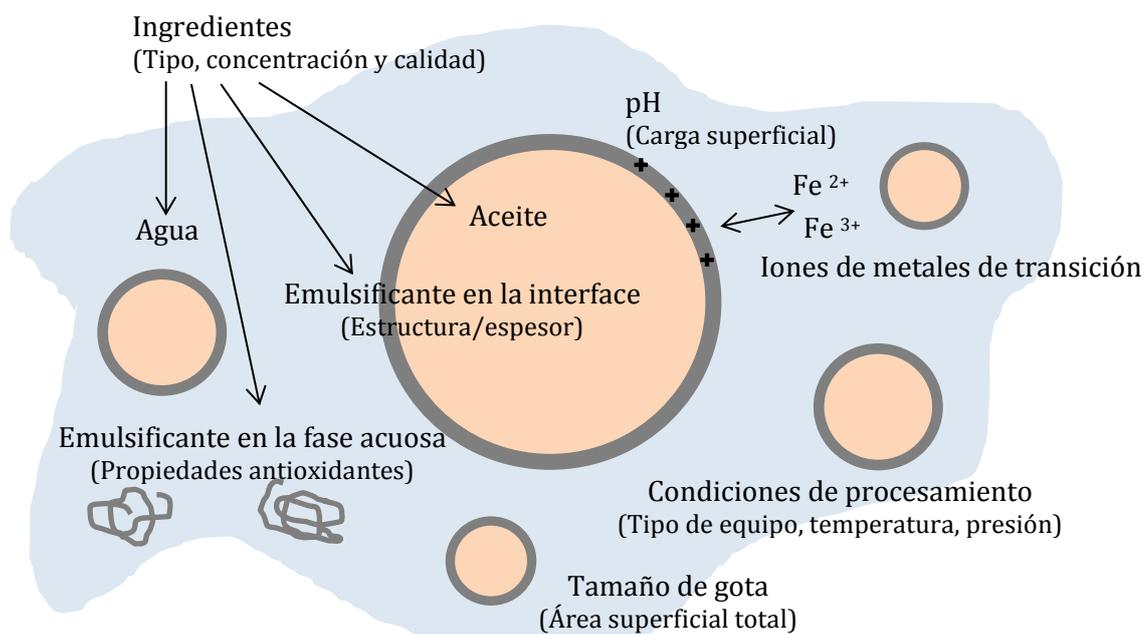


Figura 1.15. Factores que influyen en la oxidación de los lípidos en las emulsiones alimentarias. (Horn, 2012)

4. Microencapsulación

La fortificación de alimentos con ácidos grasos ω -3 a partir de la inclusión de aceites con un elevado contenido en estos compuestos puede realizarse a través de su incorporación de forma directa; sin embargo, este método tiene algunas limitaciones. La oxidación de los aceites ricos en ácidos grasos ω -3 puede ocurrir en las distintas etapas de la cadena de suministro, por la manipulación de las materias primas hasta el procesamiento y el posterior almacenamiento (ej. la manipulación del aceite durante el proceso de fabricación de alimentos, almacenamiento de los productos alimenticios enriquecidos). La alta susceptibilidad a sufrir deterioro oxidativo, con la posible generación de colores y sabores desagradables, por parte de este tipo de aceites comestibles hace que la incorporación de los ácidos grasos ω -3 en los alimentos sea un reto muy importante y de cierta complejidad. Dicha problemática ha sido abordada, en parte, mediante la adición de antioxidantes y la emulsificación del aceite. Un enfoque alternativo a lo comentado previamente implica la microencapsulación de estos aceites ricos en ω -3. El empleo de la tecnología de microencapsulación podría constituir una alternativa válida que brinde protección al aceite durante el procesamiento y almacenamiento del alimento funcional, sin afectar su sabor y vida útil. La microencapsulación ha demostrado ser una estrategia exitosa para la protección de ingredientes sensibles, permitiendo su liberación controlada en sistemas específicos. Esta tecnología tiene el potencial de ofrecer nuevas soluciones para la estabilización y mejora de la administración de ácidos grasos ω -3 en los alimentos (Sanguansri y Augustin, 2007).

La microencapsulación es la ciencia de empaquetamiento de componentes (núcleo o principio activo) dentro de un material secundario (material encapsulante o cobertura) y su entrega en pequeñas partículas (microcápsulas) (Desai y Park, 2005; Anal y Singh, 2007; Kralovec y col., 2012; Álvarez Cerimedo, 2013; Sanguansri y Augustin, 2007). Esta metodología se usa como un medio para aislar un ingrediente de las reacciones que puede sufrir frente a otros materiales circundantes o el medio ambiente. El componente ocluido en las microcápsulas puede ser liberado en respuesta a un disparador como fuerzas de cizalladura, pH o acción enzimática, permitiendo su liberación de manera controlada. Esta

tecnología tiene aplicaciones en la industria médica, farmacéutica, cosmética, química, agrícola y alimentaria (Augustin y Hemar, 2008; Álvarez Cerimedo, 2013).

Dicho proceso se puede utilizar para lograr la estabilización de un ingrediente sensible, enmascarar sabores y liberar componentes bioactivos de forma controlada. Un beneficio asociado a dicha tecnología es la mayor facilidad de manejo cuando los ingredientes microencapsulados se presentan en forma de polvo (Sanguansri y Augustin, 2007).

La principal ventaja de la microencapsulación de aceites con alto tenor de ácidos grasos ω -3 es la protección frente a la oxidación lipídica durante el procesamiento y almacenamiento, debido a una barrera incorporada (material encapsulante) la cual aísla el aceite del medio ambiente circundante. Por lo tanto, la oxidación de los aceites ricos en ácidos grasos poliinsaturados es reducida y la vida útil de estos productos durante el procesamiento y el almacenamiento puede verse mejorada. Dicho nivel de protección depende del material encapsulante utilizado y de la integridad del microencápsulado. El aceite puede ser protegido de la exposición directa a la luz y el oxígeno durante el almacenamiento y de los otros componentes en la matriz del alimento durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos, reduciendo así potencialmente las reacciones indeseables con otros ingredientes de alimentos en un sistema de alimentación complejo (Sanguansri y Augustin, 2007).

4.1. El proceso de microencapsulación

La obtención de un producto microencapsulado con ácidos grasos ω -3 implica la selección adecuada del aceite (núcleo), de los ingredientes a ser utilizados como material encapsulante, el desarrollo de la formulación -comprende la relación entre la cantidad necesaria de aceite con ω -3 a encapsular y el material encapsulante- y la aplicación de un proceso apropiado para su producción (**Figura 1.16**).

A fin de lograr una aplicación efectiva en la fortificación de alimentos, el producto microencapsulado debe poseer propiedades compatibles con las características de la matriz alimentaria a la que será incorporado. Por ello, es importante garantizar que tanto el procesamiento y el almacenamiento del aceite, así como su liberación, se realicen de forma adecuada. Para lograr un material

microencapsulado con determinadas propiedades pueden emplearse combinaciones de diferentes materiales encapsulantes y diversas tecnologías de proceso. Sin embargo, todavía existen limitaciones en el uso de ingredientes microencapsulados lo cual requiere un enfoque integrado para la producción de microcápsulas y su aplicación en el producto final (Sanguansri y Augustin, 2007). Seguidamente, se describen aspectos relacionados con el núcleo y el material encapsulante.

Núcleo

El aceite rico en ácidos grasos ω -3 debe poseer una alta calidad global. El proceso de refinación y desodorización específico aplicado en el procesamiento de aceite comercial rico en ω -3, la fuente de la materia prima (aceite de pescado, aceite de algas, aceites vegetales, etc.), la composición de ácidos grasos, y la adición de antioxidantes tienen influencia sobre la estabilidad y las propiedades finales del producto microencapsulado (Sanguansri y Augustin, 2007).

Material encapsulante

El material encapsulante puede seleccionarse a partir de una amplia variedad de polímeros naturales o sintéticos, dependiendo de las características deseadas en las microcápsulas. Tanto la composición como las propiedades físicas y químicas del material encapsulante pueden afectar las propiedades funcionales de las microcápsulas a ser obtenidas. Así, para la encapsulación de ácidos grasos ω -3 es conveniente elegir materiales provenientes de fuentes naturales que exhiban buenas propiedades de barrera al oxígeno a fin de ofrecer una protección del núcleo frente a la oxidación (Sanguansri y Augustin, 2007).

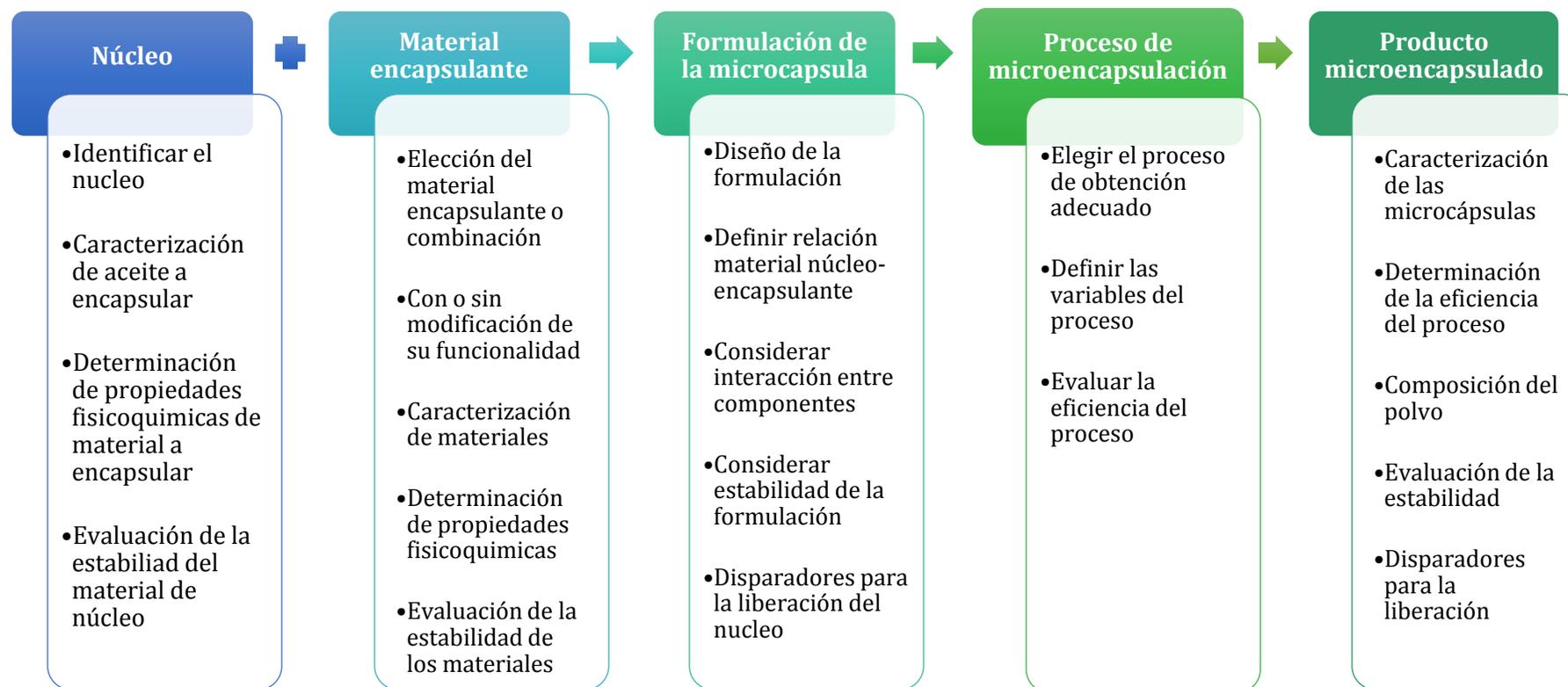


Figura 1.16. Enfoque integrado sobre el desarrollo de ingredientes microencapsulados (Sanguansri y Augustin, 2007)

Formulación de las microcápsulas

El diseño de las formulaciones para la encapsulación de ácidos grasos ω -3 requiere una comprensión de las propiedades del aceite y de la función requerida de los materiales encapsulantes, así como de otros ingredientes o aditivos elegidos para la misma.

El objetivo experimental conlleva posibilitar la selección de formulaciones con una alta eficiencia de encapsulación y de microcápsulas que confieran una alta estabilidad oxidativa al núcleo de aceite (Velasco y col., 2003). Además, es deseable lograr una alta carga de aceite en la microcápsula la cual debe obtenerse sin que ello comprometa la calidad final de la misma.

Proceso

La selección de los procesos y condiciones operativas para la microencapsulación de aceites ricos en ácidos grasos ω -3 requieren ciertas consideraciones. Los procesos unitarios estándar (ej. mezcla, homogeneización, y secado) se han utilizado tradicionalmente para la producción de ingredientes microencapsulados, ya que generalmente implican la preparación de una emulsión aceite en agua con los componentes de la matriz que luego se somete a técnicas de secado por aspersión o liofilización (Velasco y col., 2003).

Si bien existen muchas técnicas disponibles para la encapsulación de aceites en la industria alimentaria, tales como el secado por aspersión (“spray drying”), la refrigeración por aspersión (“spray cooling”), el revestimiento por aspersión (“spray coating”), la extrusión, la liofilización, la coacervación y la cocrystalización, entre otras, los más empleados son el secado por aspersión y la liofilización (Velasco y col., 2003).

Asimismo, es posible, la aplicación de operaciones emergentes de procesamiento de alimentos (ej. microfluidización, ultrasonido, procesamiento de alta presión) para la obtención de ingredientes microencapsulados. El empleo de estas tecnologías en las distintas etapas del proceso de microencapsulación, en lugar de los procesos unitarios estándar, permite la obtención de microcápsulas con propiedades más específicas.

La elección de los procesos a emplear para la microencapsulación dependerá de las propiedades requeridas y del costo de producción de las

microcápsulas, el cual puede variar significativamente dependiendo de la tecnología de microencapsulación empleada (Sanguansri y Augustin, 2007). Es importante tener en cuenta los requisitos esenciales del ingrediente microencapsulado en el producto final, así como considerar si el producto puede tener asociado un mayor valor agregado y por ende, un costo adicional. El éxito de esta técnica debe dar lugar a un polvo con una mínima cantidad de aceite a nivel superficial y un máximo de retención del material activo (Carneiro y col., 2013).

4.2. Materiales de encapsulación

Proteínas, carbohidratos, lípidos, gomas, polisacáridos, y materiales de celulosa se utilizan comúnmente para la microencapsulación de aceites con alto contenido de ácidos grasos ω -3 (Tabla 1.15). Estos materiales se pueden utilizar solos o en diversas combinaciones para lograr determinadas características, ya sea durante la producción o en el producto final.

Tabla 1.15. Materiales de pared usados como agentes encapsulantes de aceites ricos en ácidos grasos ω -3 (Sanguansri y Augustin, 2007)

Clase de material	Tipo de materiales
Proteínas	Albúmina, caseinato, gelatina, gluten, péptidos, proteínas de soja, proteínas de suero, otras proteínas vegetales
Azúcares y productos de azúcar	Fructosa, galactosa, glucosa, maltosa, sacarosa, oligosacáridos, sólidos de jarabe de maíz, jarabe de glucosa deshidratado
Almidón y sus productos	Maltodextrinas, dextrinas, almidones, almidones modificados
Gomas	Agar, alginatos, carragenano, goma de acacia, goma arábiga, pectinas
Material de celulosa	Acetil celulosa, carboximetil celulosa, acetato ftalato de celulosa, etil celulosa, metil celulosa, nitrocelulosa
Otros carbohidratos	Quitosano, ciclodextrinas
Lípidos	Acetoglicéridos, cera de abejas, diglicéridos, grasas y aceites naturales, grasas fraccionadas, grasas endurecidas, lecitina, liposomas, monoglicéridos, parafina, ácido triesteárico, ceras

Un buen agente encapsulante para aceites ricos en ácidos grasos ω -3 es aquel que protege a la microcápsula de la degradación durante el procesamiento y el almacenamiento, así como también enmascara el sabor indeseable y el olor asociado al ingrediente oleoso microencapsulado al ser añadido en un producto alimenticio. El material encapsulante debe ser apto para ser incorporado en alimentos. Además, los materiales encapsulantes pueden usarse en combinación con otros componentes de la formulación, tales como sustancias que captan oxígeno, antioxidantes, agentes quelantes y tensioactivos. El costo es también un aspecto a considerar para la selección del agente encapsulante (Sanguansri y Augustin, 2007).

4.3. Propiedades de las microcápsulas

En general las microcápsulas de aceite rico en ácidos grasos ω -3 en polvo son partículas pequeñas, que presentan un contenido de aceite entre 20-60% rodeada de una matriz o material encapsulante. Las propiedades finales del polvo necesitan ser adaptadas para satisfacer las necesidades en el producto final (Sanguansri y Augustin, 2007).

La mayoría de los aceites con ácidos grasos ω -3 microencapsulados se suministran como polvos los cuales son reconstituidos. Por ello, la capacidad del polvo para formar una dispersión estable o emulsión después de la reconstitución es un atributo deseable. El tamaño de partícula del polvo, la eficiencia de encapsulación, la solubilidad y dispersabilidad pueden variar dependiendo de las propiedades de la emulsión o dispersión de partida, las condiciones de proceso utilizadas durante el secado y el método de secado empleado.

Las condiciones de almacenamiento tales como la temperatura, la humedad, la disponibilidad de oxígeno, luz y el tipo de envase pueden también tener impacto en gran medida sobre la estabilidad de las microcápsulas, dependiendo de las propiedades del núcleo y del material encapsulante, así como en la estructura y la morfología de las microcápsulas (Sanguansri y Augustin, 2007).

5. Objetivos

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

Objetivo general

- Estudiar la incorporación de subproductos (aceite, mucílago, proteínas) de la chía (*Salvia hispanica* L.) en alimentos funcionales (emulsiones alimentarias funcionales y/o aceite microencapsulado)

Objetivos específicos

- Obtener emulsiones (aceite-agua, O/W) con las características de un alimento funcional (emulsiones funcionales), estudiando los factores que determinan su formación y estabilización con distintos agentes emulsificantes proteicos (caseinato de sodio, proteínas de chía), no proteicos (lecitinas modificadas de girasol), presencia de lactosa (fase acuosa) y aceite de chía (fase oleosa)

- Evaluar la aplicación potencial del mucílago de chía como agente espesante y de las proteínas de chía como agente emulsificante en la preparación de emulsiones O/W

- Obtener y estudiar la estabilidad fisicoquímica de emulsiones funcionales multicapa a partir de la técnica de deposición electrostática ("*layer-by-layer*" LBL) y distinta composición de la fase acuosa (lecitinas modificadas de girasol, quitosano)

- Obtener microcápsulas de aceite de chía mediante secado (por aspersión o liofilización) de emulsiones O/W mono y multicapa, evaluando la influencia de distintas formulaciones y las condiciones operativas sobre la eficiencia del proceso e incidencia en la calidad del material encapsulado



CAPÍTULO 2

Emulsiones O/W con subproductos de chía

1. Introducción

En la actualidad existe un creciente interés en la incorporación de ingredientes ricos en ácidos grasos omega 3 (ω -3), nutrientes esenciales para el organismo, a través del desarrollo de alimentos funcionales. A su vez, en estos últimos años la semilla de chía (*Salvia hispanica* L.) ha incrementado su importancia a nivel nutricional debido a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) (~60% es ácido α -linolénico) del aceite extraído de la semilla (Ayerza, 1995). De esta manera, la chía proporciona una alternativa a las fuentes de ácidos grasos ω -3 de origen marino como las algas y el aceite de pescado, teniendo como ventaja no poseer cantidades significativas de colesterol. Sin embargo, su incorporación puede verse limitada debido a su alta susceptibilidad frente al deterioro oxidativo (Ixtaina y col., 2012). En este sentido, las emulsiones aceite en agua (O/W) constituyen una estrategia dado que mediante este sistema alternativo puede vehiculizar su inclusión en diversas matrices alimentarias y a su vez, incidir favorablemente sobre su estabilidad oxidativa.

En general, las emulsiones O/W convencionales están constituidas por una distribución de gotas de aceite dispersas en un medio acuoso, las cuales están cubiertas por una capa simple de agente emulsificante que las estabiliza frente a la agregación, con tamaños de gota comprendidos en un rango de 100 nm a 100 μ m.

El tipo de agente emulsificante empleado para estabilizar una emulsión O/W es un factor determinante de su estabilidad fisicoquímica en función del tiempo. Así, existe una amplia gama de agentes emulsificantes disponibles tales como ingredientes alimentarios entre los cuales, las proteínas resultan particularmente atractivas dado que muchas de ellas además de ser moléculas activas a nivel superficial son de origen natural, no tóxicas, no tienen sabor y se hallan ampliamente distribuidas en la naturaleza (Harnsilawat y col., 2006).

Las proteínas y los carbohidratos se encuentran en forma conjunta en diversos productos alimenticios, contribuyendo ambos a la estabilidad, la textura y la vida útil de los mismos. En las emulsiones alimentarias, los carbohidratos suelen ser añadidos para conferir mayor viscosidad (agentes espesantes), obtener un producto tipo gel (agentes gelificantes) a fin de retardar los procesos de

desestabilización o bien, como materiales de pared de microcápsulas a ser obtenidas posteriormente mediante el secado de la emulsión.

Las propiedades fisicoquímicas de una emulsión O/W tales como su reología, estabilidad global son fuertemente dependientes de las características de las gotas de la fase dispersa. A su vez, estas características están determinadas por diversos factores tales como las condiciones de homogeneización (intensidad y duración del proceso), la composición del sistema (el tipo y concentración de agente emulsificante, adición de algún agente estabilizante o la relación de viscosidad entre las fases dispersa y continua) (McClements, 2005). La estabilidad oxidativa de los aceites con un alto tenor de ácidos grasos ω -3 puede verse afectada por su calidad inicial, así como por el tipo, localización y concentración de proteínas en las emulsiones (Faraji y col., 2004). A continuación, se detalla el efecto de diversos factores sobre las emulsiones O/W.

1.1. Factores que determinan las características y estabilidad de las emulsiones O/W

Propiedades de las fases lipídica y acuosa

La composición y propiedades fisicoquímicas de ambas fases, lipídica y acuosa, afectan el tamaño de partícula de una emulsión O/W producido durante la homogeneización. Cambios en el tipo de aceite y/o fase acuosa empleados definen la relación de viscosidad, η_l/η_a (viscosidad de la fase lipídica/viscosidad de la fase acuosa), la cual determina el tamaño mínimo de partícula que puede ser producido en condiciones de estado estacionario (McClements y Weiss, 2005).

La tensión interfacial de la interfase aceite-agua en una emulsión puede verse afectada por las características químicas de la fase lipídica, por ejemplo, su estructura molecular o la presencia de impurezas activas a nivel superficial como ácidos grasos libres, mono o diacilglicérol. A su vez, la estabilidad frente a la oxidación depende -en gran medida- del tipo y concentración de la fase lipídica, así como de la presencia de agentes antioxidantes (ej. tocoferoles) (Kamal-Eldin, 2006). Así, un aceite en cuya composición predomine un alto tenor de lípidos insaturados será más susceptible a registrar deterioro por oxidación lipídica (Frankel, 1993; Kamal-Eldin, 2006). Además, la calidad del aceite puede tener una

gran influencia en la estabilidad oxidativa de estos sistemas, de esta forma un aceite que presente un alto contenido inicial de hidroperóxidos será propenso a registrar el deterioro comentado que otro de mayor calidad.

Además, la región interfacial y la fase acuosa en general, están constituidas por una amplia variedad de componentes, incluyendo proteínas, polisacáridos, fosfolípidos, surfactantes, alcoholes y complejos moleculares; pudiendo su composición evolucionar en función del tiempo. El tipo, la concentración y las propiedades interfaciales de un agente emulsificante tienen influencia sobre las características finales de las emulsiones a las cuales estabilizan. En cuanto a la estabilidad oxidativa de una emulsión, el tipo de emulsificante puede influir de dos maneras. En primer lugar, a través de su capacidad de crear una membrana interfacial alrededor de las gotas de aceite que protege a las mismas frente a los agentes prooxidantes presentes en la fase acuosa y además porque los agentes emulsificantes pueden presentar en su estructura diferentes grupos reactivos con propiedades antioxidantes (Horn, 2012).

Las proteínas son muy usadas como agentes emulsificantes en emulsiones alimentarias. Entre ellas, las proteínas lácteas constituyen componentes funcionales claves en muchos alimentos siendo ampliamente consumidos debido a su importancia nutricional y a sus buenas propiedades fisicoquímicas, tales como su capacidad de retención de agua, poder emulsificante, capacidad espumante, buenas características de flavor y alta solubilidad en medios neutros y alcalinos (Srinivasan, 1998). Dentro de las proteínas lácteas, el **caseinato de sodio** es uno de los más utilizado en la industria alimentaria, siendo obtenido a partir de una suspensión viscosa de caseína ácida (20% de proteínas) por neutralización con NaOH, pasteurización y posterior secado por aspersion (Kinsella, 1984). El producto obtenido es un polvo blanco amarillento, con un contenido de proteínas promedio de ~90%, con alta solubilidad en un rango de pH entre 5,5-7,5. Esta alta solubilidad le otorga excelentes propiedades espumantes y emulsificantes, por lo cual tiene gran aplicación industrial en la formulación de alimentos (Ye y Singh, 2001; Dickinson y col., 2003). Este agente emulsificante está compuesto por cuatro proteínas principales, α_{S1} , α_{S2} , β y κ caseínas, en proporciones 4:1:4:1 aproximadas en peso. Según Creamer y Berry (1975), el caseinato de sodio está formado por partículas coloidales similares a las sub-micelas de caseína con diámetro y peso

molecular de ~10 nm y 250 kDa, respectivamente. La mayor parte de las investigaciones referidas a las propiedades emulsificantes y la actividad superficial del caseinato de sodio involucran soluciones diluidas de proteínas y altas relaciones de aceite/proteína. No obstante, el uso de caseinato de sodio como agente emulsificante y a su vez encapsulante implica el secado de emulsiones con niveles de concentración de proteínas mayores y volúmenes de fase oleosa menores que los empleados habitualmente en el campo de las emulsiones (Hogan y col., 2001).

La estabilidad de las emulsiones formuladas con proteínas puede incrementarse a través de la adición de otros componentes que interactúen con ellas, retardando así los procesos de desestabilización como el cremado y la floculación (Huck-Iriart y col., 2014). Los carbohidratos pueden aumentar la viscosidad de la fase continua en las emulsiones, por lo que influyen en la estabilidad de estos sistemas alimentarios.

La **lactosa** es un disacárido (4-O- β -D-galactopiranosil-D-glucopiranososa, C₁₂H₂₂O₁₁) ampliamente aplicado en la industria alimentaria. Se trata de un disacárido reductor constituido por una molécula de D-glucosa y una de D-galactosa unidas mediante un enlace β -1,4-glicosídico (Fox y McSweeney, 1998). Es el azúcar más abundante en la leche de la mayoría de los mamíferos, también se encuentra en algunas otras fuentes, tales como las especies vegetales *Forsythia* y *Sapotacea* (Holsinger, 1988). La lactosa deriva casi exclusivamente del suero, un subproducto de muchas líneas de procesos en la industria lechera y se utiliza típicamente en las industrias alimentaria y farmacéutica en una amplia gama de productos, desde la estandarización interna de la leche en quesos hasta las aplicaciones farmacéuticas, como producción de inhaladores de polvo seco (Lifran y col., 2000; Raghavan y col., 2000). La lactosa posee varias propiedades funcionales favorables, tales como una dulzura relativamente baja, es potenciador del sabor y las capacidades estabilizadoras de proteínas, que a su vez hace que este azúcar sea un ingrediente importante para diversas aplicaciones (Chandrapala y col., 2016). Por otra parte, estas propiedades están compensadas por diversas características fisicoquímicas de la lactosa, tales como mutarrotación, solubilidad y cristalización, todas ellas impulsadas por la composición y características del medio circundante (Roos, 1993).

Por otra parte, otros polisacáridos tales como la maltodextrina se utilizan frecuentemente en emulsiones para inhibir la formación de crema y/o separación de fases (Liang y col., 2014). La **maltodextrina** es un producto derivado de la hidrólisis del almidón, constituida por una mezcla de oligómeros y/o polímeros de D-glucosa unidos mediante enlaces α -1,4. Comercialmente se clasifican de acuerdo al perfil de carbohidratos que la constituyen y a su contenido de azúcares reductores expresados como equivalentes de dextrosa (ED). El ED es una medida del poder reductor de los polisacáridos/oligosacáridos derivados del almidón en comparación a la D-glucosa en base seca (Wang y Wang, 2000). Maltodextrinas con diferentes valores de ED poseen características fisicoquímicas distintas, incluyendo solubilidad, temperatura de congelación, viscosidad, etc.

Proceso de homogeneización

En una emulsión O/W, el tamaño de partícula puede reducirse mediante el aumento de la cantidad de energía suministrada durante el proceso de homogeneización, siempre que haya suficiente cantidad de emulsificante en el medio para cubrir las superficies de las gotas formadas. La entrega de energía al sistema depende de la naturaleza del homogeneizador. Por lo tanto, la elección del dispositivo de homogeneización podría afectar indirectamente a la oxidación de lípidos a través de los tamaños de las gotas de aceite producidas. Además, los diferentes equipos de homogeneización de alta presión difieren con respecto a su generación de calor (Mao y col., 2010), que es otro factor que puede potencialmente influir en la oxidación de lípidos. Diversos estudios en la leche han demostrado que la estructura de la proteína en la interface varía en función del tipo de homogeneizador de alta presión utilizado, debido a diferencias en las geometrías de las cámaras de trabajo (Dagleish y col., 1996). Además de las características del equipo empleado en la homogeneización, las condiciones del proceso podrían también influir sobre la estabilidad de las emulsiones O/W. En los dispositivos de homogeneización mecánica, el parámetro que puede variarse es la velocidad de rotación, lo que finalmente influye en el tamaño de las gotas de aceite resultante. En homogeneizadores de alta presión el parámetro principal a controlar es el nivel de presión aplicada. El aumento de la presión o el número de ciclos en los que la muestra pasa a través de la cámara de trabajo reduce el tamaño

de las gotas de aceite obtenidas (Qian y McClements, 2011). Sin embargo, los estudios de oxidación lipídica en emulsiones preparadas con caseinato de sodio, Tween 20 o un concentrado de proteínas de suero no han podido establecer una relación clara entre la estabilidad oxidativa, la presión aplicada y el tamaño de las gotas (Dimakou y col., 2007; Kiokias y col., 2007).

1.2. Subproductos de chía (*Salvia hispanica* L.)

Actualmente, la industria alimentaria tiene un creciente interés en la sustitución de agentes emulsificantes y estabilizantes sintéticos por otros de origen natural, tales como polisacáridos y proteínas. Así, la industria aceitera genera subproductos (harinas residuales), constituidos por un alto contenido de fibra y proteínas luego de la obtención del aceite a partir de la semilla de chía. Estos subproductos se destinan principalmente a la alimentación animal, con un impacto económico y social muy reducido. Una alternativa para la revalorización de estos recursos es la aplicación de tecnologías modernas que añaden valor mediante la transformación de dichos subproductos con características y propiedades compatibles con la alimentación humana (Julio y col., 2014).

El contenido proteico de la chía es mayor en comparación al de trigo, maíz, arroz, avena, cebada y granos de amaranto y su perfil de aminoácidos no presenta factores limitantes en una dieta para adultos (Bushway y col., 1981; Ayerza y Coates, 2005). El aislamiento y caracterización de una fracción rica en proteína de la semilla de chía ha sido estudiada por algunos autores (Olivos-Lugo y col., 2010; Vázquez-Ovando y col., 2012), mientras que las propiedades funcionales de estas fracciones están comenzando a ser investigadas. Olivos-Lugo y col. (2010) y Sandoval-Oliveros y Paredes-López (2012) investigaron la obtención y caracterizaron una fracción rica en proteínas de chía constituida por globulinas (64,9%), glutelinas (20,2%), albuminas (10,9%) y prolaminas (4,0%) con un alto porcentaje de ácido glutámico, arginina y ácido aspártico. Estos aminoácidos son importantes para el sistema inmunológico y la prevención de enfermedades cardiovasculares. Adicionalmente, la fracción rica en proteínas de chía ha presentado buena capacidad de retención de agua (WHC “water-holding capacity”) (4,06 p/p) y de aceite (OHC “oil-holding capacity”) (4,04 p/p) (Olivos-Lugo y col., 2010).

Además, la semilla de chía contiene entre un 5-6% de mucílago, un polisacárido complejo de alto peso molecular compuesto principalmente por D-xilosa, D-manosa, D-arabinosa, D-glucosa, ácido galacturónico y glucurónico, estable a altas temperaturas (hasta ~244 °C) (Lin y col., 1994; Reyes-Caudillo y col., 2008; Timilsena y col., 2016). El mucílago exuda cuando la semilla de chía entra en contacto con agua, siendo capaz de generar soluciones de alta viscosidad a bajas concentraciones y ser utilizado como fuente de fibra dietética soluble. En este sentido, numerosos beneficios para la salud han sido asociados a una mayor ingesta de fibra dietética, incluyendo la reducción del riesgo de enfermedades coronarias, diabetes, obesidad, y diferentes tipos de cáncer (Mann y Cummings, 2009). En este contexto, el mucilago de chía podría ser empleado como un nuevo agente espesante en la industria alimentaria y de cosméticos, así como contribuir a la salud del consumidor como fuente de fibra dietética (Capitani y col., 2013; Timilsena y col., 2016).

En virtud de lo expuesto, en el presente capítulo se describe la investigación llevada a cabo relacionada con la obtención y caracterización de emulsiones O/W con aceite de chía, evaluando el efecto de diferentes contenidos de caseinato de sodio, la adición de lactosa y la incidencia de variables operativas tales como la presión de homogeneización. Además, se estudió la influencia de distintas combinaciones proteínas-carbohidratos y la presencia de subproductos de chía (mucílago, fracción rica en proteínas) sobre las propiedades fisicoquímicas de emulsiones O/W.

2. Materiales y Métodos

2.1. Materiales y reactivos

El aceite de chía empleado en el presente trabajo fue provisto por SDA S.A. (Argentina) a partir de su obtención por primera prensada en frío. La composición de ácidos grasos, el contenido de tocoferoles, los valores iniciales de peróxidos, el índice de Iodo y de ácidos grasos libres del aceite de chía fueron determinados según lo descrito en las normas IUPAC 2.302 (IUPAC, 1992). El caseinato de sodio (CS), obtenido a partir de leche bovina, fue suministrado por Sigma Chemical Company (St. Louis. MO). Maltodextrina (M) con un equivalente de dextrosa (ED) 13-17% y D-lactosa monohidratada (L) fueron provistas por Productos de Maíz S.A. (Argentina) y Anedra (Argentina), respectivamente. Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Una fracción rica en proteínas de chía (FRP) fue obtenida mediante procesamiento por vía seca de harina desgrasada de chía molida a 0,5 mm de acuerdo a la metodología informada por Vázquez-Ovando y col. (2012). La harina fue fraccionada usando un tamiz tipo Tyler de malla 100 (140 μ m) para la separación de dos fracciones, de las cuales, la fracción cribada fue considerada rica en proteína de chía (FRP). Los contenidos obtenidos de proteínas, lípidos, humedad, fibra dietética total, cenizas y extracto libre de nitrógeno fueron 43,0; 0,7; 8,4; 14,1; 8,4 y 25,4%, respectivamente.

El mucílago de chía (Mg) fue obtenido a partir de la semilla entera de chía según la metodología descrita por Segura-Campos y col. (2014) con algunas modificaciones. Las semillas fueron remojadas en agua en una proporción 1:20 p/v a 50°C bajo agitación constante durante 30 min a fin de inducir la exudación del mucílago. La mezcla conteniendo agua, mucílago y semillas fue congelada a -20°C durante 12 h y posteriormente secada por liofilización (-40°C, 0,133 bar, 72 h) (Labconco, Freezone 18, EEUU). El material seco fue pulverizado y separado en un tamiz utilizando mallas No. 20 ASTM (0,849mm) y No. 25 ASTM (0,710 mm). La composición proximal del mucílago resultó: 10,7; 8,9; 9,1; 3,9; 13,6 y 53,8% de humedad, cenizas, proteínas, lípidos, fibra dietética total y extracto libre de nitrógeno, respectivamente.

2.2. Preparación de las emulsiones O/W

Se prepararon emulsiones aceite en agua (O/W) a partir de 10% p/p de aceite de chía constituyendo la fase oleosa y 90 % p/p de fase acuosa con diferentes concentraciones (2, 5 y 10 % p/p) de caseinato de sodio como agente emulsificante, en ausencia y presencia de 10 % p/p de lactosa. En determinados sistemas, la lactosa se añadió a la disolución de caseinato de sodio bajo agitación a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Se realizó una homogeneización primaria empleando un homogeneizador Ultraturrax T-25 (IKA-Labortechnik, GmbH & Co., Staufen, Alemania) a una velocidad de rotor de 9.500 rpm durante 1 min. A continuación, en una segunda etapa de homogeneización, la pre-emulsión obtenida se hizo recircular a través de un homogeneizador a válvula de alta presión de dos etapas (Panda 2K, GEA, Niro Soavi, Parma, Italia). Se emplearon dos condiciones de homogeneización diferentes regulando la presión de homogeneización a 400 y 600 bar, manteniendo en ambos casos el 10 % de la presión total sobre la segunda válvula. El tiempo de homogeneización fue el suficiente para que la pre-emulsión circulara 4 veces a través de las dos válvulas del equipo. Este procedimiento de recirculación tuvo por objeto favorecer la obtención de emulsiones con distribuciones de tamaño de partícula monomodal.

Las emulsiones fueron preparadas y codificadas de acuerdo a las distintas formulaciones y condiciones operativas expuestas en la **Tabla 2.1**. Se utilizó un diseño factorial completo $3 \times 2 \times 2$, replicado dos veces, para estudiar los efectos de la concentración de caseinato de sodio (2, 5 y 10 % p/p), presencia de lactosa (0 y 10% p/p) y presión de homogeneización (400 y 600 bar) sobre cada variable estudiada (distribución de tamaño de partículas, diámetro medio, ζ -potencial, propiedades reológicas, perfiles de “Back Scattering”, índice de peróxido y valores de *p*-anisidina).

Tabla 2.1 Emulsiones O/W con aceite de chía basadas en un diseño factorial completo 3x2x2. Parámetros experimentales y códigos de muestras

Concentración de CS% p/p	Concentración de L% p/p			
	0		10	
	Presión de homogeneización (bar)		Presión de homogeneización (bar)	
	400	600	400	600
2	2 CS_400	2 CS_600	2 CS_L_400	2 CS_L_600
5	5 CS_400	5 CS_600	5 CS_L_400	2 CS_L_600
10	10 CS_400	10 CS_600	10 CS_L_400	2 CS_L_600

Análogamente, otra serie de emulsiones O/W (30 % de sólidos totales) con diferente combinación proteínas-carbohidratos y presencia o ausencia de mucílago de chía en su fase acuosa fue preparada tal como se detalla en la **Tabla 2.2**. Todas las emulsiones se obtuvieron de forma análoga a lo descrito previamente homogeneizando 10% p/p de aceite de chía y 90% p/p de cada fase acuosa en dos etapas, utilizando un Ultraturrax T-25 (Janke & Kunkel GmbH, Staufen, Alemania) a una velocidad de rotor de 9500rpm, 1min y un homogeneizador a válvula de alta presión (Panda 2K, GEA NiroSoavi, Parma, Italia) regulando a 600 y 60 bar la primera y segunda válvula, respectivamente.

Las emulsiones fueron preparadas y codificadas de acuerdo a las distintas combinaciones de proteínas-carbohidratos y presencia o ausencia de mucílago de chía en la fase acuosa como se expone en la **Tabla 2.2**. Se utilizó un diseño factorial completo de 3x2, replicado dos veces, para estudiar el efecto de diferentes combinaciones de proteínas-carbohidratos (caseinato de sodio y lactosa, caseinato de sodio y maltodextrina, fracción rica en proteínas chía y maltodextrina) y la presencia de mucílago de chía (0 y 0,2 % p/p) en la fase acuosa de emulsiones O/W con aceite de chía sobre cada variable estudiada (distribución de tamaño de partículas, diámetro medio, ζ-potencial, propiedades reológicas, perfiles de “Back Scattering”, índice de peróxido y valores de *p*-anisidina).

En todas las emulsiones se adicionaron 12 ppm de nisina y 1000 ppm de sorbato de potasio, ambos aditivos alimentarios GRAS, para evitar el crecimiento microbiano.

Tabla 2.2. Composición y códigos de las emulsiones O/W de aceite de chía con diferentes combinaciones de proteínas-carbohidratos y presencia o ausencia de mucílago de chía en la fase acuosa

Código de muestra	Aceite de chía % p/p	Composición de la fase acuosa % p/p				
		FRP	CS	L	M	Mg
CL	10	-	10	10	-	-
CM	10	-	10	-	10	-
PM	10	10	-	-	10	-
CL+Mg	10	-	10	9,8	-	0,2
CM+Mg	10	-	10	-	9,8	0,2
PM+Mg	10	10	-	-	9,8	0,2

2.3. Almacenamiento de las emulsiones O/W

Las emulsiones obtenidas se almacenaron durante 30 días a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ en frascos de vidrio ámbar de 10 mL para protegerlas de la luz, sin cámara de aire para evitar la oxidación lipídica. Un frasco conteniendo aceite de chía fue almacenado en las mismas condiciones para ser evaluado durante el almacenamiento de forma similar a las emulsiones. La estabilidad físicoquímica fue evaluada periódicamente durante el almacenamiento a partir de la determinación de los diámetros medios de partícula, los perfiles de “Back Scattering” (BS), índice de peróxidos y *p*-anisidina, como se describe a continuación.

2.4. Caracterización y tratamiento de las emulsiones O/W

2.4.1. Distribución de tamaño de partículas y diámetros medios De Sauter y/o De Brouker

La distribución de tamaño de partículas y los diámetros $D [4,3]$ (De Broucker) y/o $D [3,2]$ (De Sauter) de las distintas emulsiones O/W se determinaron mediante la técnica de dispersión estática de luz, también conocida como técnica de difracción láser. Las determinaciones se realizaron en un analizador de partículas Malvern Mastersizer 2000E con un sistema de dispersión Hydro 2000MU (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido) y un láser He-Ne (633 nm), en un rango de medición entre 0,1 y 1000 μm (**Figura 2.1**). Esta técnica mide las distribuciones de tamaño de partículas a partir de la variación angular de la intensidad de la luz dispersada cuando un rayo láser pasa a través de una muestra con partículas dispersas. Las partículas dispersan la luz en

todas las direcciones con un patrón de intensidad, el cual es dependiente de su tamaño. En general, el ángulo de dispersión se relaciona inversamente con el tamaño de partícula. La luz dispersada en distintos ángulos por las partículas de diferentes tamaños pasa por un sistema óptico complejo e incide posteriormente sobre los detectores, obteniéndose un patrón angular de luz dispersada. El “software” incorporado al equipo permite traducir este patrón con la correspondiente distribución de tamaño de partículas (McClements, 1999). Este cálculo requiere el conocimiento del índice de refracción tanto de las partículas como del líquido circundante a la longitud de onda del láser utilizado.

Las mediciones se realizaron por duplicado, colocando alícuotas de cada emulsión O/W en la unidad de dispersión con agua destilada hasta alcanzar el grado de oscurecimiento adecuado (10-20 %). La velocidad de la bomba fue de 2000 rpm y se utilizaron 1,33 y 1,47 como índice de refracción de la fase continua y dispersa, respectivamente.



Figura 2.1. Analizador de tamaño de partículas Malvern Mastersizer (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido)

2.4.2. pH y ζ -potencial

El pH fue medido con un pH-metro (Hanna Instrument, Woonsocket, EEUU), sobre mezclas de cada emulsión y agua destilada en una proporción 1:1 bajo agitación constante y a temperatura ambiente.

El potencial zeta (ζ -potencial) fue determinado mediante un equipo Analizador de Potencial Zeta (Brookhaven 90Plus/Bi-MAS, EEUU) en la función de movilidad electroforética a temperatura ambiente (**Figura 2.2**). La dispersión de luz electroforética (ELS, “Electrophoretic Light Scattering”) es una técnica empleada para medir la movilidad electroforética de las partículas en dispersión o

moléculas en solución. El principio físico fundamental es el de la electroforesis. Se introduce una dispersión en una celda que contiene dos electrodos y se aplica un campo eléctrico a los electrodos. Las partículas o moléculas que tienen una carga neta, o más estrictamente un ζ -potencial neto, migrarán hacia el electrodo con carga opuesta con una velocidad, conocida como movilidad, que está relacionada con su ζ -potencial (Hunter, 1986).

Para cada determinación 0,05 g de emulsión se dispersaron en 100 mL de agua mili-Q antes de cada medición. El rango de ζ -potencial se estableció a partir de -100 a +50 mV y la movilidad electroforética (μ) se convirtió en valores de ζ -potencial utilizando la ecuación de Smoluchowski (**Ec. 2.1.**).

$$\zeta\text{-potencial} = \frac{\eta\mu}{\varepsilon} \quad \text{Ec. 2.1.}$$

donde, η es la viscosidad del fluido y ε la constante dieléctrica.

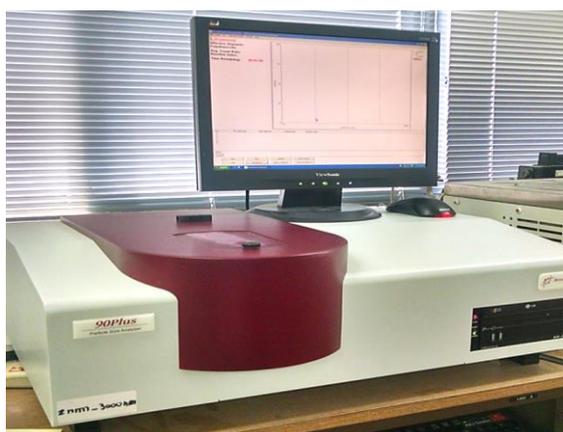


Figura 2.2. Analizador de Potencial Zeta (Brookhaven 90Plus/Bi-MAS, EEUU)

2.4.3. Propiedades reológicas

Las medidas reológicas se llevaron a cabo en un reómetro oscilatorio de esfuerzo controlado Haake RS600 (ThermoElectron, Alemania) (**Figura 2.3**). Las muestras fueron evaluadas a una temperatura constante de $25 \pm 0,3$ °C estabilizada mediante un baño termostático adaptado al equipo. El comportamiento de flujo en estado estacionario (viscosidad η versus esfuerzo de deformación τ) se determinó utilizando un sistema sensor de platos paralelos rugosos (35 mm de diámetro) con una separación entre platos (“gap”) de 1,0 mm. Las muestras se dejaron reposar durante 180 s en la posición de medida antes de cada ensayo y seguidamente se

sometieron a aumentos de la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) de 1 a 500 s⁻¹ durante 120 s. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Los datos experimentales se ajustaron al modelo de la Ley de la Potencia según la ecuación **Ec. 2.2**:

$$\tau = \kappa * (\dot{\gamma})^n \quad \text{Ec. 2.2.}$$

donde τ es el esfuerzo de corte o de deformación, $\dot{\gamma}$ la velocidad de deformación y los parámetros κ y n se refieren al índice de comportamiento de flujo y el índice de consistencia, respectivamente.



Figura 2.3. Reómetro oscilatorio Haake RS600 de esfuerzo controlado (ThermoElectron, Alemania)

2.4.4. Estabilidad global

La estabilidad global de las emulsiones O/W se determinó a través de medidas de dispersión de luz en un analizador óptico vertical Quickscan (Beckman Coulter, Fullerton, EEUU) el cual posee una cabeza lectora compuesta por una fuente de luz IR-cercano ($\lambda = 850$ nm) y dos detectores sincrónicos (**Figura 2.4**). Este equipo permite analizar la estabilidad de sistemas coloidales y dispersiones concentradas mediante la medición de la transmitancia (“Transmission”, T) y la luz dispersada (“Back Scattering”, BS) de un sistema opaco atravesado por un pulso de luz a lo largo del tubo de medida. El detector de “Transmission” recibe la luz que atraviesa la muestra (con un ángulo de 0°), mientras que el detector de “Back Scattering” recibe la luz dispersada por la misma (a 135°). La cabeza lectora móvil

del Quickscan realiza un barrido a lo largo de toda la altura del tubo de muestra (aproximadamente 65 mm), adquiriendo los datos de “Back Scattering” o luz dispersada cada 40 μm. De esta manera, es posible obtener curvas con los porcentajes de luz dispersada (%BS) en función de la altura de la muestra (en mm). A partir de la observación de los cambios que presentan los perfiles de BS en función del tiempo de almacenamiento es posible identificar los mecanismos de desestabilización que tiene lugar en una emulsión. El principio de medición del analizador óptico vertical de barrido ha sido exhaustivamente estudiado por Mengual y col. (1999). Los perfiles de BS registrados a distintos tiempos de almacenamiento de cada muestra se analizaron y se determinó la diferencia del índice de cremado (ΔCI) de acuerdo con la **Ec. 2.3 y 2.4**:

$$\Delta CI (\%) = CI_t - CI_0 \quad \text{Ec. 2.3.}$$

donde CI_t es el índice de formación de la fase crema a diferentes tiempos de almacenamiento ($t = 10, 20$ y 30 d) y CI_0 es el índice de formación de la fase crema en el momento inicial,

$$CI (\%) = (H / H_0) * 100 \quad \text{Ec. 2.4.}$$

H es la altura de la capa de suero formado en el fondo de tubos de vidrio, H_0 representa la altura inicial de la emulsión.



Figura 2.4. Analizador vertical de barrido Quickscan (Beckman Coulter, Fullerton, EEUU)

2.4.5. Oxidación de lípidos en emulsiones O/W

2.4.5.1. Determinación de productos primarios de oxidación (PV)

Los productos de primarios de oxidación se determinaron a través de la cuantificación de los hidroperóxidos lipídicos (PV, "peroxide value") por detección colorimétrica de tiocianato férrico (Shantha y Decker, 1994). Este ensayo permite determinar espectrofotométricamente la capacidad de los hidroperóxidos lipídicos (ROOH) para oxidar los iones ferrosos (Fe^{2+}) a iones férricos (Fe^{3+}) en un medio ácido y la consecuente formación de complejos de hierro y tiocianato (SCN^-). El tiocianato férrico que se forma es un complejo rojo-violeta que muestra una fuerte absorción a 510 nm. Los hidroperóxidos se extrajeron mezclando 0,3 mL de emulsión con 1,5 mL de la mezcla iso-octano/iso-propanol (3:1) agitando con vórtex tres veces durante 15 s cada vez, seguido por centrifugación a 3400 g durante 2 min. A 0,2 mL de la fase orgánica obtenida se le añadieron 2,8 mL de la mezcla metanol/butanol (2:1) seguido de 30 μL de una solución de tiocianato ferroso ($-\text{SCN}/\text{Fe}^{2+}$, reactivo de ensayo). Cabe señalar que el reactivo se prepara el mismo día del ensayo, mediante la mezcla de volúmenes iguales de 0,144 M FeSO_4 y 0,132 M BaCl_2 , centrifugación durante 3 min y luego se mezclaron volúmenes iguales de la solución ferrosa y tiocianato de amonio (NH_4SCN 3,94 M) en tubos de ensayo cubiertos para evitar exposición a la luz. Luego de 20 min de incubación de la fase orgánica con los reactivos incorporados se midió la absorbancia a 510 nm. El índice de hidroperóxidos (PV) se determinó a partir de una curva de calibración utilizando hidroperóxido de cumeno, y se expresó en términos de meq de hidroperóxido/kg de aceite.

2.4.5.2. Determinación de productos secundarios de oxidación (*p*-AV)

La determinación de productos secundarios de oxidación se realizó mediante el ensayo de *p*-anisidina (*p*-AV) adaptado a emulsiones (adaptación del Método N°2.504 de la IUPAC) (Buck y Lindner, 1994). El método permite determinar el contenido de aldehídos (principalmente 2-alquenoales y 2,4-alcadienal) generados a partir de la descomposición de los hidroperóxidos. Se basa en la reacción de color de la *p*-metoxianilina (*p*-anisidina) y los compuestos aldehídicos. La reacción del reactivo de *p*-anisidina con aldehídos en condiciones ácidas proporciona productos amarillentos que absorben a 350 nm. El color se

cuantifica y se convierte en *p*-AV. Se evaluaron las emulsiones O/W y se expresaron los resultados en términos de *p*-AV. Una alícuota de 1 mL de emulsión se añadió a un tubo falcon de 25 mL y se completó hasta la marca con iso-octano. Los tubos se agitaron en vórtex dos veces durante 20 s cada vez. Después de centrifugación durante 10 min a 5000 rpm, se midió la absorbancia (A_1) de las muestras a 350 nm frente a un blanco de iso-octano puro. Alícuotas de 5 mL de la solución restante de la centrifugación, se transfirieron a tubos de ensayo de 10 mL y se añadió 1 ml de solución de *p*-anisidina (solución al 0,25% p/v en ácido acético glacial). Después de su agitación con vórtex 10 s y de reposo durante 10 min, se midió su absorbancia (A_2) a 350 nm frente a un blanco de iso-octano con *p*-anisidina. El valor *p*-AV se obtuvo a partir de la siguiente ecuación **Ec. 2.5**.

$$p\text{-AV} = 25 (1,2 * A_2 - A_1) / m \quad \text{Ec. 2.5.}$$

donde *m* es la masa de la muestra.

2.5. Análisis estadístico

Los resultados experimentales se analizaron por análisis de varianza (ANOVA) ($p \leq 0,05$) utilizando el programa Statgraphics Centurion XV.II para el “software” de Windows (StatPoint Technologies, Warrenton, VA, EEUU). Comparaciones múltiples entre medias se llevaron a cabo mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$). La distribución normal de las variables y la varianza de verificación se realizaron mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la prueba de Cochran, respectivamente.

3. Resultados y Discusión

Las características iniciales del aceite de chía del presente estudio pueden observarse en la **Tabla 2.3**. Estos resultados fueron similares a los informados por otros autores (Ayerza, 1995; Ixtaina y col., 2011).

Tabla 2.3. Características fisicoquímicas iniciales del aceite de chía

Ácidos grasos (%)	
C _{16:0}	8,5 ± 0,9
C _{18:0}	2,0 ± 0,6
C _{18:1}	5,2 ± 0,6
C _{18:2}	19,0 ± 0,6
C _{18:3}	65,4 ± 1,4
Índice de Iodo (g I ₂ /100 g aceite)	213,0 ± 3,4
Índice de saponificación (mg KOH/g aceite)	193,5 ± 0,1
Ácidos grasos libres (g ácido oleico/100 g aceite)	0,6 ± 0,1
Tocoferoles (mg/kg aceite)	
Totales	443 ± 4
α-	6 ± 1
γ-	415 ± 5
δ-	22 ± 1
Índice de peróxidos (meq peróxido/kg aceite)	2,0 ± 0,1

Valores medios (n=2) ± desviación estándar

3.1. Caracterización de emulsiones O/W con aceite de chía. Influencia de la concentración de caseinato de sodio, agregado de lactosa y de las variables operativas del proceso de homogeneización

Los resultados del ANOVA multifactorial correspondientes al diseño factorial completo 3x2x2 se presentan en la **Tabla 2.4**. Como puede observarse, la concentración de caseinato de sodio fue el principal factor que tuvo influencia sobre la mayoría de las propiedades fisicoquímicas estudiadas -excepto en el valor de *p*-AV- seguido de la presión de homogeneización y en menor extensión, la adición de lactosa.

Tabla 2.4 Análisis multifactorial de varianza (ANOVA) del diseño factorial (3x2x2) correspondiente a las propiedades fisicoquímicas de emulsiones O/W con aceite de chía

Factor	GL	Suma de cuadrados							
		D [4,3]	ζ-potencial	n	K	η ₁₀₀	BS _{av0}	PV	p-AV
Conc. CS (A)	2	0,0589***	690,2460***	0,3080***	1,1089***	0,0956***	184,6960***	6,1805***	0,0024
Adición L (B)	1	0,0062*	403,6780***	0,0199***	0,4026***	0,0287***	20,7018***	0,0469	0,0013
Presión H.(C)	1	0,0792***	225,3120***	0,0003	0,1145***	0,0024***	4,4462	0,0826	0,0009
AxB	2	0,0023	50,4981*	0,0086***	0,7333***	0,0510***	5,2344	0,0592	0,0010
AxC	2	0,0048	166,1050***	0,0104***	0,2157***	0,0047***	18,3983**	0,0752	0,0004
BxC	1	0,0023	0,8568	0,0126***	0,1243***	0,0027***	0,0301	0,0886	0,0006
AxBxC	2	0,0017	42,4508*	0,0058***	0,2293***	0,0051***	3,9491	0,0056	0,0036
Error puro	12	0,0104	269,5150	0,0061	0,0034	0,0003	11,7076	0,7303	0,0070
Total	23	0,1659	1848,6617	0,3715	2,9320	0,1904	249,1635	7,2688	0,0172

A Concentración de CS; B Adición de L; C Presión de homogeneización; GL Grados de libertad

D [4,3] diámetro medio de las gotas de aceite (µm); n índice de comportamiento de flujo; K coeficiente de consistencia (Pa.sⁿ); η₁₀₀ viscosidad aparente a 100s⁻¹; BS_{av0} valor promedio de “Back Scattering” inicial (%); PV Valor de peróxido (hidroperóxido meq/kg de aceite); p-AV Valor de p-anisidina

* p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01 y *** p ≤ 0,001

3.1.1. Distribución de tamaño de partículas y diámetros medios

Las características de gota de las emulsiones alimentarias tales como su tamaño y carga son algunos de los parámetros claves que influyen las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de las mismas (McClements, 2010).

Las distribuciones del tamaño de partículas (DTP) de las diferentes emulsiones O/W estudiadas se presentan en la **Figura 2.5**. Como puede observarse, todos los sistemas estudiados exhibieron DTP monomodales, con un leve desplazamiento de la curva hacia tamaños de partículas mayores en el caso de las emulsiones O/W con 10% p/p de caseinato de sodio, así como en sistemas obtenidos con el menor nivel de presión operativa.

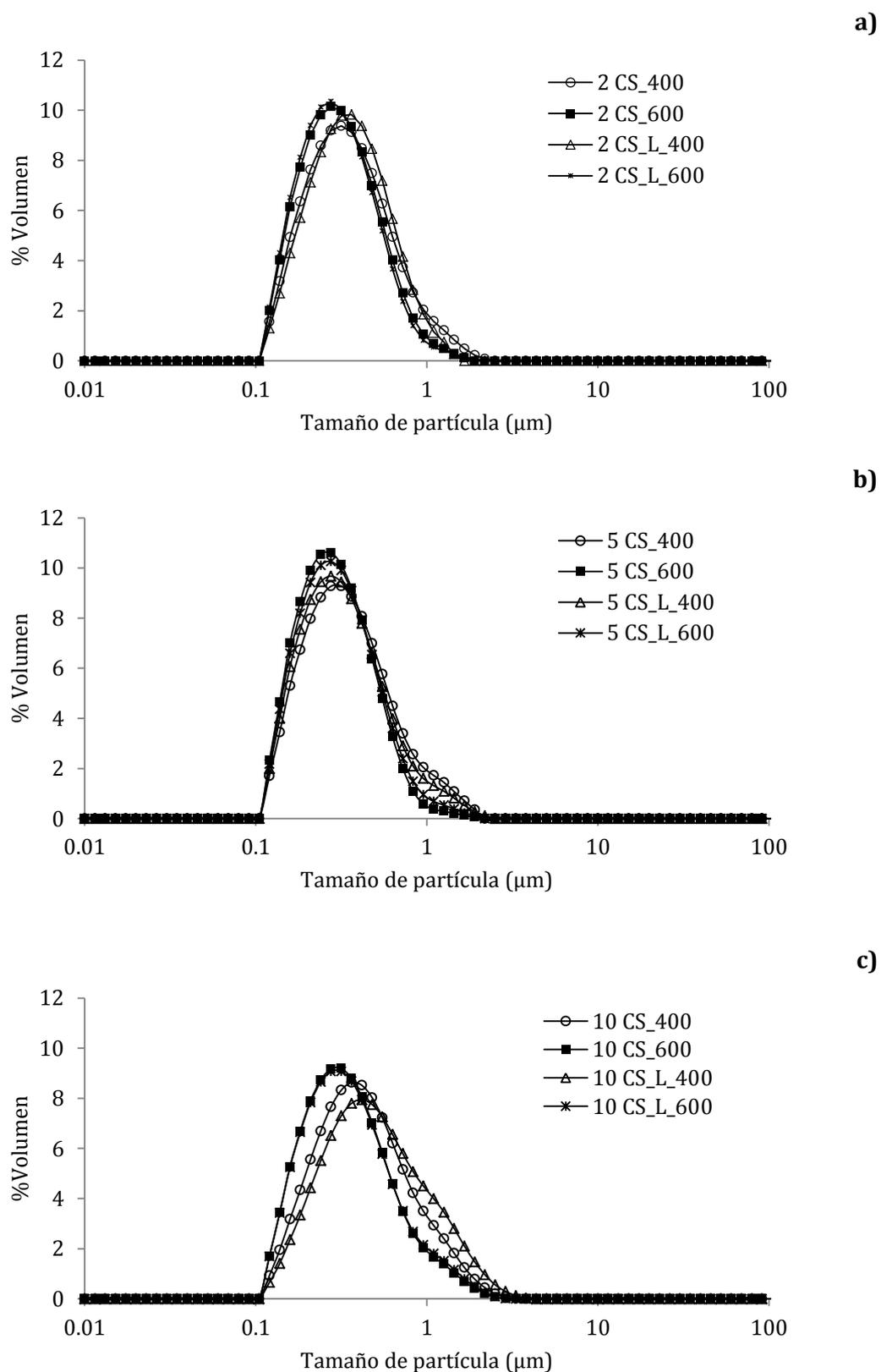


Figura 2.5 Distribución de tamaño de partículas (% Volumen) de emulsiones O/W con aceite de chía y diferentes concentraciones de caseinato de sodio **a)** 2% **b)** 5% y **c)** 10% p/p en presencia o ausencia de 10% p/p de lactosa, homogeneizadas a dos niveles de presión (400 y 600bar). Valores medios (n=2)

En la **Figura 2.6** se presentan los diámetros de partícula promedio $D [4,3]$ correspondientes a las emulsiones O/W estudiadas. A tiempo inicial, tanto la presión de homogeneización como la concentración de caseinato de sodio empleada registraron una influencia significativa ($p \leq 0,001$) sobre este parámetro mientras que la adición de lactosa fue relevante, pero en menor medida ($p \leq 0,05$). No se registraron interacciones entre los factores estudiados (**ver Tabla 2.4**).

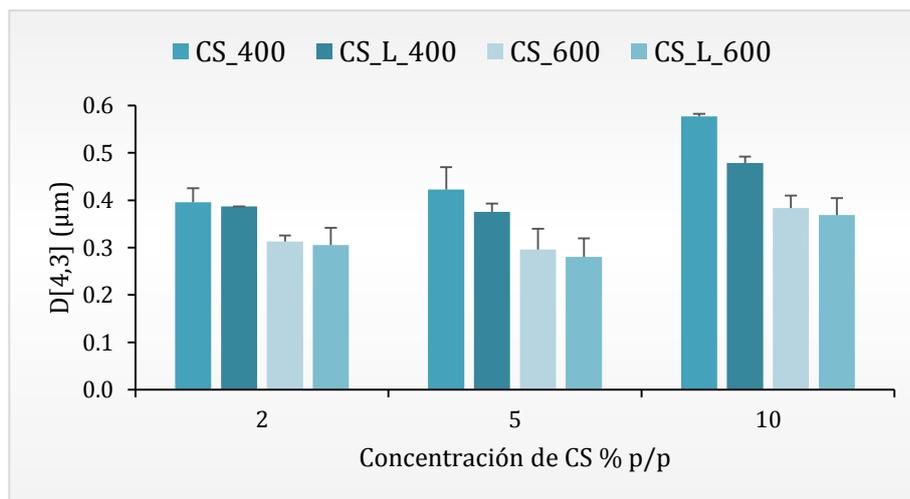


Figura 2.6 Diámetro medio De Brouker ($D [4,3]$) correspondiente a emulsiones O/W con aceite de chía, diferentes concentraciones de caseinato de sodio (2, 5 y 10 % p/p), en presencia o ausencia de lactosa (10% p/p) homogeneizadas a dos niveles de presión (400 y 600 bar). Valores medios ($n=2$)

Asimismo, concentraciones constantes de agente emulsificante, evidenciaron una reducción ($p \leq 0,05$) en el tamaño de partícula obtenido cuando la presión de homogeneización se incrementó de 400 a 600 bar. Esta tendencia es concordante con lo informado por McClements (2004), quien expresa que el tamaño de partícula de emulsiones O/W, estabilizadas con un exceso de agente emulsificante, depende principalmente de la energía de homogeneización empleada. Resultados similares fueron alcanzados por otros autores (Lethuaut y col., 2002; Atarés y col., 2012; Horn y col., 2012; O'Dwyer y col., 2013). En cuanto a la incidencia de la concentración de agente emulsificante, no se encontraron diferencias significativas en el tamaño de partícula cuando las emulsiones se prepararon con 2 y 5% p/p de caseinato de sodio. Sin embargo, un aumento ($p \leq 0,05$) en el diámetro medio de las partículas fue registrado cuando la concentración de emulsificante se incrementó

hasta el 10% p/p. Este hecho puede deberse al aumento de la viscosidad de estos sistemas, lo cual puede suprimir la formación de movimientos contracorrientes responsables de la ruptura de las gotas de aceite durante el proceso de homogeneización (McClements y Weiss, 2005; Qian y McClements, 2011). Además, se encontró una correlación positiva ($r=0,47$; $p=0,0204$) entre los valores de $D_{[4,3]}$ y la viscosidad aparente de las emulsiones estudiadas. Por otra parte, la adición de lactosa provocó una reducción en el tamaño de partícula de los sistemas.

Los tamaños de partícula de las emulsiones analizadas no presentaron variaciones significativas ($p>0,05$) durante el tiempo de almacenamiento estudiado.

3.1.2. pH y ζ -potencial

El pH de las emulsiones O/W con aceite de chía fue $6,5\pm 0,2$ y sus gotas presentaron carga negativa con valores entre -35 y -54 mV (**Figura 2.7**). Dicha carga neta negativa puede ser debida a los grupos ionizados presentes en la molécula de caseinato de sodio que rodea las gotas de aceite cuando el pH es superior al punto isoeléctrico (pI) de la proteína (Hu y col., 2003).

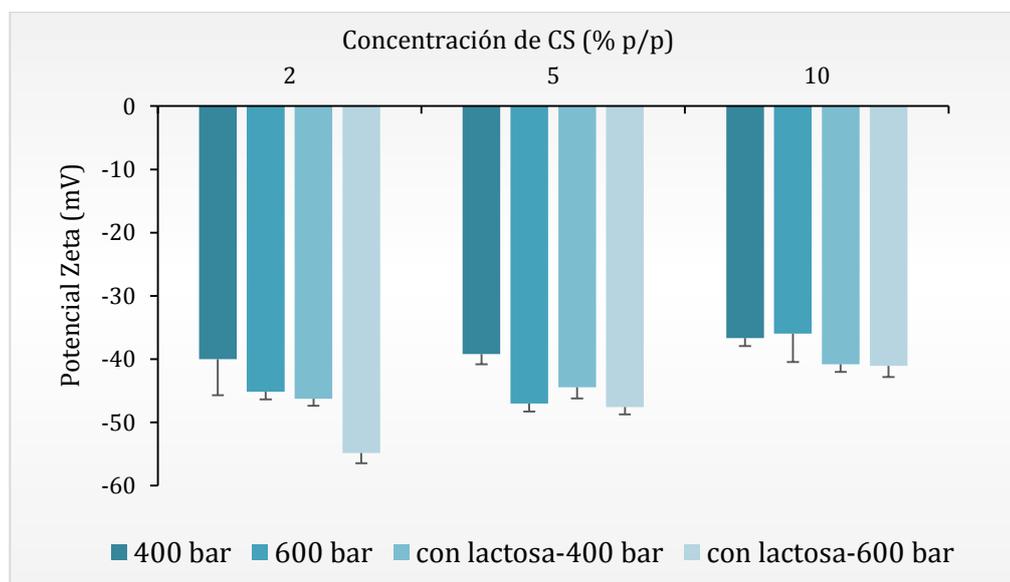


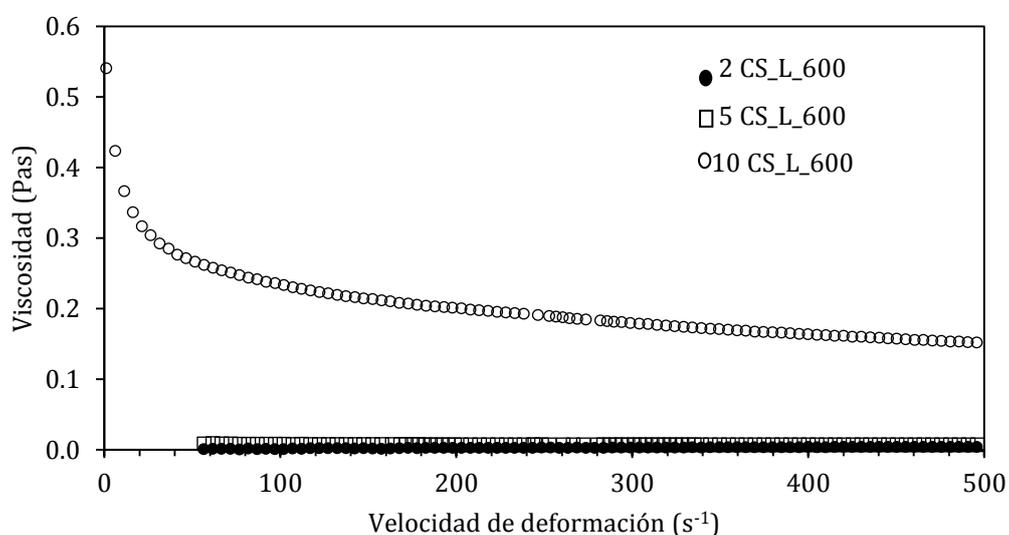
Figura 2.7. ζ -potencial de emulsiones O/W con aceite de chía, diferentes formulaciones y condiciones operativas. Valores medios ($n=2$)

La concentración de caseinato de sodio (A), la adición de lactosa (B) y la presión de homogeneización (C) tuvieron un efecto significativo ($p \leq 0,05$) sobre el ζ -potencial, en ese orden relativo de importancia. Las interacciones de segundo (AxB y AxC) y tercer orden entre los factores estudiados también fueron positivas (**Tabla 2.4**). Adicionalmente, se encontró una correlación positiva ($r=0,46$; $p=0,0226$) entre el ζ -potencial y el diámetro D [4,3] posiblemente relacionada con la cantidad de proteína adsorbida en la interfase. En este sentido, emulsiones con tamaños de gota pequeños y mayor área superficial presentaron una mayor cantidad de proteína en la interfase, mientras que las gotas de mayor tamaño y menor área superficial tuvieron asociado un mayor contenido de proteína no-adsorbida en la fase acuosa. Este hecho podría relacionarse con asociaciones electrostáticas entre las cadenas de polipéptidos con la consecuente supresión de cargas.

3.1.3. Propiedades reológicas

Los resultados correspondientes a las curvas de flujo para los diferentes sistemas estudiados se ajustaron a la ecuación del modelo de la ley de la Potencia (coeficientes de correlación (R^2) > 0,99) y se calcularon los valores de viscosidad aparente a una velocidad de cizallamiento de 100 s^{-1} (η_{100}) (ver **Tabla 2.5**). Este parámetro fue evaluado a esta velocidad de cizallamiento, debido a que es típico de procesos de la industria alimentaria, tales como el flujo a través de cañerías, agitación y masticación (McClements, 2005).

a)



b)

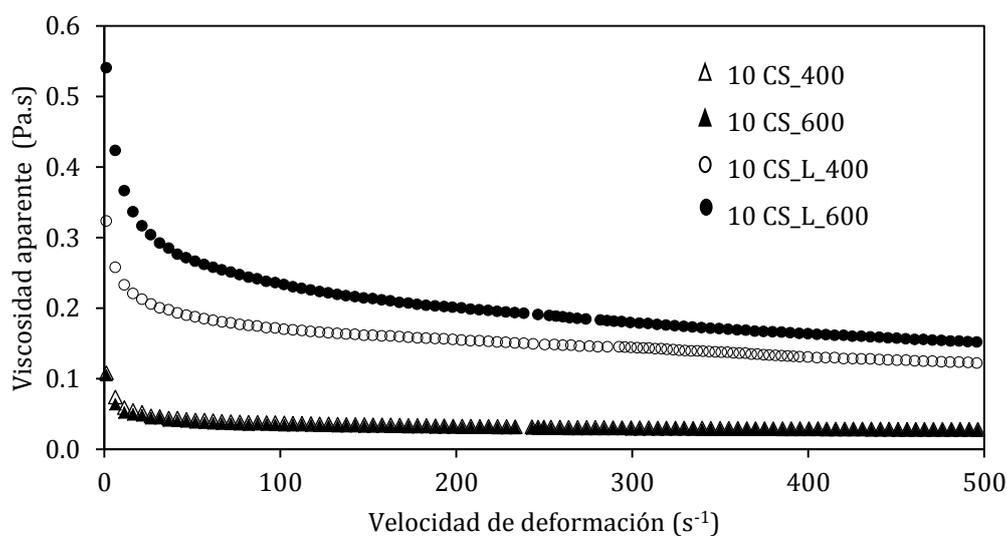


Figura 2.8. Efecto de diferentes formulaciones y presión de homogeneización sobre las propiedades reológicas de las emulsiones O/W con aceite de chía. Curvas de flujo correspondientes emulsiones estabilizadas con **a)** 2, 5 y 10% p/p de CS, **b)** 10% p/p de CS con y sin lactosa, homogeneizadas a 400 y 600 bar

La concentración de caseinato de sodio y la adición de lactosa tuvieron una influencia muy significativa sobre las propiedades reológicas de las emulsiones O/W con aceite de chía, mientras que el nivel de presión homogeneización afectó en menor medida a K y η_{100} . Las interacciones de segundo y tercer nivel fueron significativas para todos los parámetros reológicos y factores estudiados (ver **Tabla 2.4**). En general, se observó un incremento de la viscosidad y cambios en el comportamiento de flujo en función de la concentración creciente del agente emulsificante (**Figura 2.8.a**, **Tabla 2.5**). Este hecho puede atribuirse a un aumento en el contenido de sólidos debido a un mayor contenido de caseinato de sodio no-adsorbido en la fase acuosa, lo que se traduce en una mayor resistencia a flujo y, por lo tanto, la viscosidad del sistema promueve la formación de una estructura inter-gotas. Por otra parte, la adición de lactosa produjo un aumento de la viscosidad principalmente en emulsiones O/W con 10% p/p de caseinato de sodio como puede visualizarse en la **Figura 2.8.b**.

Tabla 2.5. Parámetros reológicos (n , índice de comportamiento de flujo; K , coeficiente de consistencia) obtenidos a partir de la ley de la Potencia y viscosidad aparente $100s^{-1}$ (η_{100}) de emulsiones O/W con aceite de chía a $25\pm 0,3$ °C

Muestra	n	K (Pa.s ⁿ)	η_{100} (Pa.s) * 10^{-3}
2 CS_400	$1,01 \pm 0,01^{cd}$	$0,003 \pm 0,001^a$	$2,8 \pm 0,2^a$
2 CS_600	$1,01 \pm 0,02^{cd}$	$0,002 \pm 0,001^a$	$2,6 \pm 0,1^a$
2 CS_L_400	$1,01 \pm 0,01^{cd}$	$0,003 \pm 0,000^a$	$3,3 \pm 0,2^a$
2 CS_L_600	$1,0 \pm 0,01^c$	$0,003 \pm 0,001^a$	$3,3 \pm 0,4^a$
5 CS_400	$0,99 \pm 0,04^c$	$0,006 \pm 0,002^a$	$5,5 \pm 0,9^a$
5 CS_600	$1,07 \pm 0,01^d$	$0,004 \pm 0,000^a$	$5,0 \pm 0,7^a$
5 CS_L_400	$0,97 \pm 0,01^c$	$0,009 \pm 0,001^a$	$7,7 \pm 0,2^a$
5 CS_L_600	$0,96 \pm 0,01^c$	$0,008 \pm 0,000^a$	$6,8 \pm 0,3^a$
10 CS_400	$0,82 \pm 0,01^b$	$0,085 \pm 0,01^b$	$37,0 \pm 3,3^b$
10 CS_600	$0,84 \pm 0,02^b$	$0,073 \pm 0,01^b$	$34,6 \pm 2,3^b$
10 CS_L_400	$0,81 \pm 0,0^b$	$0,375 \pm 0,021^c$	$156,3 \pm 8,8^c$
10 CS_L_600	$0,69 \pm 0,01^a$	$1,095 \pm 0,049^d$	$262,7 \pm 11,8^d$

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en la misma columna

CS: caseinato de sodio

Los sistemas con 2 y 5% p/p de caseinato de sodio registraron viscosidades bajas (2,6–7,7 Pa.s) y se comportaron como fluidos newtonianos, probablemente debido al menor contenido de proteína no-adsorbida en la fase acuosa. Las emulsiones con 10% p/p de proteínas presentaron viscosidades mayores, la cual a su vez aumentó significativamente ($p \leq 0,05$) con la adición de lactosa en la fase acuosa. Estos sistemas presentaron diferentes grados de pseudoplasticidad debido a la formación gradual de una estructura transitoria, lo cual podría estar relacionado con el incremento del nivel de proteína no-adsorbida (**Figura 2.8.b** y **Tabla 2.5**). La pseudoplasticidad de las emulsiones O/W con 10% p/p de caseinato de sodio podría asociarse a la ruptura mecánica de la estructura red (fase acuosa atrapada dentro de la estructura inter-gota) al ser aplicadas grandes tensiones. Estos resultados son coincidentes con lo señalado por Dickinson y col. (1997) y Huck-Iriart y col. (2011); para emulsiones estabilizadas con caseinato de sodio. Dichas emulsiones evidenciaron una alta dependencia sobre la concentración de proteínas, con un comportamiento newtoniano en los sistemas

con baja concentración de proteína libre y pseudoplasticidad, en sistemas con un alto contenido de caseinato de sodio.

3.1.4. Estabilidad global

La estabilidad global de las distintas emulsiones ensayadas fue evaluada mediante la evolución de sus perfiles de “Back Scattering” (BS) durante el tiempo de almacenamiento (**Figura 2.9**). Las emulsiones formuladas con 2 y 10% p/p de caseinato de sodio registraron una alta estabilidad global, manteniendo sus perfiles de BS sin cambios importantes durante el periodo estudiado. En contraste, las emulsiones con 5% p/p de caseinato de sodio presentaron una baja estabilidad global, observándose desestabilización por cremado inmediatamente después de su preparación. Los valores medios de BS inicial a lo largo de la celda (BS_{av0} , $BS_{t=0}$) fueron 68,77, 61,78 y 64,68% para los sistemas con 2, 5 y 10% p/p de caseinato de sodio, respectivamente. Teniendo en cuenta que el BS es un parámetro directamente relacionado con el tamaño de partícula de una emulsión (Álvarez Cerimedo y col., 2010), estos valores fueron consistentes con los de $D [4, 3]$ a excepción de emulsiones con 5% p/p de agente emulsificante. En este último caso se observó una disminución del BS_{av0} la cual podría estar vinculada con la formación de agregados.

El análisis estadístico de los resultados experimentales obtenidos evidenció una influencia significativa ($p \leq 0,05$) de la concentración de caseinato de sodio y la adición de lactosa, así como una interacción de segundo nivel entre la concentración de caseinato de sodio y la presión de homogeneización sobre la estabilidad global de las emulsiones (**Tabla 2.4**). Así, cuando las emulsiones fueron estabilizadas con 2% p/p de proteína, se registraron ligeros signos de desestabilización debido a la formación de una fase crema con la consecuente disminución del %BS en la parte inferior del tubo y el simultáneo aumento del %BS en la parte superior, por migración de gotas de aceite a la zona superior (**Figura 2.9.a**). Si bien estos sistemas registraron tamaños de partículas menores a las emulsiones con 10% p/p de caseinato de sodio, estas características no lograron evitar ligeros cambios en los perfiles de BS los que podrían estar asociados con el inicio del proceso de cremado.

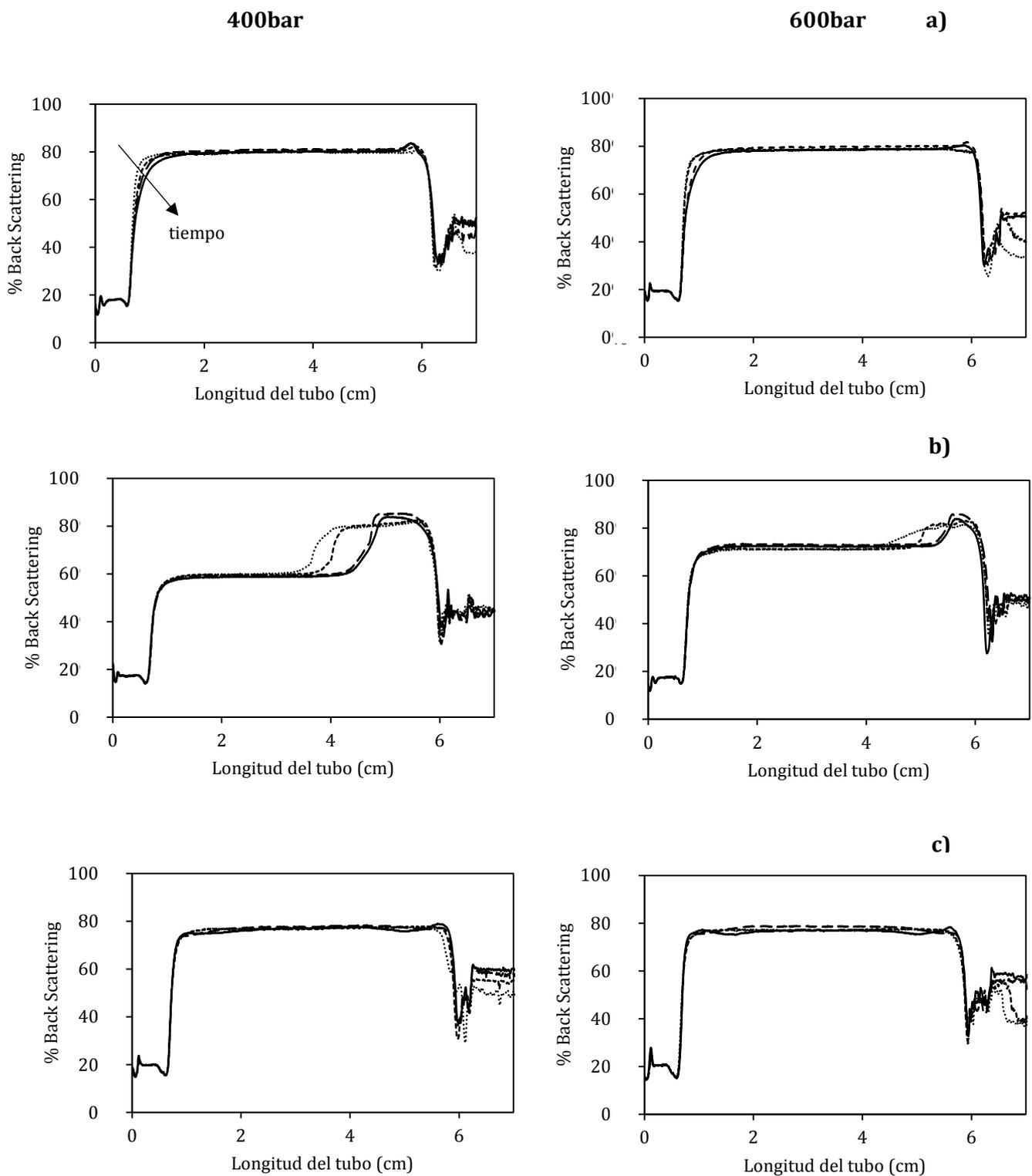


Figura 2.9. Perfiles de “Back Scattering” (%BS vs. longitud del tubo) correspondientes a emulsiones O/W con aceite de chía **a)** 2 **b)** 5 y **c)** 10% p/p de caseinato de sodio en función del tiempo (.....) 20h, (- - -) 7, (— —) 20 y (—) 30 d a dos niveles de presión de homogeneización (400 y 600 bar). Valores medios (n=2)

Las emulsiones estabilizadas con un 5% p/p de caseinato de sodio exhibieron desestabilización a partir de una combinación de los mecanismos, floculación y cremado. En este caso, se observó una disminución del %BS en la parte inferior y la parte media del tubo de muestra debido a la formación de agregados con un mayor tamaño de partícula y un fuerte aumento de este parámetro en la zona superior correspondiente al cremado de estos agregados (**Figura 2.9.b**). El proceso de floculación por agotamiento o “*depletion flocculation*” fue probablemente causado por las partículas de biopolímero no adsorbidas en la fase acuosa, con lo cual la fuerza de atracción entre las gotas se incrementa hasta que finalmente logran ser lo suficientemente importante como para superar las interacciones repulsivas entre ellas y flocular (McClements, 2004). Por ello, el cremado de estas emulsiones fue rápido y marcado debido al mayor tamaño de estos agregados.

En el caso de las emulsiones con 10% p/p de caseinato de sodio, estos sistemas mantuvieron sus perfiles BS sin alteraciones, con una leve disminución del BS medio durante el almacenamiento lo que podría estar asociado con el inicio de una floculación lenta (**Figura 2.9.c**). El alto nivel de estabilidad global podría estar relacionada a una re-estabilización de la emulsión a partir de la formación de una estructura de red de partículas y a su alta viscosidad, lo que dificulta la migración de las gotas a la parte superior del tubo (Huck-Iriart y col., 2011). Tendencias similares fueron reportadas por Dickinson y col. (1997).

El análisis estadístico reveló que la concentración de caseinato de sodio fue el factor que presentó el mayor efecto ($p \leq 0,01$) sobre este índice relacionado con la estabilidad de las emulsiones (**Tabla 2.4**). La **Figura 2.10** muestra que la evolución del $\Delta IC\%$ de emulsiones estabilizadas con 5% p/p caseinato de sodio presentaron el mayor incremento de este parámetro en comparación con los otros sistemas. En contraste, las emulsiones con 10% p/p de caseinato de sodio se mantuvieron estables frente a los procesos de desestabilización durante el periodo estudiado ($p > 0,05$). Se encontró una correlación negativa ($p \leq 0,05$) entre $\Delta IC\%$ a diferentes tiempos de almacenamiento y la viscosidad (η_{100}) ($r = -0,43; -0,45; -0,56$ para $\Delta IC\%_{010d}$, $\Delta IC\%_{020d}$ y $\Delta IC\%_{030d}$, respectivamente). En este sentido, un incremento de la viscosidad promovió la disminución de la movilidad de las partículas, lo que resulta en una mejora de la estabilidad de la emulsión.

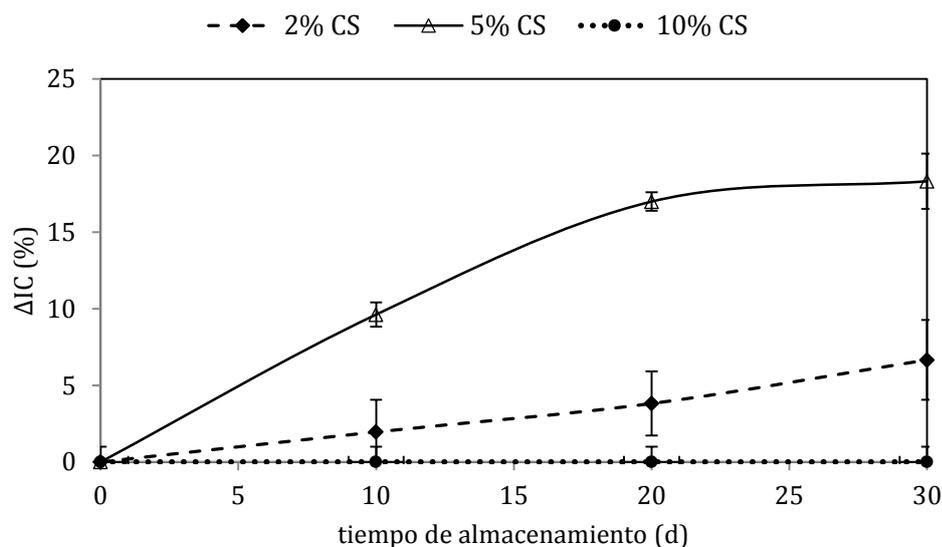


Figura 2.10. Evolución de la diferencia del índice de cremado ($\Delta IC\%$) correspondiente a las emulsiones O/W con aceite de chía en función del tiempo de almacenamiento

3.1.5. Oxidación de lípidos en emulsiones O/W

3.1.5.1. Productos primarios (PV) y secundarios (*p-AV*) de oxidación

En cuanto a la estabilidad oxidativa de las emulsiones O/W con aceite de chía, se registró un efecto significativo ($p \leq 0,05$) del contenido de caseinato de sodio sobre los valores de PV (**Tabla 2.4**). El nivel inicial de hidroperóxidos en las emulsiones fue bajo, lo que denota que el proceso de emulsificación no contribuyó a aumentar el contenido de estos productos primarios de oxidación. Los sistemas con 10% p/p de caseinato de sodio presentaron niveles de PV significativamente mayores ($p \leq 0,05$) que los otros, lo cual podría estar asociado a su tamaño de partícula (**Tabla 2.4**). Esta tendencia es coincidente con la correlación significativa ($r=0,58$; $p=0,0029$) encontrada entre D [4, 3] y PV. Cabe señalar que, en la literatura no existe una tendencia clara respecto a la oxidación de lípidos y su relación con los tamaños de partícula. Estudios previos denotan resultados similares a los de este trabajo, señalando que menores tamaños de partícula en emulsiones O/W con aceite de pescado reducen la oxidación de lípidos (Nakaya y col., 2005; Let y col., 2007). Sin embargo, otros autores indican un aumento del nivel de oxidación cuando el diámetro de partícula disminuye, explicando esta tendencia en términos de un aumento de la superficie de la partícula y una mayor posibilidad de ataques de agentes pro-oxidantes, tales como radicales libres o

iones metálicos (Atarés y col., 2012). La evolución de los valores de PV para las emulsiones O/W con diferente contenido de caseinato de sodio almacenadas a $4\pm 1^\circ\text{C}$ se puede observar en la **Figura 2.11**. Al final del almacenamiento, los valores de PV fueron 8,15; 4,50; 2,00 y 1,80 meq de hidroperóxidos/kg de aceite, para el aceite de chía y las emulsiones con 10, 2 y 5% p/p de caseinato de sodio, respectivamente. El aceite de chía almacenado en las mismas condiciones que las emulsiones alcanzó valores de PV significativamente mayores ($p\leq 0,05$) al de las emulsiones O/W durante la primera semana de almacenamiento refrigerado. Todos los sistemas exhibieron niveles inferiores de productos de oxidación primaria que el límite superior (10 meq de hidroperóxido/kg de aceite) establecido por el *Codex Alimentarius* (Comisión del *Codex Alimentarius*, 2012) para el consumo humano de aceites no contemplados en las normas estándar. En el caso de los productos secundarios de oxidación, no se registraron efectos significativos de los diferentes factores investigados en el diseño experimental, presentando bajos niveles en todos los casos ($p\text{-AV} < 1$). Estos resultados sugieren que las emulsiones podrían constituir un sistema adecuado, que contribuye a aumentar la estabilidad oxidativa de los aceites otorgando una protección adicional, como la presencia de una membrana interfacial que cubre las gotas de aceite, la interacción entre los ingredientes y la distribución de los ingredientes entre el aceite (O'Dwyer y col., 2013).

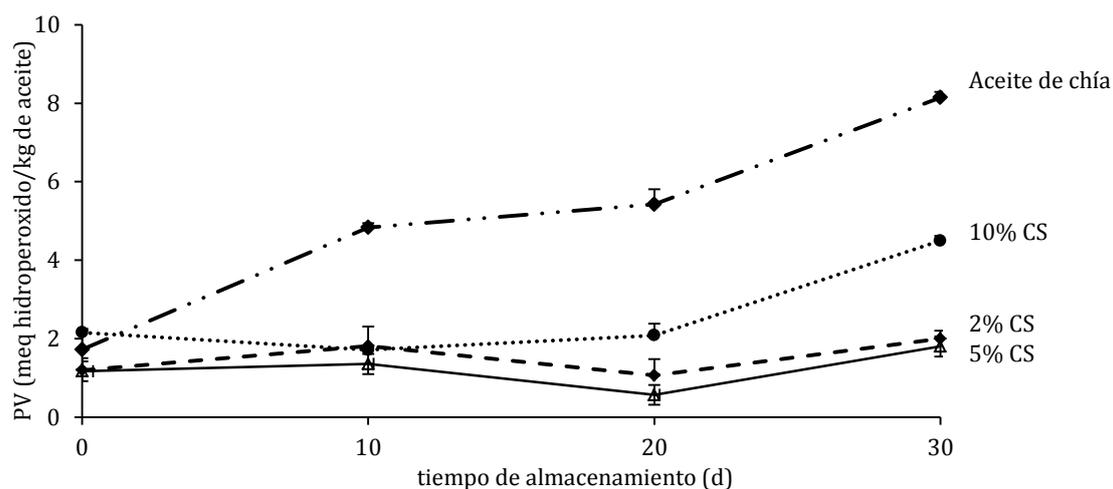


Figura 2.11. Valores PV correspondientes a aceite de chía y emulsiones O/W con diferente contenido de caseinato de sodio obtenidas a partir de homogeneización a 600 bar a distintos tiempos de almacenamiento

En virtud de los resultados obtenidos, seguidamente se continuaron las investigaciones mediante el estudio de emulsiones O/W con distintos subproductos de chía tales como proteínas y mucílago de chía con o sin la presencia de maltodextrina. A tal efecto, se llevó a cabo la respectiva obtención y caracterización de las mismas, según la metodología descrita previamente en las **secciones 2.2- 2.4**.

3.2. Caracterización de emulsiones O/W con subproductos de chía. Influencia de la composición de la fase acuosa

Tabla 2.6. Análisis multifactorial de varianza (ANOVA) del diseño factorial (3x2) correspondiente a las propiedades fisicoquímicas de emulsiones O/W con aceite de chía

Factor	Suma de cuadrados						
	GL	D [3,2]	ζ-potencial	n	K	η ₁₀₀	BS _{av0}
Proteína-Carbohidrato(A)	2	92,964**	129,536**	0,1229**	4,8320**	0,072**	350,069 **
Adición mucílago de chía (B)	1	1,748*	19,152*	0,0439**	4,9227**	0,0722**	10,566*
AxB	2	1,60*	0,467	0,0123**	2,8322**	0,0165**	4,0861
Error puro	6	0,165	1,715	0,0003	0,0145	0,0001	5,721
Total	11						

GL grados de libertad; D [3,2] diámetros medios de gotas de aceite (μm); ζ-potencial (mV), n índice de comportamiento del flujo; K coeficiente de consistencia (Pa.sⁿ); η₁₀₀ viscosidad aparente a 100 s⁻¹; BS_{av0} valor medio de “Back Scattering” inicial (%)

* p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01

3.2.1. Distribución de tamaño de partículas y diámetros medios

Las curvas de distribución de tamaño de partículas (DTP) de las emulsiones O/W conteniendo aceite de chía se muestran en la **Figura 2.12**. Puede observarse que las emulsiones estabilizadas con caseinato de sodio presentan curvas de DTP mono (CL) o bimodal (CM) (**Figura 2.12.a y b**). Sin embargo, las emulsiones preparadas usando una fracción rica en proteína de chía registraron curvas de DTP trimodales, más amplias que las anteriores desplazadas hacia tamaños de partículas más grandes (**Figura 2.12.c**). Además, en todos los casos, la adición de mucílago de chía evidenció DTP similares pero con un desplazamiento (< tamaños de partículas) especialmente notorio para sistemas con la fracción rica en proteínas de chía.

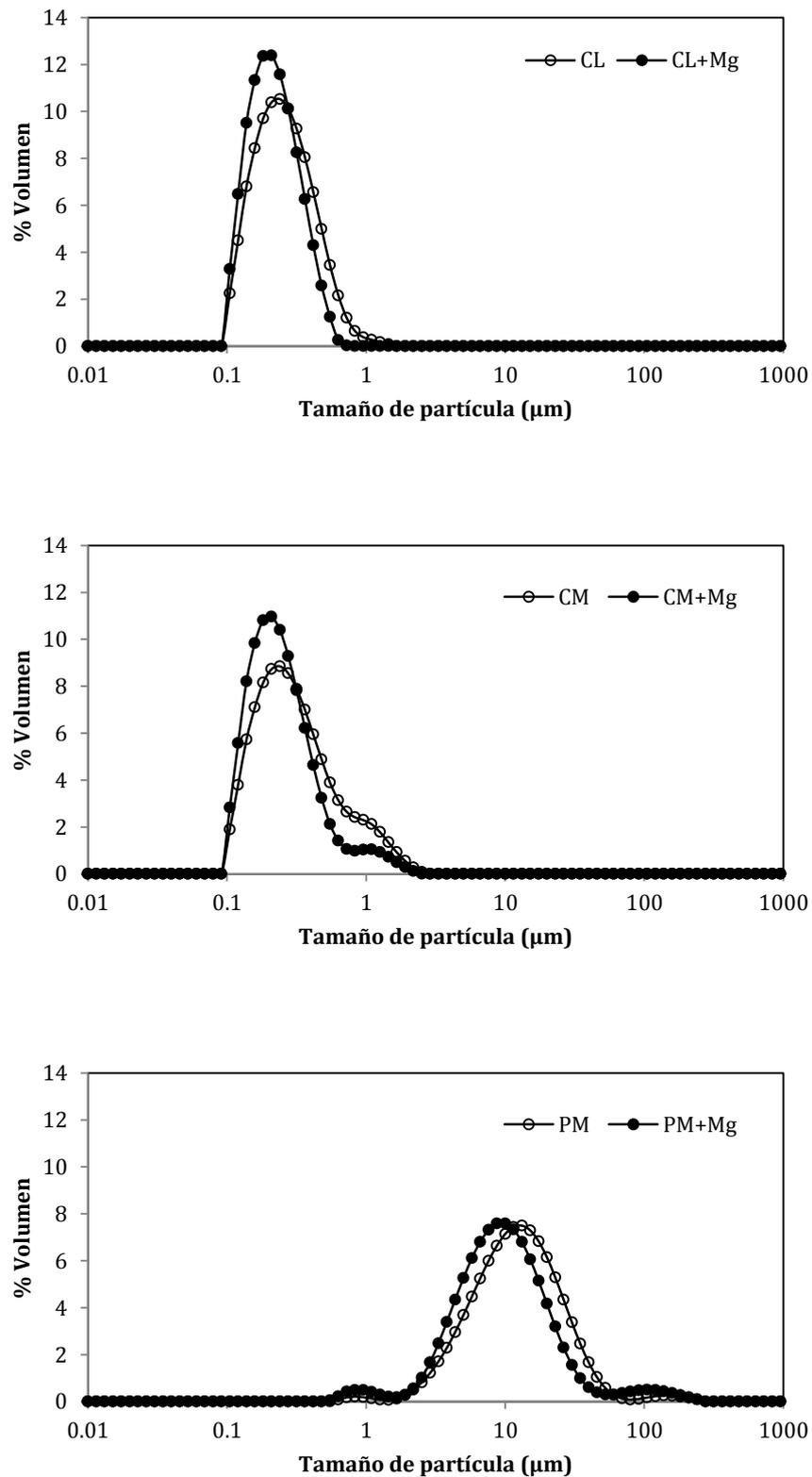


Figura 2.12. Efecto de diferentes combinaciones de proteínas-carbohidratos y adición de mucílago de chía en la distribución de tamaño de partículas (DTP) de emulsiones O/W con aceite de chía (t = 0 d). Valores medios (n = 2)

Los resultados del diámetro de Sauter ($D_{[3,2]}$) mostraron que la combinación proteína-carbohidrato tuvo un efecto muy significativo ($p \leq 0,01$) sobre el tamaño de partícula de las emulsiones O/W, así como la adición de mucílago de chía también afectó este parámetro, aunque en menor medida ($p \leq 0,05$). La interacción de ambos factores también fue significativa ($p \leq 0,05$) (**Tabla 2.6**). Como se puede observar, los sistemas con caseinato de sodio registraron tamaños de gota más pequeños ($p \leq 0,05$) y un grado menor de polidispersidad (Span) ($p \leq 0,05$) correspondiente al tiempo inicial y a 15 días de almacenamiento refrigerado que los obtenidos con una fracción rica en proteínas de chía. Inicialmente, los valores de $D_{[3,2]}$ de emulsiones con caseinato de sodio oscilaron entre 0,22 y 0,27 μm y los de Span entre 1,07 a 1,46, lo que denota el alto grado de uniformidad asociado a estos sistemas (**Tabla 2.7**). Por otra parte, las emulsiones con la fracción rica en proteínas de chía presentaron tamaños de partículas entre 7,44 a 9,86 μm y valores de Span entre 2,23 y 2,65 debido a la presencia de poblaciones de partículas más grandes (**Tabla 2.7**). Además, el tipo y concentración de agente emulsificante antes de la homogeneización tiene una influencia importante en el tamaño de las gotas producidas (Qian y McClements, 2011). En este caso, el tamaño de partícula considerablemente mayor alcanzado en emulsiones con la fracción rica en proteínas de chía podría ser debido a su menor nivel de proteína disponible en las condiciones del medio químico, el cual no sería suficiente para cubrir la superficie de gotas de aceite más pequeñas formadas. Algunos investigadores han indicado que cuando el contenido de proteínas es limitado, ya no hay suficiente proteína para estabilizar completamente la interfase de las gotas, y por lo tanto pueden formarse partículas más grandes durante la homogeneización (Dickinson y col., 2003; Day y col., 2007). Teniendo en cuenta las propiedades emulsionantes, es sabido que el caseinato de sodio es una proteína flexible y eficaz para reducir la tensión interfacial, pudiendo desplegarse en la interfase más rápidamente que las proteínas globulares (Dickinson y McClements, 1995). Por lo tanto, es esperable que el caseinato de sodio desempeñe un rol importante como agente emulsificante, al presentar una mayor hidrofobicidad, una menor tensión superficial y una mayor flexibilidad estructural que las proteínas de chía constituidas principalmente por proteínas globulares (Sandoval-Oliveros y Paredes-López, 2012). Además, se obtuvieron tamaños de partículas más

pequeños ($p \leq 0,05$) para emulsiones con PM+Mg que los sistemas PM (**Tabla 2.7**). Este hecho podría estar relacionado con la contribución del mucílago chíá a través del aumento de la viscosidad y la formación de una red que reduce el movimiento de las gotas de aceite, su posible colisión y coalescencia. Este efecto ha sido más importante para este tipo de emulsiones que los sistemas estabilizados con caseinato de sodio, probablemente debido al menor contenido de proteína de chíá no adsorbida en la fase continua. El tamaño de partícula de las emulsiones O/W no mostró variaciones significativas durante el periodo de almacenamiento, excepto para las emulsiones con la fracción rica en proteínas de chíá. De manera similar, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los niveles de Span en función del tiempo de almacenamiento.

Tabla 2.7. Diámetro medio de superficie D [3,2] e índice de polidispersidad (Span) de emulsiones O/W de chíá a diferentes tiempos de almacenamiento a 4 ± 1 °C

Sistemas	D [3,2] (μm)		Polidispersidad	
	0 d	15 d	0 d	15 d
CL	0,25 ^{aA}	0,27 ^{aA}	1,32 ^{xx}	1,43 ^{xyX}
CM	0,27 ^{aA}	0,26 ^{aA}	1,46 ^{xx}	1,43 ^{xyX}
PM	9,86 ^{cB}	6,99 ^{cA}	2,23 ^{yX}	1,72 ^{yX}
CL+Mg	0,22 ^{aA}	0,22 ^{aA}	1,07 ^{xx}	1,11 ^{xx}
CM+Mg	0,23 ^{aA}	0,24 ^{aA}	1,2 ^{xx}	1,24 ^{xx}
PM+Mg	7,44 ^{bbB}	5,99 ^{baA}	2,65 ^{yX}	2,08 ^{zX}
Stdv	0,01-0,70	0,01-0,13	0,01-0,13	0,01-0,12

Diferentes letras: indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). Letras pequeñas: diferencias en la misma columna. Letras mayúsculas: diferencias en la misma línea, para los tiempos de almacenamiento 0 y 15d

Stdv: desviación estándar

3.2.2. ζ -potencial

El ζ -potencial representa la diferencia de potencial entre el medio de dispersión y la capa estacionaria de fluido unida a la gota dispersada. El valor numérico del ζ -potencial se puede relacionar con la estabilidad de las emulsiones. Así, las emulsiones con alto ζ -potencial absoluto ($> a +30$ mV ó $< a -30$ mV) se

estabilizan electrostáticamente mientras que las emulsiones con bajo ζ -potencial absoluto tienden a coagular o flocular (Wang y col., 2011).

La carga de las gotas de emulsiones O/W con aceite de chía a pH 6-6,5 fue negativa para todos los sistemas. Esta carga ha sido atribuida a los grupos ionizados de la proteína cuando el pH se encontraba por encima del punto isoeléctrico (pI). Los resultados obtenidos indicaron que tanto la combinación proteína-carbohidrato utilizada como la adición de mucílago de chía tuvieron efectos significativos ($p \leq 0,05$) sobre el ζ -potencial, siendo el primero de ellos, el factor de mayor influencia (**Tabla 2.6**). Ahora bien, en ausencia de mucílago de chía, la carga eléctrica de las gotas de emulsiones estabilizadas con caseinato de sodio fue de ~ -35 y -31 mV para CL y CM, respectivamente. Por otra parte, se encontró una disminución significativa ($p \leq 0,05$) en la magnitud de este parámetro al sustituir la lactosa por maltodextrina. Este hecho podría atribuirse a las interacciones entre el agente emulsificante-maltodextrina en la superficie de las gotas de la emulsión. Así, las moléculas de maltodextrina podrían unirse a los grupos activos superficiales aniónicos que originalmente estaban asociados con las gotas de aceite de chía, reduciendo su carga negativa (Klinkesorn y col., 2004). Además, las gotas recubiertas por la fracción rica en proteínas de chía presentaron una carga negativa de ~ -23 mV, probablemente debida a la presencia de grupos funcionales aniónicos presentes en la estructura proteica, principalmente relacionados con los ácidos glutámico y aspártico. La carga neta sobre las gotas se hizo significativamente ($p \leq 0,05$) menos negativa cuando se incorporó el mucílago de chía. Este hecho podría atribuirse a la posible supresión de carga debida a las asociaciones electrostáticas entre las cadenas polipeptídicas y ciertos grupos cargados provenientes del mucílago de chía.

3.2.3. Propiedades reológicas

Las propiedades reológicas de las emulsiones fueron altamente dependientes ($p \leq 0,01$) de la combinación proteína-carbohidrato, la adición de mucílago de chía y de la interacción entre ambos factores, como puede verse en la **Tabla 2.6**.

Los resultados experimentales de las curvas de flujo de las emulsiones O/W de chía se ajustaron al modelo de la ley de la Potencia y se calcularon sus

parámetros (n , índice de comportamiento de flujo y K , coeficiente de consistencia) (Tabla 2.8).

Tabla 2.8. Parámetros de la ley de la Potencia (n , índice de comportamiento del flujo, K , coeficiente de consistencia) y viscosidad aparente a 100 s^{-1} (η_{100}) para emulsiones O/W con aceite de chía a $25 \pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$

Sistemas	ley de la Potencia		η_{100} (Pa.s)
	K (Pa.s ⁿ)	n	
CL	0,234 ^{ab}	0,866 ^c	0,124 ^b
CM	0,537 ^{bc}	0,760 ^b	0,173 ^c
PM	0,007 ^a	1,000 ^d	0,007 ^a
CL+Mg	1,007 ^c	0,700 ^b	0,261 ^d
CM+Mg	3,905 ^d	0,535 ^a	0,464 ^e
PM+Mg	0,015 ^a	1,000 ^d	0,015 ^a
Stdv	0,001 - 0,025	0,001-0,007	0,003-0,030

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en la misma columna

Stdv: desviación estándar

En todos los casos, los valores del coeficiente de determinación (R^2), utilizados como criterios de la bondad del ajuste del modelo, fueron superiores a 0,98. Diferencias en el comportamiento de flujo de diferentes emulsiones O/W pudieron ser evidenciadas. De acuerdo a la **Tabla 2.8**, las emulsiones preparadas con caseinato de sodio registraron valores de $n < 1$, denotando un comportamiento pseudoplástico. La pseudoplasticidad de los sistemas estabilizados con caseinato de sodio fue asociada a la disrupción mecánica de la red estructural (fase acuosa atrapada dentro de la estructura entre gotas) a grandes esfuerzos aplicados. Además, estos sistemas presentaron diferentes grados de pseudoplasticidad evidenciados por el índice de comportamiento de flujo (n), el cual disminuye cuando aumenta la pseudoplasticidad. Así, se encontró que las emulsiones con maltodextrina presentaron un mayor comportamiento pseudoplástico que los sistemas con lactosa. Por otra parte, las emulsiones con la fracción rica en proteínas de chía exhibieron un comportamiento newtoniano ($n \sim 1$) (**Tabla 2.8**).

En cuanto a la dependencia del comportamiento de flujo de las emulsiones de chía O/W en función del tiempo de cizallamiento, se registraron diferencias

significativas ($p \leq 0,05$) en los parámetros reológicos entre las curvas de ida y vuelta de todos los sistemas con la adición de mucílago de chía (datos no mostrados).

Las viscosidades aparentes de diferentes sistemas a 100 s^{-1} de velocidad de cizallamiento (η_{100}), consideradas como un valor típico de procesos alimenticios tales como el flujo a través de cañerías, agitación y masticación (McClements, 2004), se presentan en la **Tabla 2.8**. Se observó que los sistemas con la fracción rica en proteínas de chía registraron valores muy inferiores ($p \leq 0,05$) de este parámetro en comparación con las emulsiones estabilizadas con caseinato de sodio. Este hecho podría estar relacionado con el nivel de proteína mayor al requerido para cubrir completamente la superficie de las gotas. Por ello, una gran cantidad de caseinato de sodio no adsorbido puede permanecer en la fase continua de estos sistemas. Esta situación produciría una mejora de la viscosidad de la fase continua y de la energía de depleción, lo que también podría conducir a la formación de agregados y una estructura de red de emulsión transitoria (Julio y col., 2015). Presentaron un aumento de η_{100} las emulsiones O/W cuando se usó maltodextrina en lugar de lactosa. Además, se evidenció un aumento significativo ($p \leq 0,05$) de la viscosidad aparente de las emulsiones con caseinato de sodio al añadir mucílago de chía, probablemente relacionado con la composición y las propiedades funcionales del mismo (**Tabla 2.8**). Estos resultados están de acuerdo con Timilsena y col. (2016) quienes informaron que la alta viscosidad de la solución de goma de semilla de chía puede atribuirse a la presencia de sustituyente de ácido 4-O-metil-glucurónico que forma una red de cadenas intermoleculares en medio acuoso.

3.2.4. Estabilidad global

La **Tabla 2.6** muestra que la combinación proteína-carbohidrato presentó una influencia muy significativa ($p \leq 0,01$) seguida de la adición de mucílago de chía ($p \leq 0,05$) en BS_{av0} . Los valores promedio de BS inicial a lo largo del tubo (BS_{av0} , del perfil de BS, $t=0$) fueron 63, 59 y 49% para los sistemas CL, CM y PM, respectivamente. Teniendo en cuenta que a $t=0$ la distribución de las partículas es homogénea, el BS_{av0} depende directamente del diámetro medio de las partículas. El flujo de BS aumentó con el diámetro medio de las partículas, cuando el tamaño de

las gotas fue menor que la longitud de onda incidente (λ) y disminuyó con el diámetro medio de las partículas para tamaños de gotas más grandes que la longitud de onda incidente (Mengual y col., 1999). En virtud de ello, el valor de BS_{av0} fue significativamente inferior ($p \leq 0,05$) en emulsiones estabilizadas con la fracción rica en proteínas de chíá en contraste con los sistemas de caseinato de sodio posiblemente debido al tamaño de gotas superior a λ ($0,8 \mu\text{m}$).

La estabilidad global de las emulsiones O/W se examinó durante 15 días de almacenamiento a través de la caracterización óptica de las mismas con un analizador vertical de barrido (QuickScan). La evolución de los perfiles de “Back Scattering” (BS) en función de la altura de la muestra (altura total = 65 mm) para los diferentes sistemas se presentan en la **Figura 2.13**. Los patrones de BS constituyen la huella dactilar macroscópica de la muestra de emulsión (Mengual y col., 1999) y permite examinar los fenómenos de migración de las gotas de aceite. En este sentido, las emulsiones estabilizadas con caseinato de sodio presentaron una alta estabilidad global sin cambios significativos en los perfiles de BS durante todo el periodo de almacenamiento (**Figura 2.13.a y b**). Este hecho podría estar asociado al alto nivel de viscosidad y pequeño tamaño de partículas de estos sistemas, lo que redujo drásticamente la movilidad de las gotas de aceite de chíá y por lo tanto su movimiento ascendente según la ley de Stokes; lo que concuerda con la correlación significativa encontrada: BS_{av0} vs. η_{100} ($r = 0,67$; $p = 0,0157$) y BS_{av0} vs. $D [3,2]$ ($r = -0,96$; $p = 0,0000$). Por otra parte, se detectó una clarificación en el fondo del tubo de muestra al cabo de 5 días de almacenamiento para sistemas con la fracción rica en proteínas de chíá, lo que puede visualizarse mejor mediante un aumento en la relación de transmisión en el fondo del tubo de muestra (**Figura 2.13.c y c.1**). Este comportamiento podría estar asociado a la libre movilidad de las gotas y el alto grado de interacción de las partículas, causado por las débiles fuerzas viscosas en la fase acuosa con las proteínas de chíá y a una carga menor neta de estas gotas de emulsión. En este sentido, se encontró una correlación positiva entre BS_{av0} y ζ -potencial ($r=0,83$; $p=0,0008$).

En cuanto a la adición de mucílago de chíá, las emulsiones presentaron perfiles de BS similares a los sistemas sin mucílago, registrando un aumento de $\sim 5\%$ en el BS_{av0} en el caso de CM + Mg y PM + Mg (datos no mostrados).

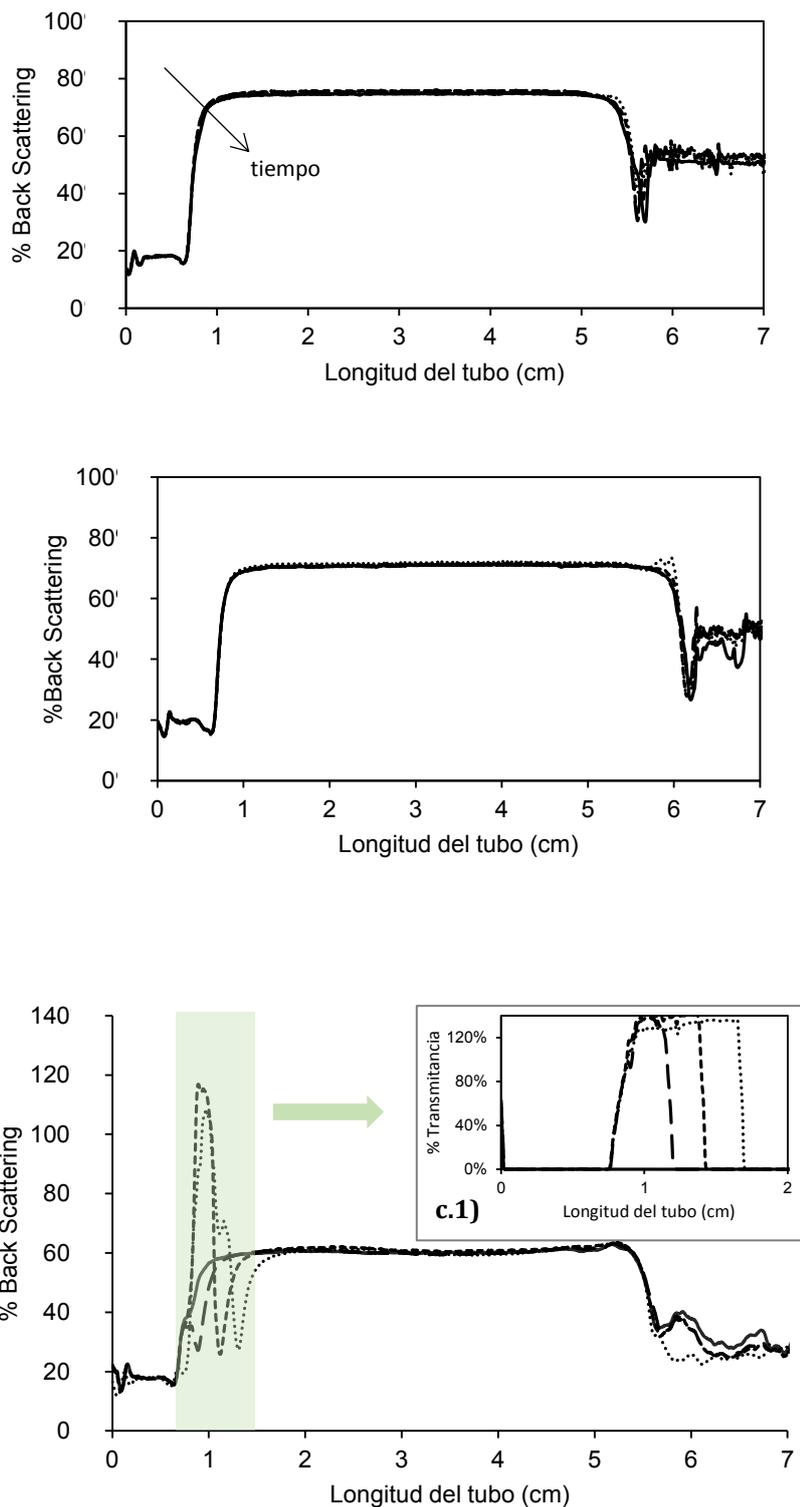


Figura 2.13. Perfiles de “Back Scattering” (% BS vs. la longitud del tubo) correspondientes a emulsiones O/W **a)** CL, **b)** CM y **c)** PM con aceite de chía y perfil de transmitancia de la parte inferior del tubo (área sombreada) para PM (**c.1**) en función del almacenamiento: (—) tiempo inicial, (- -) 5d, (----) 10d y (.....) 15 d. Valores medios (n = 2).

4. Conclusiones parciales

Caracterización de emulsiones O/W con aceite de chía. Influencia de la concentración de caseinato de sodio, las variables operativas del proceso de homogeneización y el agregado de lactosa

- Se estudiaron emulsiones O/W con aceite de chía evaluando la ***influencia de la concentración de caseinato de sodio, el nivel de presión de homogeneización y la presencia de lactosa sobre sus propiedades físicoquímicas***. Estos factores fueron relevantes en el orden mencionado al exhibir efectos significativos sobre la mayoría de las características de los sistemas investigados.
- Las emulsiones O/W con aceite de chía presentaron gotas cargadas negativamente (pH ~6,4), una distribución de tamaño de partículas monomodal y un diámetro medio dependiente en gran medida de la presión de homogeneización y del contenido del agente emulsificante y en menor extensión de la adición de lactosa.
- Las ***propiedades reológicas*** y la ***estabilidad global*** de las distintas emulsiones O/W fueron influenciadas por el contenido de caseinato de sodio y la adición de lactosa. Los sistemas con 2% p/p de agente emulsificante exhibieron una estabilidad moderada y un comportamiento newtoniano. Cuando la concentración de caseinato de sodio se incrementó a 5% p/p se evidenció una baja estabilidad por la formación de agregados, floculación por depleción, como consecuencia del aumento de la proteína no adsorbida. Las emulsiones formuladas con 10% p/p de caseinato de sodio exhibieron un comportamiento pseudoplástico y una alta estabilidad global asociados al reordenamiento de los agregados formando una red de gel firme.
- Las emulsiones O/W con aceite de chía registraron bajos niveles de ***productos primarios y secundarios de oxidación*** durante el periodo de 30 días a

4±0,5°C. El aceite de chía sin emulsificar exhibió niveles superiores de PV y p-AV.

Caracterización de emulsiones O/W con subproductos de la semilla de chía.

Influencia de la composición de la fase acuosa

- Se obtuvieron y caracterizaron emulsiones O/W con ingredientes funcionales (aceite con un alto contenido de ácidos grasos ω -3, fracción rica en proteínas y/o mucílago) de semillas de chía, investigando la ***influencia de la composición de la fase acuosa sobre sus propiedades fisicoquímicas.***
- Se logró una alta estabilidad física para las emulsiones de chía O/W con caseinato de sodio-lactosa o caseinato de sodio-maltodextrina con un pequeño tamaño de partícula, una polidispersidad baja, gotas cargadas negativamente (pH ~6,5) y un comportamiento pseudoplástico. Se observó una disminución de la carga neta de ζ -potencial y un aumento de η_{100} cuando se empleó maltodextrina en lugar de lactosa.
- En contraste, los sistemas con la ***fracción rica en proteínas de chía*** presentaron mayores distribuciones de tamaño de gotas y un mayor diámetro medio de Sauter que las emulsiones con caseinato de sodio, registrando un comportamiento newtoniano. En estos sistemas se detectó una estabilidad limitada después de 5 días de almacenamiento mediante un proceso de clarificación.
- El impacto de la ***adición del mucílago de chía*** - fibra dietética soluble- se reflejó principalmente en las características reológicas de las emulsiones. Por ello, su inclusión aumentó la viscosidad de la fase acuosa disminuyendo el movimiento de las gotas de aceite con la consecuente mejora en la estabilidad de la emulsión, lo que evidencia un rol interesante del mucílago de chía como agente espesante.

Los resultados obtenidos sugieren que las emulsiones O/W constituyen sistemas alternativos que permiten mejorar la estabilidad del aceite de chía frente a la oxidación lipídica. Esta información es particularmente útil para el diseño y producción de emulsiones O/W como sistemas de suministro de ácidos grasos ω -3 y de otros subproductos provenientes de la semilla de chía, lo cual permite la revalorización y aplicación de estos nuevos ingredientes en el desarrollo de diversos alimentos funcionales.

5. Difusión de Resultados

Publicaciones científicas en revistas internacionales

- **Chia seed oil-in-water emulsions as potential delivery systems of ω -3 fatty acids.** Julio, L. M., Ixtaina, V. Y., Fernández, M. A., Torres Sánchez, R. M., Wagner, J. R., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2015). *Journal of Food Engineering*, 162(0), 48-55.
- **Development and characterization of functional O/W emulsions with chia seed (*Salvia hispanica* L.) by-products**, Julio, L. M., Ixtaina, V. Y., Fernández, M. A., Torres Sánchez, R. M., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2016). *Journal of Food Science and Technology Mysore* (doi 10.1007/s13197-016-2295-8).

Capítulos de libros

- **Characterization of chia (*Salvia hispanica* L.) seed and by-products from Argentina.** *Salvia hispanica* L.: Properties, Applications and Health. Luciana M. Julio, Marianela Capitani, Estefania Guiotto, Ixtaina Vanesa, Tomás Mabel, Susana Nolasco. (2016). Editorial NOVA Science Publishers, Inc. Hauppauge, NY.

Presentaciones en congresos y/o jornadas

- **Estabilidad fisicoquímica de emulsiones O/W con aceite de chía.** Luciana M. Julio, Vanesa Y. Ixtaina, Jorge R. Wagner, Susana M. Nolasco, Mabel C. Tomás. XIV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL). 23 al 25 de octubre de 2013. Rosario, Santa Fe, Argentina. Trabajo extendido.
- **Desarrollo de emulsiones O/W y microcápsulas con aceite de chía como sistema de incorporación de ácidos grasos omega-3.** Luciana M. Julio, Vanesa Y. Ixtaina, Jorge R. Wagner, Susana M. Nolasco, Mabel C. Tomás. XXI

Jornadas Jóvenes Investigadores AUGM - Universidad Nacional del Nordeste. 14 al 16 de octubre de 2013. Corrientes, Argentina. Trabajo extendido.



CAPÍTULO 3

Emulsiones O/W multicapa con subproductos de chía y girasol

1. Introducción

La industria alimentaria emplea en gran medida tecnologías de emulsificación para obtener productos tales como refrescos, cremas, aderezos para ensaladas, mayonesa, salsas, sopas, manteca y margarina. Durante el proceso de homogeneización, las moléculas de un agente emulsificante se adsorben sobre la superficie de las gotas de aceite recién formadas, reduciendo la tensión interfacial y formando una capa protectora alrededor de las mismas que previene su agregación. Entre los agentes emulsificantes más comúnmente empleados pueden mencionarse las proteínas anfífilas, polisacáridos, fosfolípidos, agentes tensioactivos (McClements, 2005). Estos emulsificantes pueden variar significativamente en su eficiencia para producir gotas de aceite pequeñas durante la homogeneización y en su capacidad para prevenir la agregación de las mismas bajo diferentes condiciones del medio tales como, pH, fuerza iónica, calentamiento y congelación (McClements, 2005; Garti y col., 1993). Además, pueden diferir en su costo, disponibilidad, facilidad de manipulación, compatibilidad con otros ingredientes (Stauffer, 1999). Así, es limitado el número de agentes emulsificantes que pueden emplearse para formar capas interfaciales de sistemas de provisión de ingredientes funcionales con diversas características de protección y liberación. Además, existen ciertas restricciones en cuanto a las propiedades funcionales que pueden obtenerse a partir del uso de los emulsificantes de grado alimentario existentes, así como de las metodologías convencionales de emulsificación, por ejemplo, baja estabilidad de las emulsiones a determinados niveles de pH, presencia de sales, oxidación de lípidos o bien estabilidad frente a procesos como calentamiento, deshidratación, congelación y enfriamiento. Estas limitaciones han impulsado la investigación para el desarrollo de nuevos métodos alternativos que permitan mejorar la estabilidad de las emulsiones mediante estrategias innovadoras basadas en las propiedades fisicoquímicas de los agentes emulsificantes. Una de esas estrategias ha sido la generación de complejos covalentes proteína-polisacárido los cuales presentan una buena actividad superficial y pueden ofrecer una mejor protección frente a determinadas condiciones del entorno químico (Dickinson y col., 2003; Schmitt y col., 1998). Por ello, se ha intensificado la búsqueda y caracterización de nuevos agentes emulsificantes a fin de profundizar en este nuevo enfoque o bien en el desarrollo y

optimización del empleo de agentes emulsificantes ya existentes para facilitar la formación de emulsiones y mejorar su estabilidad (Benichou y col., 2002; Drusch y Schwarz, 2006; Drusch, 2007).

Las emulsiones convencionales son a menudo propensas a sufrir procesos de desestabilización física al ser expuestas a ciertas condiciones ambientales tales como tratamientos térmicos (calentamiento, refrigeración, congelación), secado, pH extremos y altas concentraciones de minerales. Además, a menudo tienen una efectividad limitada en la capacidad de protección y liberación controlada de componentes funcionales.

En este sentido, una estrategia es la creación de una interfase alrededor de las gotas de aceite constituida por varias capas de agentes emulsificantes y/o polielectrolitos mediante la aplicación de la técnica de deposición electrostática “*layer-by-layer*” (LBL) (Faldt y col., 1993; Calvo y col., 1997; Magdassi y col., 1997; Dickinson y James, 2000; Moreau y col., 2003; Ogawa y col., 2003; Guzey y col., 2004; Ogawa y col., 2004).

1.1. Principios y aplicaciones de la técnica “*layer-by-layer*” (LBL)

Decher y col., (1991; 1992) han demostrado la adsorción electrostática multicapa de polímeros cargados sobre superficies planas (Decher y Hong, 1991; Decher y col., 1992). Desde entonces, el método LBL se ha utilizado en una amplia gama de aplicaciones tales como la formación de películas de múltiples capas en las superficies planas, células biológicas y partículas coloidales (Donath y col., 1998; Caruso y Mohwald, 1999 a, b; Caruso y col., 1999 a, b; Schuler y Caruso, 2001; Ai y col., 2002; Georgieva y col., 2002; Ai y col., 2003). A finales de los años 1990s Caruso y col., (1999 a, b) investigaron extensamente la adsorción de polielectrolitos sobre partículas coloidales utilizando dicha técnica, lo cual permitió nuevas aplicaciones de la misma incluyendo la encapsulación de enzimas (Caruso y col., 2000; Trau y Renneberg, 2003) y la producción de nanopartículas huecas (Donath y col., 1998; Caruso y col., 1999b).

En la técnica de deposición electrostática LBL se forma una capa de un polielectrolito sobre una superficie cargada debido a la fuerte atracción electrostática existente entre la superficie y las moléculas de polielectrolito de carga opuesta. El hecho que el número total de cargas de las moléculas de

polielectrolito adsorbido sea mayor que el requerido para neutralizar las cargas opuestas en la superficie, significa que se produce la *inversión de carga*. Este exceso de compensación de la carga superficial tiene dos consecuencias importantes. En primer lugar, significa que los polielectrolitos adsorbentes tienden a formar *monocapas* ya que una vez que la superficie ha sido saturada con polielectrolitos hay una repulsión electrostática entre ella y las moléculas no adsorbidas, lo que impide más adsorción. En segundo lugar, significa que otras capas pueden formarse por adsorción de polielectrolitos con carga opuesta en la parte superior de la primera capa. El polielectrolito que forma la capa externa por lo general determina la carga neta de la interfase.

Es posible adaptar la tecnología LBL para producir emulsiones alimentarias de múltiples capas usando un método sencillo, rápido y económico denominado "*step-by-step*" (**Figura 3.1**). En este método, un emulsificante iónico que se adsorbe rápidamente sobre la superficie de las gotas de aceite durante el proceso de homogeneización se utiliza para obtener una emulsión "primaria" a continuación, se añade al sistema un polielectrolito de carga opuesta y se adsorbe a la superficie de las gotas obteniendo una emulsión "secundaria", que contiene gotas recubiertas con una interfase de dos capas (Guzey y McClements, 2006). Este procedimiento puede repetirse para obtener emulsiones "multicapa", las cuales pueden contener gotas de aceite revestidas por tres o más capas. Puede ser necesario eliminar cualquier exceso de biopolímero entre cada etapa de adsorción, aunque esto a menudo puede evitarse a partir de la adecuada selección de la concentración inicial del mismo. Bajo ciertas condiciones, las emulsiones que contienen gotas de aceite rodeadas por interfases de múltiples capas presentaron una mayor estabilidad en comparación a las emulsiones O/W convencionales con una sola capa interfacial (Ogawa y col., 2003; Surh y col., 2005; Klinkesorn y col., 2005; Aoki y col., 2005; Gu y col., 2005; Guzey y McClements, 2006).

Varios autores han estudiado emulsiones O/W preparadas con agentes tensioactivos de bajo peso molecular, proteínas, polisacáridos y fosfolípidos utilizando la técnica de LBL (Moreau y col., 2003; Guzey y col., 2004; Aoki y col., 2005; Gu y col., 2004; Gu y col., 2005).

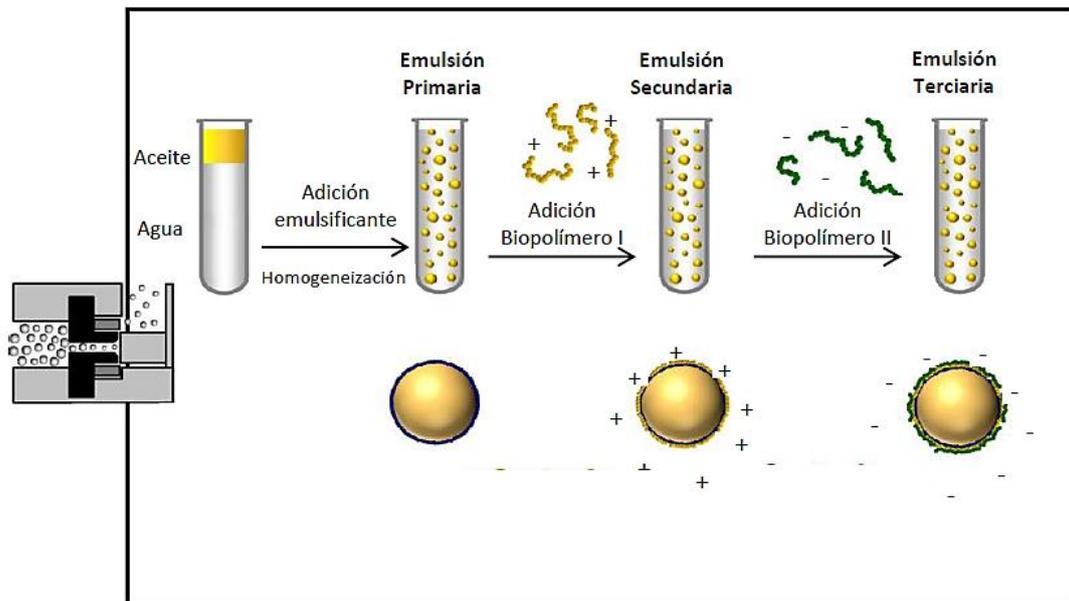


Figura 3.1. Obtención de emulsiones multicapa por adsorción secuencial de múltiples capas de biopolímeros de carga opuesta sobre las superficies de las gotas de aceite (Guzey y McClements, 2006)

Cabe considerar el costo adicional de producción de emulsiones mediante la técnica LBL asociado a ciertos ingredientes (usualmente proteínas y/o polisacáridos) y operaciones de procesamiento extra (mezcla, homogeneización, centrifugación y/o filtración) que sean requeridos. Por ello, es probable que esta técnica pueda ser aplicada en la producción de alimentos de mayor valor agregado. A su vez, puede ser factible lograr la reducción de pérdidas de producto - debidas al menor rendimiento obtenido a partir de agentes emulsificantes existentes - así como la comercialización de un producto de un costo mayor asociado a una mejor funcionalidad y vida útil.

Además de lo comentado, las emulsiones con interfases de múltiples capas podrían registrar en menor medida deterioro por oxidación lipídica debido a un mayor espesor del "film" interfacial, el cual limita las interacciones entre el aceite y los componentes de la fase acuosa y la carga positiva de las gotas que puede repeler metales de transición (agentes prooxidantes). En este sentido, Klinkesorn y col. (2005 a, b); Djordjevic y col. (2007) y Shaw y col. (2007) han demostrado que la oxidación lipídica puede reducirse cuando la capa exterior de las gotas de aceite es de naturaleza catiónica. El conocimiento de los principios fisicoquímicos que

intervienen en la formación y las propiedades de estas interfases de múltiples capas es muy importante a fin de establecer las condiciones óptimas requeridas para la producción de este tipo de emulsiones con las características deseables.

1.2. Factores que afectan las propiedades de las emulsiones multicapa

El pH de la solución es uno de los factores más relevantes que tienen influencia sobre la formación y las propiedades de las multicapas interfaciales de la emulsión. Este parámetro determina la ionización de los grupos funcionales superficiales y por lo tanto, la densidad de carga superficial de los componentes del sistema (Israelachvili, 1992). Usualmente en la técnica LBL, el pH de la solución se define de forma tal que el signo y la magnitud de las cargas eléctricas sobre la superficie de la gota y el biopolímero a incorporar sean opuestas y lo suficientemente altas (Ai y col., 2003). Una gran parte de los biopolímeros empleados en la industria alimentaria posee grupos ionizables por lo cual, a partir del ajuste del pH es posible controlar el grado de adsorción del biopolímero sobre la superficie de la gota. El nivel de pH a partir del cual comienza a observarse la adsorción del biopolímero -pH crítico- depende de la magnitud relativa y el signo de las cargas superficiales de las gotas y del biopolímero. Adicionalmente, el pH puede afectar el espesor del “film” interfacial y como consecuencia, tener influencia sobre la agregación de las gotas a partir de la alteración de la magnitud y el rango de las fuerzas repulsivas.

Presencia de sales

La fuerza iónica de la fase acuosa determina la magnitud y el alcance de las interacciones electrostáticas intra e intermoleculares y por lo tanto, la formación, estructura y espesor de la capa interfacial (Decher y col., 1992; Poptoshev y col., 2004). La magnitud y extensión de las interacciones electrostáticas biopolímero-gota decrecen a medida que la fuerza iónica del medio se incrementa debido a una acumulación de contraiones a nivel superficial, lo cual es usualmente referido como apantallamiento electrostático (McClements, 2004). El efecto del apantallamiento electrostático es mayor al aumentar la concentración y la valencia de los iones en solución.

La presencia de sales durante la conformación de multicapas interfaciales puede afectar la estructura y el espesor de la capa de biopolímero adsorbido (Decher y col., 1992). De esta forma, en ausencia de sales los biopolímeros tienden a formar capas interfaciales delgadas con cadenas dispuestas contra la superficie de la gota, lo cual es atribuido a la conformación extendida de las moléculas de biopolímero en solución y a la restricción de reordenamientos moleculares debido a una atracción electrostática extremadamente fuerte entre los grupos del biopolímero y la superficie cargada. En cambio, en presencia de sales los biopolímeros pueden formar capas interfaciales de mayor espesor, lo que resulta en una conformación de cadena más compacta en solución (por repulsiones intramoleculares débiles) y en fuerzas de atracción electrostáticas débiles entre los grupos del biopolímero y la superficie cargada, lo que permite reordenamientos moleculares post-adsorción (Steitz y col., 2000). Por lo tanto, la cantidad total de biopolímero adsorbido en la superficie tiende a ser mayor en presencia de sales que en su ausencia.

Características del agente emulsificante

Las propiedades eléctricas de la primera capa interfacial de una emulsión multicapa están determinadas por el tipo de agente emulsificante empleado y por ello, pueden ser controladas a partir de su adecuada selección. En la industria alimentaria, una amplia variedad de diversos agentes emulsificantes puede ser empleada incluyendo tensioactivos, fosfolípidos, proteínas y polisacáridos. Cada uno de ellos tiene diferentes características eléctricas, las cuales pueden influir en la formación y las propiedades interfaciales de las emulsiones multicapa. En principio, sería esperable que los agentes tensioactivos no iónicos formaran gotas sin carga. Sin embargo, las gotas usualmente presentan carga eléctrica atribuida a la presencia de impurezas del aceite empleado para la obtención de la emulsión (fosfolípidos, ácidos grasos libres) o bien a la adsorción de iones provenientes de la fase acuosa (OH^- ó H_3O^+). Así, se encuentran disponibles diferentes surfactantes aniónicos de grado alimentario para la preparación de emulsiones primarias con gotas cargadas negativamente incluyendo lecitinas, sales de ácidos grasos, DATEM, etc. Las proteínas son particularmente útiles para controlar la carga de las gotas en una emulsión primaria ya que el signo y magnitud de la misma pueden ser

modificados variando el pH de la solución. Estos compuestos presentan carga positiva a niveles de pH inferiores a su punto isoeléctrico (pI) y negativa a niveles superiores.

Cabe señalar que la selección del agente emulsificante apropiado para la formación de la primera capa interfacial no sólo depende de sus características eléctricas, sino también de su influencia sobre el espesor, estructura y sensibilidad frente a las condiciones del medio de la capa interfacial formada.

Los fosfolípidos presentan una estructura molecular anfifílica compuesta por una región lipofílica constituida por dos restos de ácidos grasos y una región hidrofílica formada por un ácido fosfórico esterificado con las sustituciones sobre el mismo. Debido a este carácter anfifílico, los fosfolípidos presentan una tendencia a organizarse en estructuras ordenadas como la bicapa lipídica o las micelas. Esta característica permite su aplicación como ingrediente multifuncional en alimentos, cosméticos y 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 empleo como agentes emulsificantes, estabilizantes, antisalpicantes, controladores de la cristalización, modificadores de la viscosidad, antioxidantes o sustituyentes de la materia grasa (Prosise, 1985). Las lecitinas de origen vegetal (subproducto del proceso de refinación de aceites vegetales) se encuentran constituidas principalmente por fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) y en menor proporción por ácido fosfatídico (PA) y otras sustancias (triglicéridos, carbohidratos, etc.). Las especificaciones que deben cumplir para ser consideradas de grado alimentario se encuentran reguladas por el *Codex Alimentarius* de la FAO/WHO, 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) (van Nieuwenhuyzen y Tomás, 2008).

Entre los procesos de modificación de las lecitinas pueden mencionarse la introducción de cambios en la concentración original relativa de sus componentes o las modificaciones producidas en su estructura química las que pueden dar lugar a la obtención de 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 lecitina nativa, aplicables al desarrollo de diversos productos (margarinas, chocolates, productos de panadería) (Schneider, 1989; van Nieuwenhuyzen, 1999; van Nieuwenhuyzen y Tomás, 2008).

Los procesos de modificación de lecitinas más utilizados son: a) separación de los fosfolípidos y el aceite por métodos físicos (“deoiling”), b) fraccionamiento con solventes para la producción de fracciones enriquecidas en determinados fosfolípidos, c) modificación enzimática o química de los fosfolípidos (van Nieuwenhuyzen y Tomás, 2008).

Características de los biopolímeros

La formación, estabilidad y propiedades de las emulsiones multicapas dependen también de la naturaleza del biopolímero usado a ser adsorbido sobre la superficie de las gotas cargadas. La longitud de cadena, densidad y distribución de la carga, rigidez y grado de ramificación del biopolímero influyen sobre su tendencia para adsorberse sobre las superficies y las características de las capas adsorbidas tales como, espesor, estructura, porosidad y sensibilidad frente a las condiciones del medio (McClements, 2005).

El espesor de la capa interfacial es a veces gobernado por la densidad de carga de la cadena del biopolímero. A concentraciones suficientemente bajas de sal, los biopolímeros altamente cargados tienden a formar capas interfaciales delgadas debido a la presencia de fuertes interacciones electrostáticas entre ellos y los grupos con carga opuesta de las gotas (Schönhoff, 2003). Este efecto puede verse reducido debido al apantallamiento electrostático en presencia de altas concentraciones salinas (**Figura 3.2**).

La conformación del biopolímero en solución tiene influencia sobre el espesor de las multicapas interfaciales. En este sentido, los biopolímeros que presentan una conformación muy extendida en solución tienden a adsorberse de forma plana en contra de la superficie de la gota, por lo cual la longitud de cadena tiene un impacto menor sobre el espesor del film interfacial (**Figura 3.2.A**). Por otra parte, cuando el biopolímero tiene una conformación espiral en solución, tiende a adsorberse en la superficie de la gota en una conformación más globular y

de este modo, el espesor del film interfacial se incrementa en función de una mayor longitud de cadena del polielectrolito (**Figura 3.2.B**).

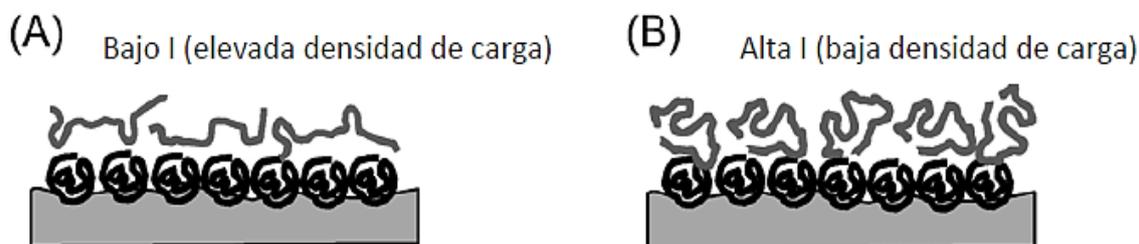


Figura 3.2. Efecto de la fuerza iónica sobre el espesor de la capa y la orientación del biopolímero a la superficie del sustrato; (A) a baja fuerza iónica, y (B) a alta fuerza iónica (Guzey y McClements, 2006)

La cantidad de biopolímero a ser adsorbida sobre la superficie de la gota así como el espesor, estructura y porosidad de la interfase formada son fuertemente afectadas por la susceptibilidad del biopolímero en las condiciones del entorno químico (pH, fuerza iónica, temperatura). Diferentes biopolímeros pueden presentar distinta sensibilidad, por lo cual es posible crear multicapas interfaciales con diferentes características a partir de su adecuada selección o bien de la combinación de los mismos.

La mayoría de los polisacáridos naturales, por ejemplo, celulosa, dextrina, pectina, ácido algínico, agar, agarosa, carragenanos son productos naturales de carácter ácido, mientras que la quitina y el quitosano son ejemplos de polisacáridos altamente básicos.

La quitina es el segundo polímero natural más importante a nivel mundial, siendo las principales fuentes de obtención las asociadas a crustáceos marinos (camarones, cangrejos). Cuando el grado de deacetilación de la quitina es de ~50%, la misma es soluble en medios acuosos de pH ácido, denominándose quitosano, el cual constituye el derivado más importante de la quitina. El quitosano es el único polímero pseudonatural de carácter catiónico y presenta muchas aplicaciones a nivel industrial (alimentos, cosméticos, biomedicina, productos farmacéuticos) (Rinaudo, 2006).

1.3. Factores que afectan la estabilidad de las emulsiones multicapa

Uno de los principales problemas en el empleo de la técnica LBL para la obtención de emulsiones multicapas es la tendencia a la agregación de las gotas, lo que puede ocurrir durante su preparación. Una forma de minimizar o evitar la agregación cuando se aplica este método consiste en controlar cuidadosamente la composición de la solución y las condiciones de preparación es decir, que haya suficiente biopolímero presente para saturar totalmente las superficies de las gotas, que la velocidad de adsorción del biopolímero sobre la superficie de las gotas sea mayor que la velocidad de colisión entre las mismas y que las concentraciones de biopolímero no sean demasiado elevadas como para promover la ocurrencia de floculación por agotamiento "*depletion flocculation*". Asimismo, las fuerzas repulsivas entre las gotas recubiertas deberían ser lo suficientemente fuertes para evitar la agregación. Estos fenómenos fisicoquímicos dependen del tamaño y concentración de las moléculas de biopolímero y de las gotas de la emulsión, así como de las condiciones de la fase acuosa. Si se produce agregación de las gotas durante la preparación de los sistemas multicapa, algunas veces es posible lograr la disrupción de los flóculos formados por la inclusión de una etapa adicional de agitación mecánica (homogeneización, mezclado o ultrasonido de alta intensidad).

1.4. Aplicaciones

Las emulsiones multicapa pueden tener un número de aplicaciones potenciales en la industria alimentaria. Por ejemplo, las interfases altamente cargadas de mayor espesor pueden ser útiles en la protección de las gotas frente a la agregación o en la prevención de la oxidación lipídica. Por otra parte, las interfases multicapa que cambian sus propiedades de manera controlada en respuesta a alguna condición del entorno pueden ser utilizadas para la liberación controlada de compuestos bioactivos.

Cabe señalar que las emulsiones alimentarias pueden experimentar una variedad de tensiones ambientales durante su producción, almacenamiento, transporte y utilización, incluidos valores extremos de pH, altas fuerzas iónicas, procesamiento térmico, ciclos de congelación-descongelación, secado y agitación mecánica. En la actualidad, es importante tener en cuenta que muchos de los

agentes emulsificantes disponibles para la utilización en la industria alimentaria sólo pueden proporcionar una protección limitada frente a dichas tensiones ambientales.

La tecnología LBL -a través del diseño interfacial de múltiples capas- puede proporcionar a la industria alimentaria una importante herramienta para la alteración de la carga eléctrica y el espesor de la capa interfacial que rodea al material lipídico, mejorando así la estabilidad de los aceites emulsificados frente a la oxidación.

En este capítulo se exponen los resultados relacionados con la obtención y caracterización de emulsiones O/W mediante la técnica de deposición electrostática "*layer-by-layer*" (LBL) con aceite de chía, evaluándose la influencia del tipo de lecitina modificada de girasol, la adición de quitosano y de maltodextrina.

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales

El aceite de chía, obtenido por primera prensada en frío, fue provisto por Nutracéutica Sturla S.R.L. (Argentina) (C16:0 10,5%; C18:0 2,5%; C18:1 6,1%; C18:2 19,5%; C18:3 61,3%) y almacenado hasta su uso a $4\pm 1^\circ\text{C}$ protegido de la luz. El quitosano empleado fue suministrado por Sigma Chemical Company (St. Louis, MO), la maltodextrina (DE 13-17%) por Productos de Maíz S.A. (Argentina) y la lecitina nativa de girasol por la industria aceitera local Vicentin S.A.I.C. (Argentina). Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

2.2. Obtención de lecitinas modificadas de girasol (LGD, FPC)

Las lecitinas modificadas de girasol, fracción enriquecida en fosfatidilcolina (FPC) y lecitina de girasol “deoiled” (LGD), fueron obtenidas de acuerdo a la metodología descrita por Cabezas (2010). El proceso de fraccionamiento se llevó a cabo mezclando etanol absoluto con la lecitina nativa en una relación etanol: lecitina 3:1 v/p en un baño con agitación a 65°C , 60 min. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 1880 g, 10 min, 10°C . Este proceso fue llevado a cabo por duplicado hasta obtener un extracto etanólico (fase de interés) y un residuo. A fin de eliminar el solvente, la fracción soluble en etanol fue sometida a evaporación a presión reducida mediante un rotavapor y a continuación, el aceite residual de la muestra se eliminó mediante un proceso de “deoiling”.

La eliminación del aceite residual se llevó a cabo mediante un tratamiento con acetona. Este procedimiento se basa en el detallado por la AOCS Official Method Ja 4-46, procedimientos 1-5 (AOCS, 1995). Mediante la aplicación del mismo, se obtuvo la fracción enriquecida en fosfatidilcolina (FPC) a partir del extracto etanólico.

El tratamiento con acetona también se realizó sobre la lecitina cruda de girasol, obteniéndose así una lecitina de girasol sin aceite (lecitina “deoiled”, LGD).

2.2.1. Composición de fosfolípidos de las lecitinas modificadas de girasol

Las determinaciones de la composición fosfolipídica de las lecitinas de girasol modificadas mediante ^{31}P NMR 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). Para este propósito, se diluyeron 100 mg de cada muestra en 1 mL de cloroformo deuterado, 1 mL de metanol y 1 mL Cs-EDTA 0,2 M (pH 8,0). Luego de 15 min de centrifugación se separó la fase orgánica, la cual fue utilizada para el respectivo análisis. El análisis cuantitativo es registrado en cantidades molares, por lo que para obtener los porcentajes en peso de cada compuesto es necesario aplicar a dichos resultados el peso molecular de cada especie (Diehl, 1997).

2.3. Preparación de dispersiones “stock”

Una *dispersión “stock” de buffer* 100 mM fue preparada a partir de acetato de sodio 2 mM y ácido acético 98 mM en agua. Las *dispersiones “stock” de emulsificante* fueron obtenidas a partir de la dispersión de 2,2% p/p de las lecitinas modificadas de girasol (LGD y FPC) en la solución buffer y simultánea agitación. Posteriormente, dichas dispersiones fueron sonicadas (1 min, 20 kHz, 70% de amplitud) usando una punta sonicadora (Sonics and Materials, Inc., EEUU) a fin de asegurar una dispersión completa del agente emulsificante. Finalmente, una *dispersión “stock” de biopolímero* se preparó disolviendo 1,5% p/p de quitosano (Ch) en solución de buffer bajo agitación. El pH de estas soluciones se ajustó con HCl hasta pH 3.

2.4. Preparación de emulsiones O/W multicapa

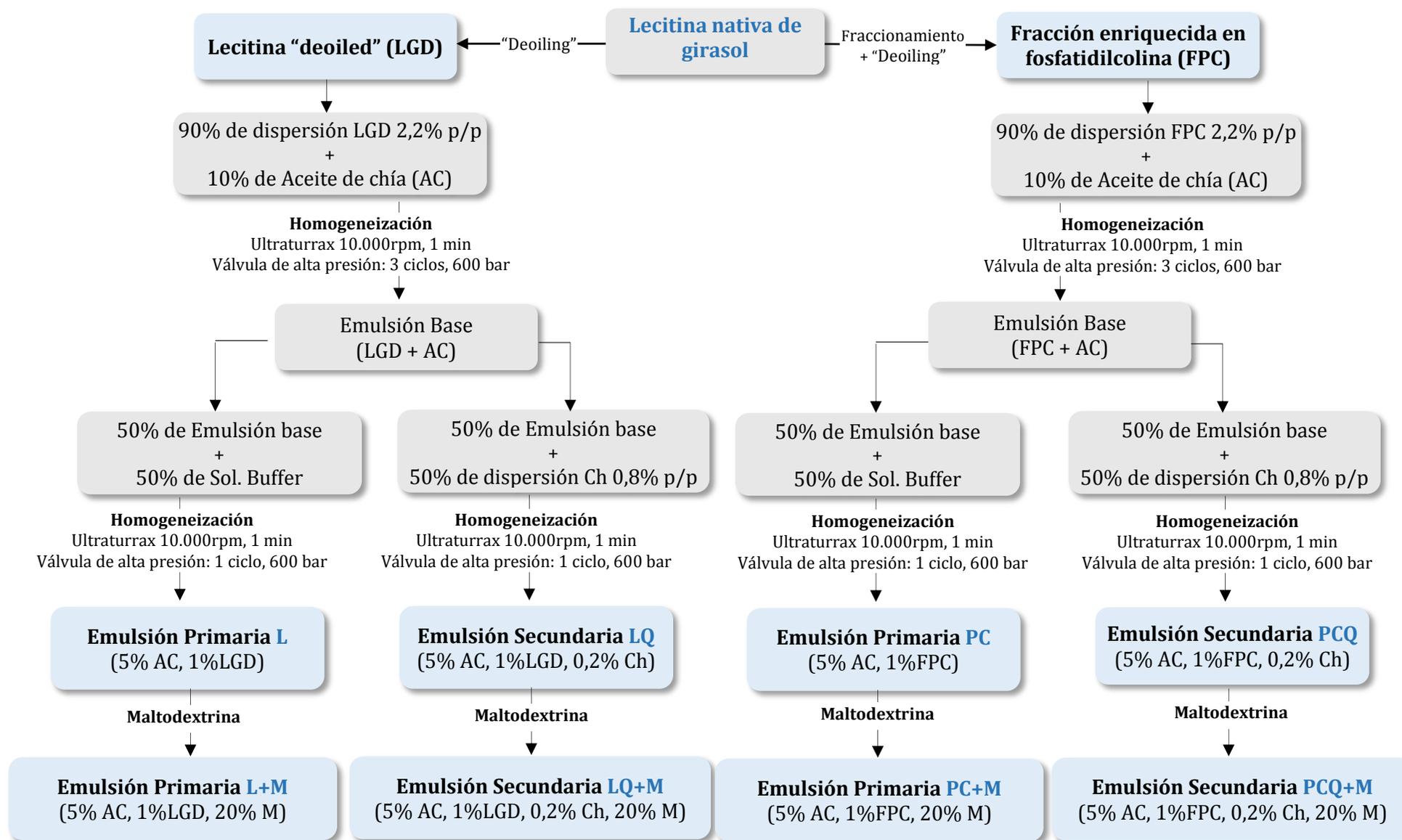
Se prepararon emulsiones O/W multicapa 5:95 (% p/p) con aceite de chía (fase oleosa), tal como se detalla en la **Figura 3.3**.

Se obtuvieron *emulsiones primarias* (L y PC) a partir de la homogeneización del aceite de chía y de las dispersiones “stock” del agente emulsificante, empleando un Ultraturrax T-25 (IKA-Labortechnik, GmbH & Co., Staufen, Alemania) a una velocidad de rotor de 10.000 rpm durante 1min y posterior homogeneización a través de un homogeneizador a válvula Panda 2 K, GEA Niro Soavi (Panda 2K, GEA, NiroSoavi, Parma, Italia) 4 ciclos, 600 bar.

Las *emulsiones bicapas* se prepararon mediante la dilución de la emulsión monocapa con la dispersión de quitosano y solución buffer, usando un agitador

mecánico durante 1 h, hasta alcanzar las concentraciones finales de 5% p/p de aceite de chía; 0,2% de quitosano, 20% de maltodextrina y 1% p/p de lecitina de girasol “deoiled” o FPC (**Figura 3.3**). En ambos tipos de emulsiones - mono y bicapa - se adicionó 20% p/p de maltodextrina. Además, las formulaciones contaron con el agregado de 12 ppm y 1000 ppm de nisina y sorbato de potasio (conservantes de grado alimentario) a fin de evitar el crecimiento microbiano, ajustando a pH 3 las emulsiones obtenidas.

Figura 3.3. Esquema de la preparación de emulsiones O/W multicapa (LBL) con aceite de chía



2.5. Caracterización de las emulsiones O/W multicapa

2.5.1. Distribución de tamaño de partículas y diámetro medio

La distribución de tamaño de partículas y el diámetro medio de Sauter D[3,2] de las emulsiones fueron determinados mediante un equipo de dispersión estática de luz Malvern Mastersizer 2000E (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) con un sistema de dispersión Hydro 2000MU, según lo descrito previamente en la **sección 2.4.1 del Capítulo 2**.

2.5.2. ζ -potencial

El ζ -potencial fue determinado mediante un equipo Zeta Potential Analyzer (Brookhaven 90Plus/Bi-MAS, USA) en la función de movilidad electroforética a temperatura ambiente, según lo descrito en la **sección 2.4.2 del Capítulo 2**.

2.5.3. Propiedades reológicas

Las medidas reológicas se llevaron a cabo con un reómetro oscilatorio Haake RS600 de esfuerzo controlado (ThermoElectron, Alemania) a $25 \pm 0,3$ °C usando un sistema de sensor de platos paralelos rugosos con una separación de 1,0 mm entre platos. Las muestras se sometieron a aumento de la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) de $1-500$ s⁻¹ durante 120 s, se mantuvo constante a 500 s⁻¹ durante 60 s y luego se disminuyó la velocidad de $500-1$ s⁻¹ durante 120 s. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Los datos experimentales se ajustaron al modelo de la Ley de la Potencia según la siguiente ecuación:

$$\tau = K * (\dot{\gamma})^n$$

donde τ es el esfuerzo de corte o de deformación, $\dot{\gamma}$ la velocidad de deformación y los parámetros K y n se refieren al índice de comportamiento de flujo y el índice de consistencia, respectivamente.

2.5.4. Perfiles de “Back Scattering” (%BS) o luz dispersada

La estabilidad global de las emulsiones se determinó a través de medidas de dispersión de luz en un analizador óptico vertical Quickscan (Beckman Coulter,

Fullerton, USA) en función del tiempo de almacenamiento, de acuerdo a lo descrito previamente en la **sección 2.4.4 del Capítulo 2**.

2.5.5. Análisis por microscopía confocal láser de barrido (CSLM)

La microscopía confocal láser de barrido (CSLM) es una técnica que permite obtener imágenes de la microestructura de la muestra minimizando la alteración de la misma durante su preparación. El principio de confocalidad permite eliminar la luz fluorescente proveniente de puntos que se encuentran fuera de foco mediante la utilización de diafragmas, logrando así mejorar la resolución y generando imágenes de muy buena calidad. Se realizó la tinción de las emulsiones O/W a partir del agregado directo de Rodamina B (Biopack) y Rojo Nilo (Sigma), dejando reposar en la oscuridad. Luego de 24 h de reposo, las muestras se observaron con un microscopio confocal invertido LEICA TCS SP5 equipado con láseres de Ar y HeNe. Se tomaron micrográficas de las emulsiones a 63 X (inmersión con aceite) con una resolución de 1024 x 1024 píxeles. Las longitudes de onda de excitación y emisión empleadas fueron 488 y 518 nm (para Rojo Nilo) y 568 y 625 nm (para Rodamina B). El análisis de las imágenes se realizó mediante el empleo del programa LAS AF versión 2.2.1. build 4842 y con el programa ImageJ 1.43u.

2.5.6. Oxidación lipídica de emulsiones multicapa O/W

2.5.6.1. Determinación de productos de oxidación

Para la determinación del contenido de hidroperóxidos o productos primarios de oxidación se empleó el método de Shantha y Decker (Shantha y Decker, 1994), según lo descrito en la **sección 2.4.5.1 del Capítulo 2**.

2.5.6.2. Determinación de productos secundarios de oxidación

La cuantificación de productos secundarios de oxidación se realizó mediante el ensayo de sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARs) aplicando la metodología descrita por Hu y Zhong (2010) con algunas modificaciones. Previo al ensayo se preparó la solución de TBA a partir de la dilución de 15 g ácido tricloroacético (TCA), 0,75 g de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) y 0,8 g 2,6-di-tertbutil-4-metilfenol (BHT) en 100 mL de una mezcla ternaria de solventes (1-butanol, isopropanol y 0,5 M HCl 2:2:1 v/v/v). Para el ensayo se

pesaron 150 mg de cada emulsión en tubos de centrifuga con tapa y se adicionó la solución de TBA hasta un volumen total de 5 mL. La mezcla fue agitada hasta la obtención de una solución transparente. Los tubos se incubaron durante 2 h en un baño de agua a 95 °C, luego de lo cual se enfriaron inmediatamente en un baño de agua. Finalmente, se midió la absorbancia a 532 nm usando cubetas de vidrio y la mezcla ternaria de solventes como blanco de reacción. El valor de TBARs se determinó a partir de una curva de calibración utilizando 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP), y se expresó en términos de mmol de equivalente de malonaldehído/kg de aceite, simplificado como mmol / kg de aceite.

2.6. Análisis estadístico

Los resultados experimentales se analizaron por ANOVA ($p \leq 0,05$) utilizando el programa Statgraphics Centurion XV.II para el software de Windows (StatPoint Technologies, Warrenton, VA, EEUU). Comparaciones múltiples entre medias se llevaron a cabo mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$). La distribución normal de las variables y la varianza de verificación se realizaron mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la prueba de Cochran, respectivamente.

3. Resultados y discusión

3.1. Composición de fosfolípidos de las lecitinas modificadas de girasol

La composición de fosfolípidos -obtenida mediante ^{31}P NMR así como la relación entre los fosfolípidos mayoritarios presentes en la lecitina de girasol cruda (LGC), la lecitina de girasol “deoiled” (LGD) y la fracción enriquecida en fosfatidilcolina (FPC) pueden observarse en las **Tablas 3.1.** y **3.2.**, respectivamente.

Los resultados obtenidos muestran que la FPC exhibe una elevada concentración de PC (45,71%) y un bajo tenor de PI (1,92%) - acorde con el proceso de fraccionamiento - en comparación con LGC y LGD, siendo estas diferencias significativas ($p \leq 0,05$). 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 3.1. Composición de fosfolípidos (PL%) correspondiente a lecitinas de girasol obtenida mediante ^{31}P NMR

PL	LGC (% p/p)	LGD (% p/p)	FPC (% p/p)
PC	15,91 ^a	20,83 ^b	45,71 ^c
PI	15,39 ^b	20,48 ^c	1,92 ^a
PE	4,99 ^a	6,67 ^b	4,91 ^a
PA	1,90 ^b	2,55 ^b	0,60 ^a
Otros	4,75 ^a	6,70 ^b	6,05 ^b
Total	42,94 ^a	57,23 ^b	59,18 ^b

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

Cabe señalar que los fosfolípidos PC y PE pueden presentar distintos arreglos a nivel interfacial. Esta característica le otorga a la relación PC/PE, ser 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 en el de las modificadas (van Nieuwenhuyzen y Szuhaj, 1998). En este sentido, la relación PC/PE correspondiente a FPC sugiere una aplicación más eficiente de la misma como agente emulsificante en emulsiones O/W respecto de LGC y LGD.

Tabla 3.2. 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

3.2. Caracterización de emulsiones O/W mono y multicapa de aceite de chía con lecitinas de girasol modificadas y maltodextrina

Los resultados del ANOVA multifactorial correspondiente al diseño factorial completo 2x2x2 se presentan en la **Tabla 3.3**. Como puede observarse, los principales factores que tuvieron una influencia significativa en la mayoría de las propiedades fisicoquímicas estudiadas fueron la adición de quitosano seguida en menor medida por la adición de maltodextrina y luego por el tipo de lecitina de girasol modificada.

Tabla 3.3. Análisis multifactorial de varianza (ANOVA) del diseño factorial (2x2x2) correspondiente a las propiedades fisicoquímicas de emulsiones O/W mono y multicapa de aceite de chía con lecitinas modificadas de girasol y maltodextrina

Factor	Suma de cuadrados						
	GL	D [3,2]	Span	ζ-potencial	n	K *10 ⁻³	η ₁₀₀ * 10 ⁻³
Lecitina mod. (A)	1	0,001	82.1833***	67,174***	0,003***	0,018	0,005
Adición de Ch (B)	1	0,066***	375.546***	30007,900***	0,013***	4,983***	1,387***
Adición de M (C)	1	0,037***	28.7135*	0,747	0,003***	0,997***	0,586***
AxB	1	0,0180	99.89***	50,057***	0,003***	0,019	0,005
AxC	1	0,057***	0,216225	2,320	0,000***	0,000	0,012*
BxC	1	0,000	20.8621*	0,239	0,003*	0,465***	0,192***
AxBxC	1	0,008*	0,036864	0,007	0,002***	0,000	0,007*
Error puro	8	0,009	24,0915	7,365	0,002	0,154	0,039
Total	15	1,179	631,539	30135,800	0,143	6,639	0,002

(A) Lecitina de girasol modificada; **(B)** Adición de quitosano; **(C)** Adición de maltodextrina

GL Grados de libertad, **D [3,2]** diámetro medio de las gotas de aceite (µm); **n** índice de comportamiento de flujo; **K** coeficiente de consistencia (Pa.sⁿ); **η₁₀₀** viscosidad aparente a 100s⁻¹, *p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001

Distribución de tamaño de partículas y diámetro medio

La distribución de tamaño de partículas de las emulsiones mono y bicapa con lecitinas de girasol modificadas y adición de maltodextrina se presentan en la **Figura 3.4.**

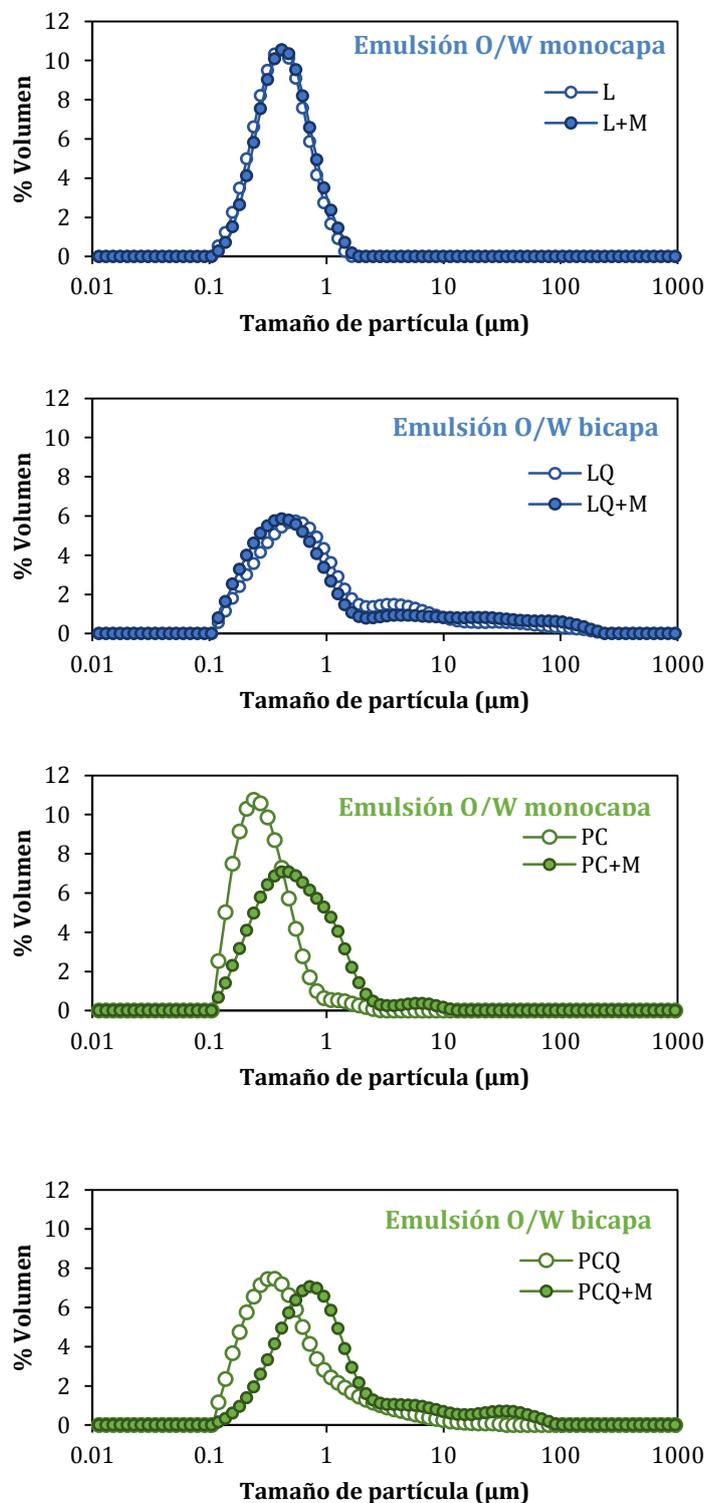


Figura 3.4. Distribución de tamaño de partículas correspondientes a emulsiones O/W mono y bicapa con lecitinas de girasol modificadas y adición de maltodextrina

Las curvas de distribución de tamaño de partículas correspondientes a emulsiones estabilizadas con LGD presentaron un carácter monomodal (L, L+M) y en el caso de las respectivas emulsiones secundarias (LQ, LQ+M), bimodal. Cuando el tipo de agente emulsificante fue FPC pudo observarse un comportamiento monomodal para PC, PCQ; bimodal, en el caso de PC+M; trimodal para PCQ+M.

El diámetro medio de las partículas fue dependiente ($p \leq 0,05$) de la adición de quitosano y de maltodextrina. En ambos casos, la adición de estos ingredientes causó el incremento del tamaño de las partículas. Asimismo, resultó ser significativa la interacción doble A x C (tipo de lecitina modificada de girasol-maltodextrina) (**Tabla 3.3, Tabla 3.4**). Estos resultados podrían relacionarse con la formación de flóculos debida a un menor nivel de concentración de quitosano en la formulación de las emulsiones que el requerido para lograr el recubrimiento global de la lecitina a nivel interfacial, pudiendo originarse atracciones electrostáticas entre las gotas y por ende, inducir la floculación previamente mencionada. En ese sentido, una tendencia similar fue observada por Hou y col. (2010).

Tabla 3.4. Diámetro medio D [3, 2], polidispersidad (Span) y ζ -potencial

Emulsión	D [3, 2] (μm)	Polidispersidad (Span)	ζ -potencial (mV)
L	0,332 \pm 0,001 ^{ab}	1,312 \pm 0,001 ^a	- 35,9 \pm 0,2 ^a
L+M	0,239 \pm 0,014 ^b	1,448 \pm 0,001 ^a	- 36,0 \pm 0,9 ^a
LQ	0,514 \pm 0,001 ^{cd}	13,619 \pm 0,014 ^{cd}	+ 47,4 \pm 0,3 ^b
LQ+M	0,335 \pm 0,110 ^b	3,953 \pm 0,011 ^d	+ 46,8 \pm 0,8 ^b
PC	0,364 \pm 0,005 ^a	1,379 \pm 0,005 ^a	- 36,1 \pm 0,2 ^a
PC+M	0,420 \pm 0,037 ^{bc}	2,172 \pm 0,036 ^a	- 34,7 \pm 0,1 ^a
PCQ	0,366 \pm 0,036 ^{ab}	18,446 \pm 0,037 ^{ab}	+ 54,2 \pm 0,1 ^c
PCQ+M	0,606 \pm 0,062 ^d	9,052 \pm 0,062 ^{bc}	+ 55,2 \pm 1,2 ^c

Valores medios (n=2) \pm desviación estándar. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

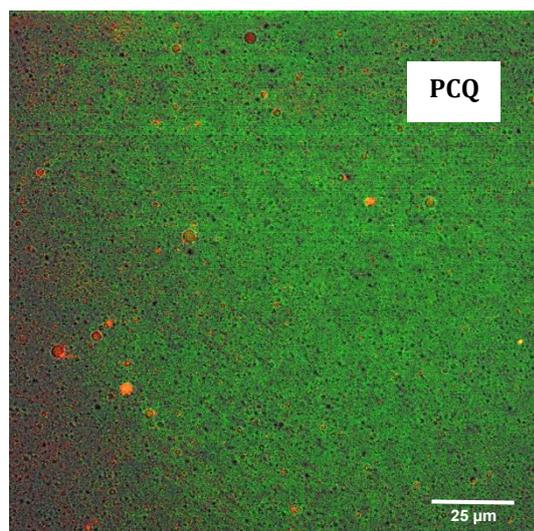
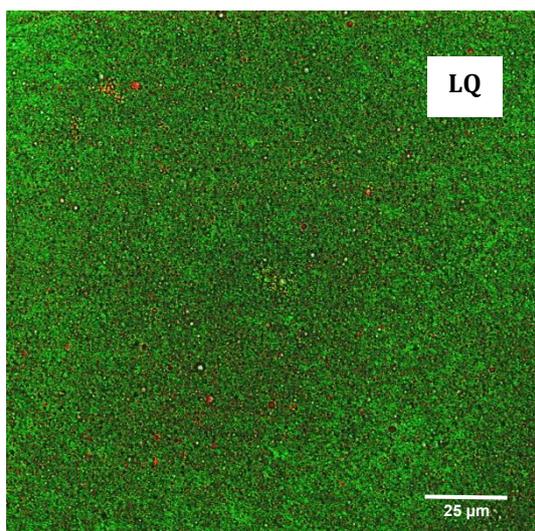
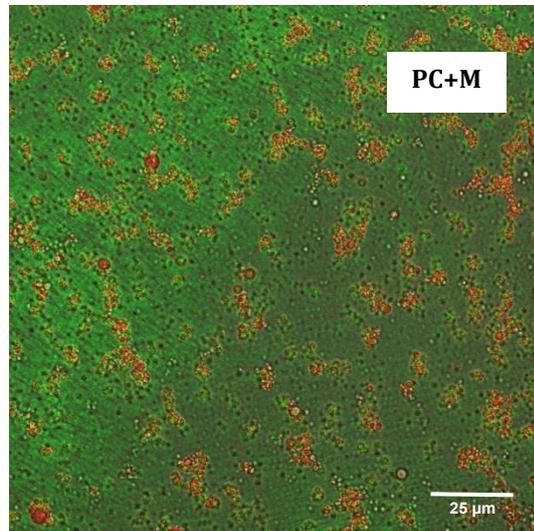
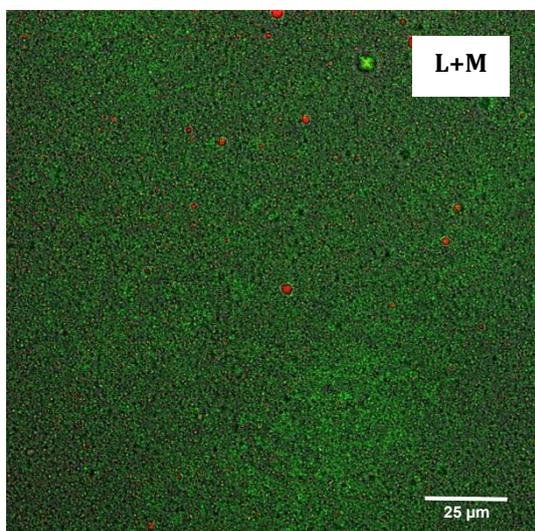
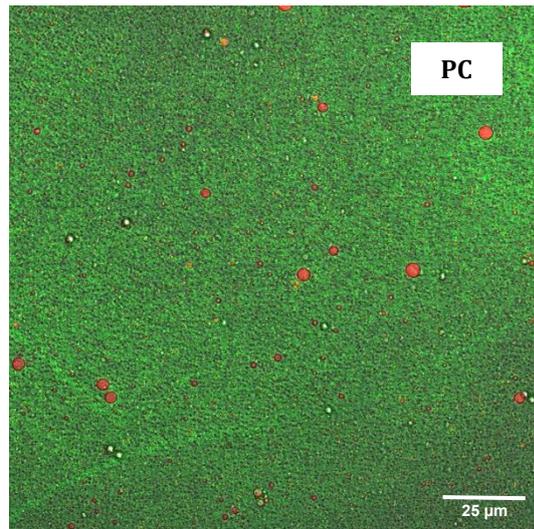
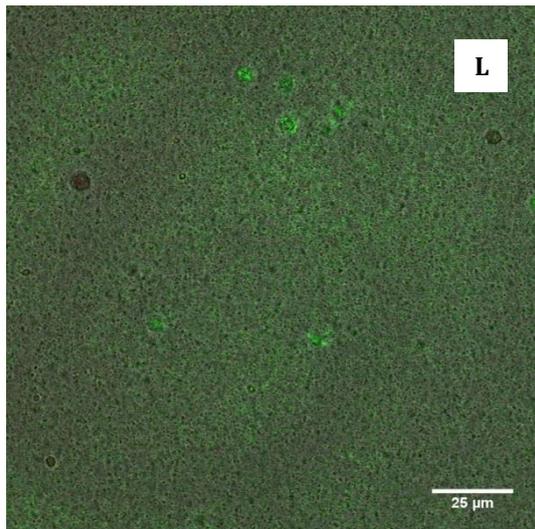
La adición de quitosano y el tipo de lecitina de girasol modificada empleado seguido del agregado de maltodextrina, así como sus interacciones (A x B; B x C), evidenciaron una influencia significativa de estos factores sobre la polidispersidad (**Tabla 3.3**). Un menor nivel de polidispersidad fue registrado para emulsiones

monocapa respecto de las emulsiones secundarias (bicapa). En éstas últimas, la polidispersidad fue afectada significativamente ($p \leq 0,05$) por el tipo de lecitina de girasol modificada, siendo mayor en el caso de FPC (PCQ y PCQ+M) (**Tabla 3.4**). No se evidenciaron cambios significativos en el tamaño de partículas de la mayoría de las emulsiones durante el tiempo de almacenamiento (datos no mostrados).

ζ-Potencial

Se realizó la determinación de ζ-Potencial para evaluar la deposición electrostática de quitosano sobre la película interfacial de LGD o FPC que rodea las gotas de aceite de chía. El tipo de lecitina modificada de girasol, la adición de quitosano y la interacción entre ambos factores (A x B), incidieron de manera significativa sobre la carga superficial (**Tabla 3.3**). En ausencia de quitosano, la carga neta de las gotas de aceite en las emulsiones fue ~ -35 - 36 mV, ya que las lecitinas de girasol empleadas para estabilizar estos sistemas primarios presentan una carga negativa a pH 3. Asimismo, la carga neta de las gotas de aceite luego de la adición de quitosano registró valores del orden de $\sim +47$ - 55 mV, lo que indicaría la saturación de la superficie de las gotas con quitosano. Esta inversión de carga sugiere que las moléculas catiónicas de quitosano se adsorbieron sobre la superficie aniónica de la membrana interfacial lecitina de girasol modificada-aceite, lo cual fue más importante en los sistemas formulados con FPC (**Tabla 3.4**).

En la **Figura 3.5** se presentan las micrografías (CLSM) correspondientes a las emulsiones O/W con aceite de chía monocapa (L, L+M, PC, PC+M) y bicapa (LQ, LQ+M, PCQ, PCQ+M) obtenidas mediante un microscopio confocal Leica TCS SP5 con láser Ar y HeNe. A partir de las micrografías de las emulsiones monocapa puede visualizarse una distribución de gotas de aceite con una cierta polidispersidad (**Figura 3.5. L, PC, L+M, PC+M**). Los sistemas estabilizados por bicapas interfaciales presentaron una microestructura más compacta, lo que podría asociarse a una menor libertad de movimiento de las gotas de aceite debido al aumento de la viscosidad de la fase acuosa por la adición de quitosano, especialmente en LQ+M y PCQ+M (**Figura 3.5. LQ, PCQ, LQ+M, PCQ+M**).



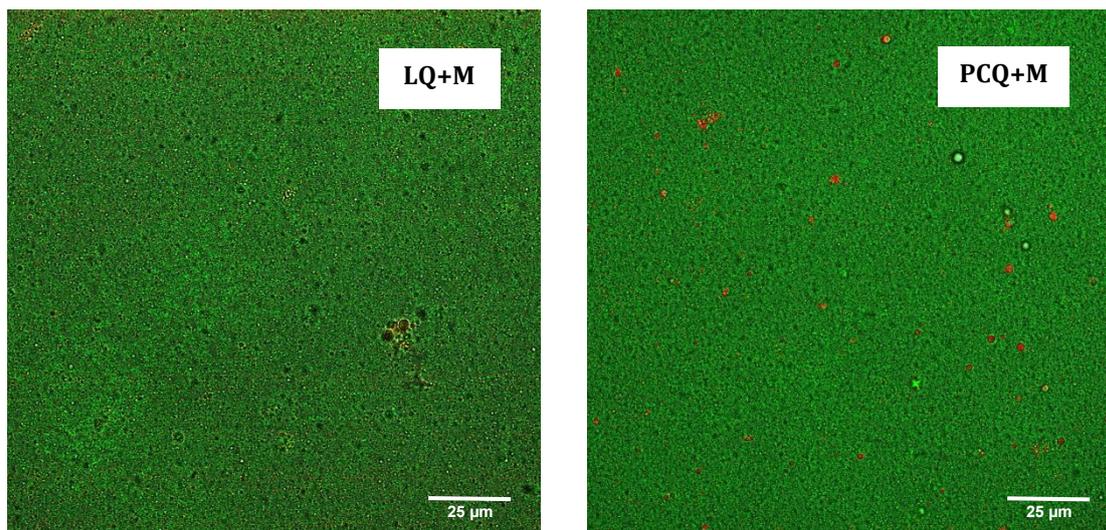


Figura 3.5. Micrografías CLSM correspondientes a emulsiones O/W con aceite de chía primarias (L, PC, L+M, PC+M) y secundarias (LQ, PCQ, LQ+M, PCQ+M) obtenidas mediante tinción con Rojo Nilo (fase oleosa) y Rodamina B, 63X

Propiedades reológicas

Los resultados experimentales obtenidos a partir de los ensayos reológicos presentaron un muy buen ajuste al modelo de la ley de la Potencia (coeficientes de determinación $R^2 > 0,98$). Los valores de viscosidad aparente a 100 s^{-1} (η_{100}) - característica de procesos como agitación o masticación (McClements, 2004) - y los parámetros reológicos (n , índice de comportamiento de flujo; K , coeficiente de consistencia) de los sistemas estudiados se exponen en la **Tabla 3.5**. Asimismo, la información obtenida a partir del análisis estadístico indica que la incorporación de quitosano y la de maltodextrina tuvieron un efecto significativo ($p \leq 0,05$) sobre todos los parámetros reológicos analizados, mientras que el tipo de lecitina de girasol modificada empleada solo afectó al factor exponencial n (índice de comportamiento de flujo). A su vez, las interacciones de segundo y tercer orden resultaron significativas, siendo la interacción B x C (adición de quitosano x adición de maltodextrina) significativa en todos los casos. El agregado de maltodextrina produjo un incremento de la η_{100} de las emulsiones, especialmente notorio en las emulsiones secundarias (**Tabla 3.5** y **Figura 3.6**), lo cual podría estar asociado a un incremento del contenido de sólidos en la fase continua. Asimismo, las emulsiones bicapa -especialmente las emulsiones con maltodextrina (LQ+M,

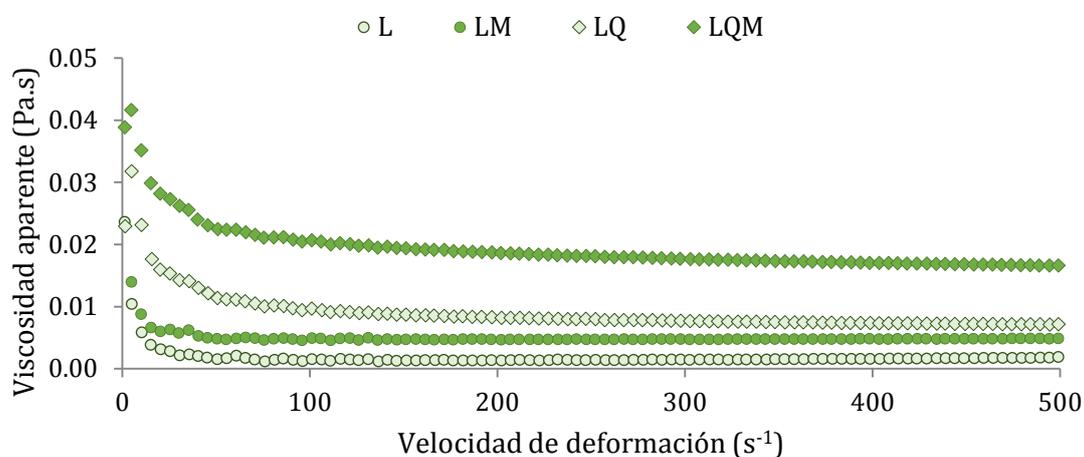
PCQ+M) - presentaron niveles de η_{100} significativamente mayores ($p \leq 0,05$) respecto a los sistemas monocapa (Tabla 3.5 y Figura 3.6).

Tabla 3.5. Parámetros reológicos (n , índice de comportamiento de flujo; K , coeficiente de consistencia) obtenidos a partir de aplicar la ley de la potencia y viscosidad aparente 100 s^{-1} (η_{100}) de las emulsiones O/W con aceite de chía mono y bicapa, con o sin el agregado de maltodextrina, medidas a $25 \pm 0,2^\circ\text{C}$

Emulsión	n	$K \text{ (Pa.s}^n\text{)}.10^{-3}$	$\eta_{100} \text{ (Pa.s)}.10^{-3}$
L	$0,999 \pm 0,001^d$	$1,54 \pm 0,01^a$	$1,54 \pm 0,18^a$
L+M	$1,000 \pm 0,001^d$	$4,95 \pm 0,13^a$	$4,94 \pm 0,14^b$
LQ	$0,837 \pm 0,009^a$	$20,2 \pm 1,29^b$	$9,97 \pm 0,81^c$
LQ+M	$0,866 \pm 0,005^b$	$39,0 \pm 1,63^c$	$21,24 \pm 0,39^d$
PC	$0,999 \pm 0,001^d$	$1,51 \pm 0,06^a$	$1,26 \pm 0,10^a$
PC+M	$0,998 \pm 0,001^d$	$5,10 \pm 0,57^a$	$5,15 \pm 0,66^b$
PCQ	$0,866 \pm 0,022^b$	$17,6 \pm 0,59^b$	$9,36 \pm 0,234^c$
PCQ+M	$0,923 \pm 0,003^c$	$35,5 \pm 3,78^c$	$25,02 \pm 2,50^e$

Valores medios ($n=3$) \pm desviación estándar. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

De acuerdo a lo expuesto en la **Tabla 3.5** y la **Figura 3.6**, las emulsiones bicapa (LQ, LQM, PCQ, PCQ+M) registraron valores de $n < 1$ denotando un comportamiento pseudoplástico asociado al agregado de quitosano a la fase acuosa de estos sistemas. Por otra parte, los sistemas monocapa (L, L+M, PC, PC+M) presentaron un comportamiento newtoniano con valores de $n \sim 1$.



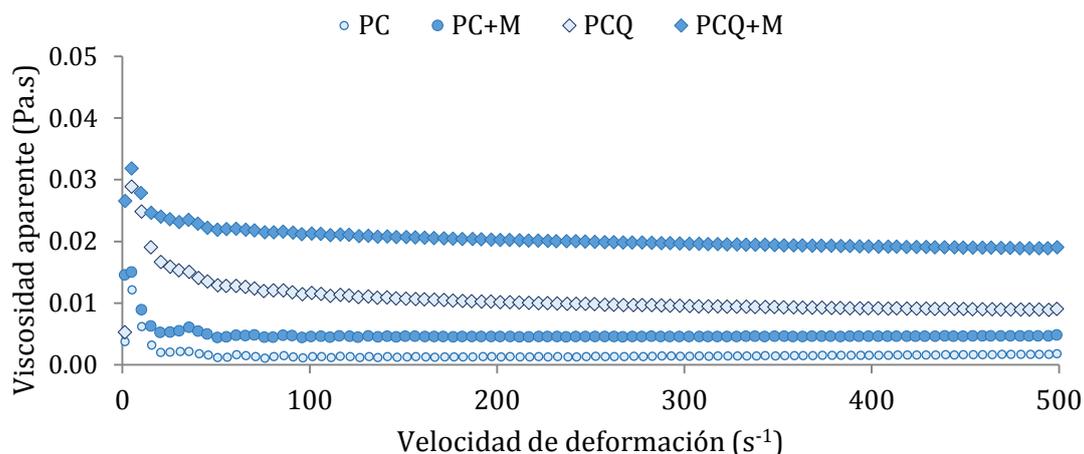


Figura 3.6. Efecto de la adición de maltodextrina y la formación de una bicapa interfacial sobre las propiedades reológicas de emulsiones O/W con aceite de chía y lecitinas de girasol modificadas (LGD, FPPC) (n=3)

Estabilidad global

La estabilidad global de los sistemas estudiados fue evaluada en función del almacenamiento refrigerado durante 60 d a través de la respectiva caracterización óptica de los mismos. La evolución de los perfiles de “Back Scattering” (BS) en función de la longitud del tubo de muestra se observa en la **Figura 3.7**. Dichos perfiles constituyen la huella digital macroscópica de la emulsión en un momento dado (Mengual y col., 1999) y posibilitan la obtención de información objetiva sobre el/los procesos de desestabilización de la misma.

El cremado fue detectado en virtud de la variación de la concentración de las gotas entre las zonas superior e inferior de la celda de medida. Las gotas de la fase dispersa (aceite) registraron un movimiento ascendente dada su menor densidad respecto del líquido circundante lo cual se visualizó a través de una zona de %BS inferior al %BS inicial (~0-3 cm del tubo). Luego se registró una zona de %BS superior al %BS inicial (~5,5-6 cm del tubo) correspondiente a la aparición de una fase crema con una alta concentración de gotas de aceite (**Figura 3.7.a**). Así, las *emulsiones monocapa* (L, L+M, PC, PC+M) presentaron signos de inestabilidad al cabo de 5 d en la base del tubo (se observó clarificación) debido a cremado y posterior formación de la fase crema. (**Figura 3.7.a, b, c, d**). El cremado podría estar asociado a un mayor movimiento de las gotas de aceite de estos

sistemas causado por fuerzas viscosas débiles. Con respecto a la adición de maltodextrina, los sistemas L+M, PC+M, presentaron perfiles de BS similares a los de las emulsiones obtenidas en su ausencia.

Las *emulsiones O/W bicapa* (**Figura 3.7.e, f**) registraron perfiles de BS sin alteraciones significativas como las anteriormente descritas durante el periodo de almacenamiento, lo que denota una buena estabilidad física asociada a estos sistemas. Este hecho podría estar relacionado con el mayor nivel de viscosidad aportado por la adición de quitosano en estos casos, lo que reduce la movilidad ascendente de las gotas de aceite de chía de acuerdo a la ley de Stokes. Así, el quitosano puede actuar como un buen agente estabilizante de emulsiones O/W al tener la capacidad de adsorberse en la interfase aceite-lecitina modificada de girasol-agua protegiendo al sistema frente al cremado y la coalescencia, además de contribuir a la estabilidad electrostática mediante fuerzas de repulsión de las gotas de aceite. Estos resultados están de acuerdo con los informados por Guzey y McClements (2006). En el caso de las emulsiones secundarias, la presencia de maltodextrina (M) registró leves indicios de coalescencia, especialmente en PCQ+M.

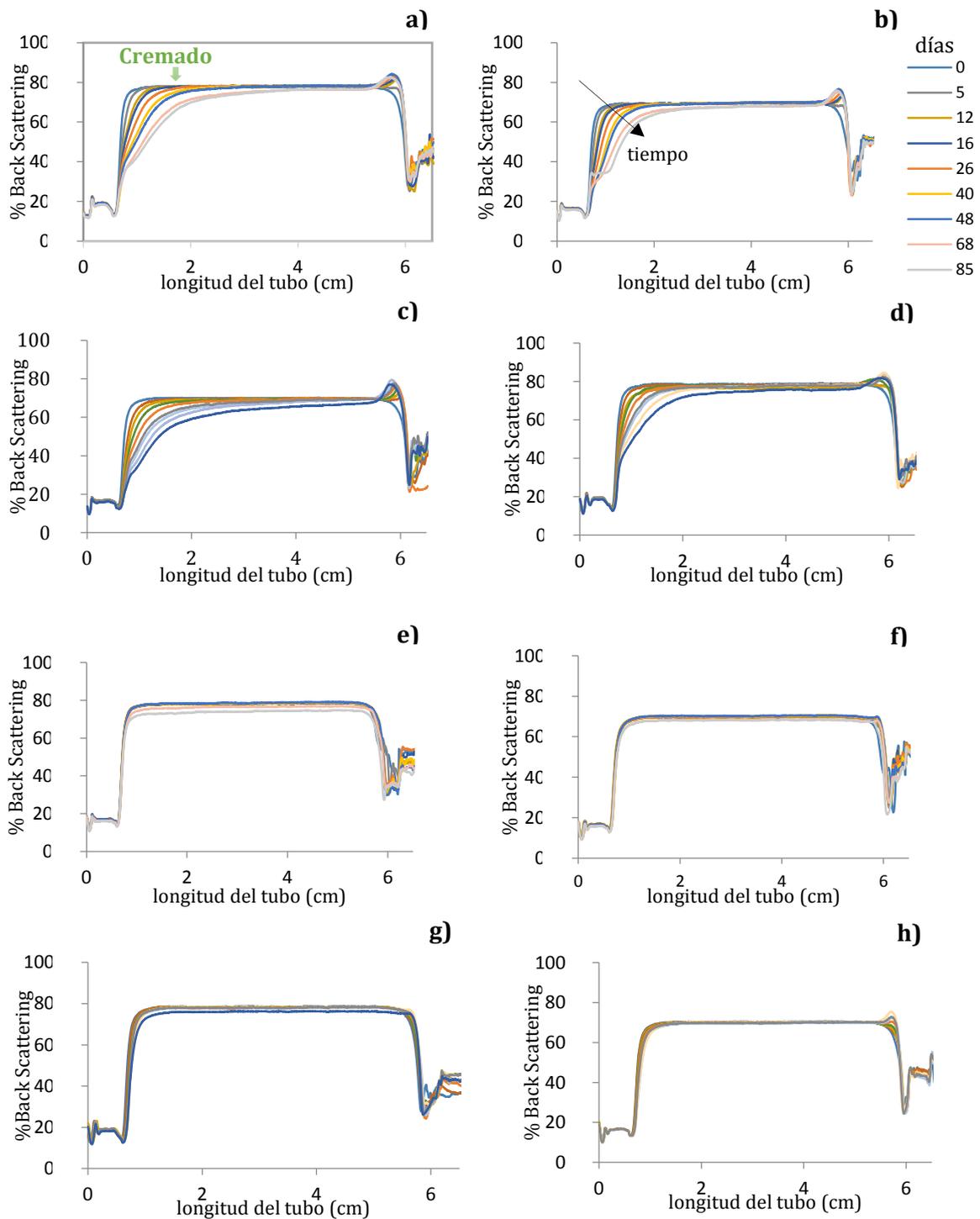


Figura 3.7. Perfiles de “Back Scattering” (%BS vs. longitud del tubo) de emulsiones O/W con aceite de chía **a) L b) L+M c) PC d) PC+M e) LQ f) LQ+M g) PCQ h) PCQ+M**, en función del tiempo de almacenamiento a 4 ± 1 °C

En cuanto al proceso de desestabilización por cremado, en la **Figura 3.8** también puede visualizarse su incidencia en términos del respectivo índice.

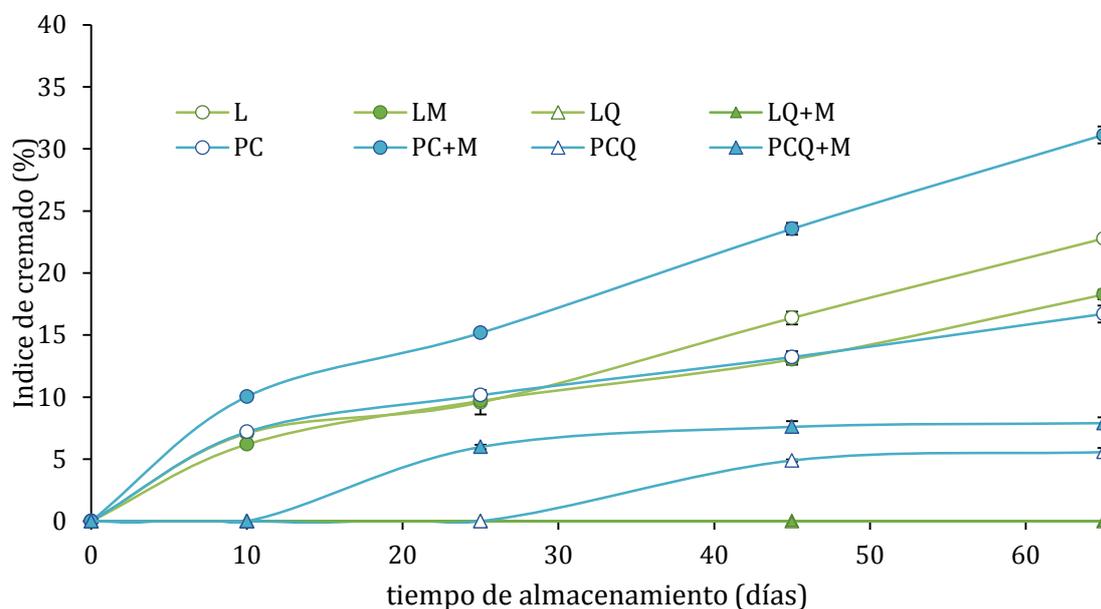


Figura 3.8. Evolución del Índice de cremado (%) en función del almacenamiento a 4 ± 1 °C de emulsiones O/W mono y multicapa con aceite de chía

Determinación de productos primarios y secundarios de oxidación

La **Figura 3.9** muestra la evolución de los valores de PV correspondientes a las emulsiones monocapa, bicapa y aceite de chía (sin emulsionar) en función del almacenamiento a 4 ± 1 °C sin exposición a la luz. El nivel inicial de hidropéroxidos en las emulsiones fue bajo (0,8 -1,7 meq hidropéroxidos/kg de aceite) indicando que el proceso de emulsificación no causó incrementos significativos en el contenido de productos primarios de oxidación. La estabilidad oxidativa de las emulsiones bicapa fue significativamente ($p \leq 0,05$) mayor a la registrada para los sistemas monocapa y el aceite de chía sin emulsionar al cabo de 80 días de almacenamiento. Así, los mayores valores de PV registrados en el caso de las emulsiones monocapa estudiadas, cargadas negativamente (-36 mV), podrían estar asociados a fuerzas de atracción relacionadas con un incremento de la concentración de metales de transición -en particular el hierro (Fe^{2+} , Fe^{3+})- ya que constituyen agentes prooxidantes de emulsiones O/W (Klinkesorn y col., 2005b). En contraste, los menores valores de PV obtenidos para los sistemas bicapa podrían sugerir que las gotas cargadas positivamente (+47-55

mV) posibilitan la disminución de las interacciones aceite-agente prooxidante, debido a la existencia de fuerzas repulsión debidas a cargas de igual signo. Asimismo, la mayor estabilidad exhibida por estos sistemas podría estar vinculada al mayor espesor del “film” interfacial de los mismos, lo cual puede contribuir además a la reducción de las interacciones previamente comentadas.

Adicionalmente, los productos secundarios de oxidación monitoreados a partir de los valores de TBARs registraron bajos niveles para todos los sistemas estudiados, sin cambios significativos durante el periodo de almacenamiento (datos no mostrados). Por otra parte, la adición de maltodextrina no registró efectos significativos sobre la generación de productos primarios y secundarios de oxidación lipídica en ambos tipos de sistemas (monocapa, bicapa).

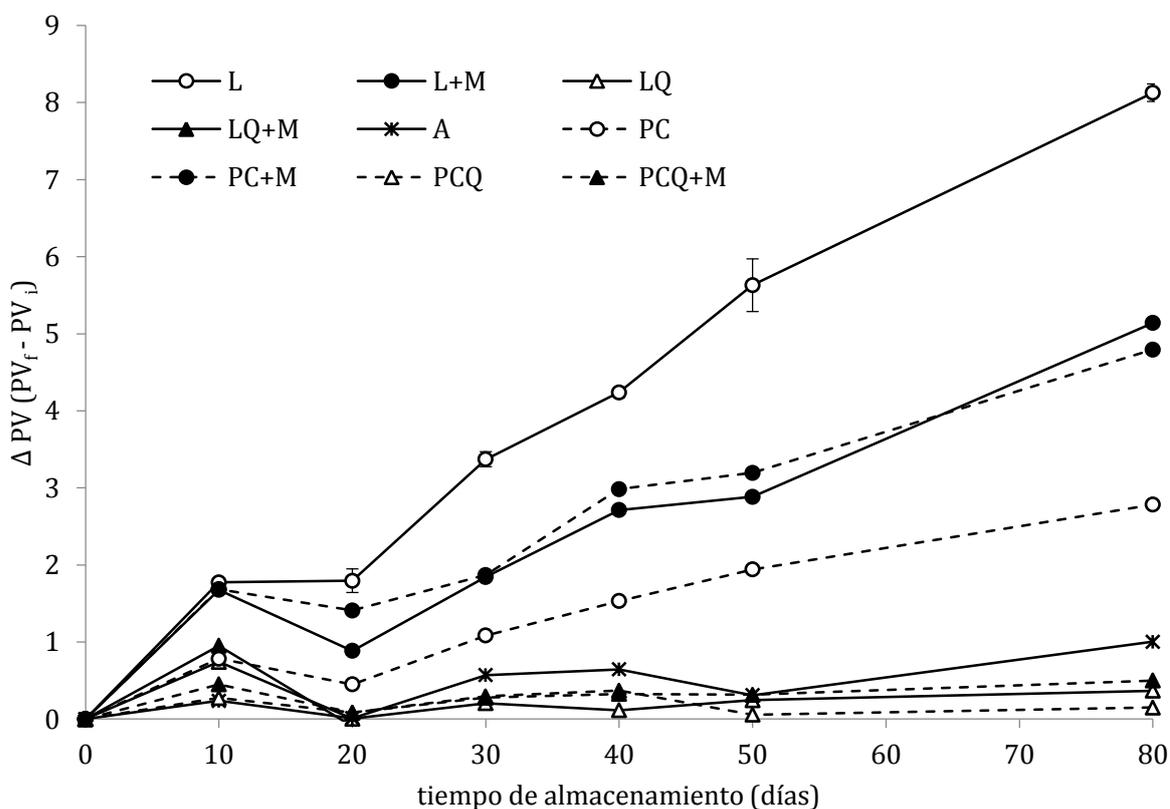


Figura 3.9. Evolución de productos primarios de oxidación de emulsiones O/W monocapa (L, L+M, PC, PC+M), bicapa (LQ, LQ+M, PCQ, PCQ+M) y aceite de chía sin emulsionar (A) en función del almacenamiento a 4 ± 1 °C

4. Conclusiones parciales

Obtención y caracterización de emulsiones O/W mediante la técnica de deposición electrostática “layer-by-layer” (LBL) con aceite de chía. Influencia del tipo de lecitina de girasol modificada, la adición de quitosano y maltodextrina

- Se obtuvieron y caracterizaron emulsiones O/W de aceite de chía con interfases **monocapa** - mediante la adición de lecitinas modificadas de girasol por “deoiling” (LGD) y por fraccionamiento de la lecitina nativa (FPC) - y **bicapa** a través de la técnica de LBL (“layer-by-layer”) con el agregado de quitosano, en presencia o ausencia de maltodextrina.
- La **deposición electrostática de quitosano** sobre las membranas interfaciales constituidas por lecitina de girasol “deoiled” (LGD) o bien por la fracción enriquecida en fosfatidilcolina (FPC) pudo ser evidenciada mediante la inversión de carga eléctrica superficial de las gotas de aceite, la cual varió desde ~ -36 a $\sim +47$ mV o bien desde ~ -37 a $\sim +55$ mV, respectivamente.
- Las emulsiones estabilizadas con LGD presentaron distribuciones mono y bimodales para las emulsiones O/W primarias (L, L+M) y secundarias (LQ, LQ+M), respectivamente. El empleo de FPC registró un comportamiento monomodal para los sistemas PC, PCQ; bimodal en el caso de PC+M y trimodal para PCQ+M.
- El diámetro medio de las partículas fue dependiente ($p \leq 0,05$) de la adición de quitosano y de maltodextrina. En ambos casos, la adición de estos ingredientes produjo un incremento del tamaño de las partículas, siendo significativa la interacción entre los factores tipo de lecitina modificada de girasol-adición de maltodextrina. La adición de quitosano y el tipo de lecitina de girasol modificada empleado así como su interacción, tuvo una influencia significativa

en la polidispersidad. Un menor nivel de este parámetro se registró en emulsiones monocapa respecto de las emulsiones bicapa.

- Los sistemas estabilizados por bicapas interfaciales presentaron una microestructura más compacta, relacionada con un menor movimiento de las gotas de aceite por el aumento de la viscosidad de la fase acuosa (adición de quitosano), especialmente en los sistemas LQ+M y PCQ+M.
- La incorporación de quitosano y de maltodextrina tuvieron un efecto significativo ($p \leq 0,05$) sobre los parámetros reológicos analizados. El tipo de lecitina de girasol modificada empleada solo afectó el índice de comportamiento de flujo. La interacción entre la adición de quitosano y de maltodextrina fue significativa en todos los sistemas estudiados. El agregado de maltodextrina produjo un incremento de la η_{100} de las emulsiones, especialmente notorio en las emulsiones secundarias. Asimismo, las emulsiones bicapa -especialmente las emulsiones con maltodextrina (LQ+M, PCQ+M) - presentaron niveles de η_{100} significativamente mayores ($p \leq 0,05$) respecto a los sistemas monocapa.
- Las emulsiones bicapa (LQ, LQM, PCQ, PCQ+M) registraron valores de $n < 1$ denotando un comportamiento pseudoplástico asociado al agregado de quitosano a la fase acuosa de estos sistemas. Por otra parte, los sistemas monocapa (L, L+M, PC, PC+M) presentaron un comportamiento newtoniano con valores de $n \sim 1$.
- En cuanto a la estabilidad global, las emulsiones O/W bicapa registraron perfiles de BS sin alteraciones significativas durante el periodo de almacenamiento, exhibiendo una mejor estabilidad física respecto de las emulsiones monocapa. Este hecho podría estar relacionado con el mayor nivel de viscosidad aportado por la adición de quitosano en estos casos. En términos de estabilidad oxidativa, las emulsiones bicapa presentaron un mayor nivel de este parámetro que los sistemas monocapa y el aceite de chía sin emulsionar. La bicapa interfacial ofreció protección frente a la oxidación lipídica actuando

como barrera ante la penetración y difusión de agentes prooxidantes (metales de transición) debido a su mayor espesor y la naturaleza catiónica de las gotas de aceite generando fuerzas de repulsión.

Estos resultados sugieren que las emulsiones O/W con aceite de chía estabilizadas por membranas interfaciales lecitinas de girasol modificadas-quitosano pueden ser empleadas para producir emulsiones de buena estabilidad física y oxidativa a ser aplicadas en el desarrollo de alimentos funcionales.

5. Difusión de Resultados

Presentaciones en congresos y/o jornadas

- **Physicochemical Stability of Chia Seed Oil Bi-layer Emulsions.** Luciana M. Julio, Vanesa Y. Ixtaina, Susana M. Nolasco, Mabel C. Tomás. 107th AOCS Annual Meeting and Expo, 1 al 4 de Mayo de 2016, Salt Lake City, Utah, USA.
- **Chia Seed Oil Bi-layer emulsions with modified sunflower lecithin.** Luciana M. Julio, Claudia N. Copado, Susana M. Nolasco, Vanesa Y. Ixtaina, Mabel C. Tomás. AOCS 2017 Annual Meeting and Industry Showcases, 30 de Abril al 3 de Mayo de 2017, Orlando, USA.

CAPÍTULO 4



Aplicación de emulsiones O/W mono y multicapa en la microencapsulación de aceite de chía

1. Introducción

En la actualidad, debido a sus efectos benéficos para la salud, los aceites con altos tenores de ácidos grasos ω -3 son empleados como ingredientes funcionales en un número cada vez mayor de productos. Si bien el alto grado de insaturación de estos aceites le confiere un gran valor nutricional y nutracéutico, los hace susceptibles a la oxidación lipídica (Drusch y col., 2007). Tal como se ha desarrollado previamente en los **Capítulos 2 y 3**, las emulsiones O/W mono y/o multicapa constituyen una alternativa válida para la protección de estos aceites, así como para su inclusión en diversas matrices alimentarias. Ahora bien, otro sistema de vehiculización de estos compuestos - obtenido a partir dichas emulsiones - puede estar constituido por un polvo sólido en el cual los aceites estén microencapsulados.

Cabe señalar que si bien las emulsiones O/W pueden dispersarse con facilidad en alimentos hidrofílicos, su almacenamiento puede requerir ciertas condiciones para evitar la posible ocurrencia de mecanismos de desestabilización fisicoquímica y/o deterioro de tipo microbiano. Además, su manejo y almacenamiento puede tener aparejado un incremento en el costo asociado al producto final. A fin de superar tales dificultades, las emulsiones O/W pueden ser deshidratadas mediante diversas metodologías (Taneja y Singh, 2012). De esta manera, el aceite microencapsulado en polvo producido adecuadamente a partir de emulsiones O/W estabilizadas por una membrana interfacial monocapa o multicapa, puede extender su estabilidad física y oxidativa de forma adicional. Asimismo, el proceso de microencapsulación posibilita su incorporación en distintas matrices alimentarias mediante la adición de polvos de buena calidad, baja actividad de agua, mayor facilidad de manipulación y almacenamiento (Matsuno y Adachi, 1993; Carneiro y col., 2013).

Para ello, en principio se preparan emulsiones O/W las cuales posteriormente son secadas por aspersión (“spray-drying”) o liofilización a fin de obtener polvos del aceite microencapsulado en los cuales las gotas de aceite se encuentran rodeadas por una matriz deshidratada de proteínas y/o carbohidratos (Márquez-Ruiz y col., 2003). Así, debe obtenerse una emulsión O/W la cual debe ser físicamente estable empleando diversos dispositivos de homogeneización (homogeneizador de alta presión, microfluidizador, Ultraturrax), siendo la misma

subsiguientemente deshidratada por secado por aspersión o liofilización. En otros casos, puede obtenerse una pre-emulsión mediante un mezclador de alta velocidad (Ultraturrax) y posterior secado. La obtención de un polvo de aceite microencapsulado homogéneo y físicamente estable es más factible mediante la aplicación del primer método (Jacobsen y col., 2013).

La aplicación de la formulación y el proceso apropiado para obtener emulsiones estables antes de su conversión a polvo es esencial en la preparación de aceites microencapsulados. Las características de la emulsión O/W tales como el contenido de sólidos totales, el tipo de material de pared y del núcleo, así como las condiciones de procesamiento (temperatura, pH, velocidad de secado) empleados en la obtención de aceite rico en ácidos grasos ω -3 en polvo, pueden tener influencia sobre las propiedades de las microcápsulas y su estabilidad. Además, aunque la etapa de secado es sólo uno de los pasos involucrados en el proceso de microencapsulación, el control de los parámetros operativos durante la misma también puede registrar un impacto significativo sobre las propiedades físicas de las microcápsulas obtenidas (Sanguansri y Augustin, 2007).

En los últimos años, el énfasis principal de la microencapsulación de agentes saborizantes y de aceites a ser incorporados en alimentos, se ha focalizado en mejorar la eficiencia del proceso (reducción de la cantidad de aceite no encapsulado dispuesto sobre la superficie de las partículas de polvo), a fin de extender la vida útil de los productos. En este sentido, la emulsificación juega un papel clave en la optimización de la eficiencia de encapsulación de los ingredientes funcionales mencionados (Jafari y col., 2008 a).

Las proteínas y carbohidratos son materiales utilizados frecuentemente en la microencapsulación de aceites con ácidos grasos ω -3. Los mismos, pueden ser empleados en forma individual o combinados con otros componentes tales como antioxidantes, agentes quelantes y surfactantes, para ofrecer ciertas funciones ya sea durante la producción de las microcápsulas o en el producto final (Sanguansri y Augustin, 2007). Recientemente la tecnología de deposición electrostática “*layer-by-layer*” ha sido aplicada en la formación de diversas membranas interfaciales multicapa, a fin de estabilizar emulsiones O/W e incrementar su protección frente a la oxidación lipídica así como microencapsular agentes saborizantes o aceites sensibles mediante el secado de las mismas (Jacobsen y col., 2013).

La mayor parte de los trabajos de investigación en la literatura vinculados a la microencapsulación de aceites ricos en ácidos grasos poliinsaturados utilizan aceites de pescado o de lino como material del núcleo (Jafari y col., 2008a; Carneiro y col., 2013). Sin embargo, la información disponible sobre microencapsulación de aceite de semilla de chía aún es escasa. Rodea-González y col., (2012) estudiaron la microencapsulación de aceite de chía utilizando mezclas binarias de biopolímeros de concentrado de proteína de suero con goma arábica o goma mezquita. Dichos autores encontraron que la eficiencia de microencapsulación fue superior al 70% para todas las microcápsulas y tanto la matriz binaria de los biopolímeros como las emulsiones reconstituidas fueron estables frente a la coalescencia de las gotas. Noello y col. (2016) obtuvieron microcápsulas con aceite de chía mediante el secado “spray” de emulsiones O/W multicapas estabilizadas mediante concentrados de proteínas de suero y de proteínas-pectina, usando además maltodextrina (10 DE) y almidón modificado. La eficiencia de microencapsulación fue de aproximadamente 99% y la estabilidad oxidativa de todos los polvos mayor a la del aceite sin microencapsular.

1.1. Técnicas de microencapsulación

Existen numerosas técnicas de microencapsulación de aceites omega-3, las cuales pueden clasificarse a partir del material de partida previo a la microencapsulación. Así, los métodos pueden clasificarse en técnicas de microencapsulación a base de una emulsión (por ej. secado por aspersion o “spray drying”, liofilización, secado por enfriamiento o “spray cooling”, atrapamiento en liposomas y coacervación) y microencapsulación no basada en una emulsión (extrusión, técnicas de fluidos supercríticos).

1.1.1. Secado por aspersion

El secado por aspersion es una de las técnicas de microencapsulación más antiguas y ampliamente utilizadas en la industria alimentaria. Alrededor del 80-90% de los ingredientes microencapsulados en la industria alimentaria moderna son obtenidos mediante secado por aspersion (Porzio, 2007). El polvo resultante posee partículas de tamaños entre 10-50 μm (Gharsallaoui y col., 2007; Nedovic y

col., 2011), por lo cual podría ser añadido a matrices alimentarias sin influir significativamente sobre la sensación bucal.

La aplicación del secado por aspersión en la microencapsulación a base de una emulsión consta de tres pasos básicos (Dziezak, 1988): la preparación de la dispersión o emulsión a procesar, la homogeneización de la dispersión y la atomización de la emulsión en la cámara de secado. Adicionalmente, Shahidi y Han (1993) sugirieron de forma más detallada que la microencapsulación mediante secado por aspersión involucra cuatro etapas: la preparación de la dispersión, la homogeneización de la misma, la atomización de la emulsión y la deshidratación de las partículas atomizadas. En la primera etapa se emulsifica el ingrediente del núcleo con una dispersión de los materiales de pared. Se han empleado diferentes sistemas, tales como emulsiones O/W de una o varias capas, para microencapsular aceites con ω -3.

Previo a la etapa de secado, es conveniente que la emulsión formada sea estable durante un cierto periodo de tiempo (Liu y col., 2001), que las gotas de aceite sean pequeñas con una distribución monomodal y que la viscosidad sea lo suficientemente baja para evitar la inclusión de aire (Drusch, 2006). La viscosidad y la distribución de tamaño de partículas de las emulsiones previo secado tienen efectos significativos sobre la microencapsulación mediante “spray drying”. Altas viscosidades interfieren con el proceso de atomización y conducen a la formación de gotas grandes y alargadas, las que afectan negativamente la velocidad de secado (Rosenberg, y col., 1990).

La etapa de secado de las emulsiones es particularmente importante dado que las partículas de polvo se forman en la cámara de secado por lo tanto, allí se controla el tamaño de partícula. La emulsión O/W se atomiza en una corriente de aire caliente suministrado a la cámara de secado y la evaporación del disolvente, usualmente agua, conduce a la formación de las microcápsulas. Debido a que las partículas pulverizadas caen a través de un medio gaseoso, adoptan una forma aproximadamente esférica (Dziezak, 1988). El corto tiempo de exposición y la rápida evaporación del agua mantienen la temperatura del núcleo por debajo de 40 °C, a pesar de las altas temperaturas aplicadas en el proceso general (Dubernet y Benoit, 1986).

A fin de obtener una buena eficiencia de microencapsulación, aun habiendo seleccionando un adecuado material de pared, deben utilizarse condiciones óptimas de secado por aspersión. En este sentido, los factores más importantes a ser optimizados son la temperatura de alimentación y las temperaturas de entrada y salida del aire (Liu y col., 2004). La temperatura de alimentación modifica la viscosidad de la emulsión, su fluidez y por lo tanto, su capacidad para ser pulverizada de forma homogénea. Así, un aumento de esta temperatura, podría causar la reducción de la viscosidad y el tamaño de gotas; sin embargo, temperaturas muy elevadas podrían causar la volatilización o degradación de los ingredientes sensibles al calor. La velocidad de alimentación es controlada de forma tal que asegure que cada gota pulverizada alcance el nivel de secado deseado antes que entre en contacto con la superficie de la cámara de secado.

La elección apropiada de la temperatura de entrada del aire es importante ya que la misma es directamente proporcional a la velocidad de secado y al contenido de agua final de la microcápsula (Zbicinski y col., 2002). Cuando la temperatura de entrada del aire es baja, puede traducirse en una baja velocidad de evaporación, lo cual puede provocar la formación de microcápsulas con membranas de alta densidad, alto contenido de agua, baja fluidez y una mayor facilidad de aglomeración. Por otra parte, altas temperaturas de entrada de aire pueden causar una evaporación excesiva y grietas de la membrana, induciendo como consecuencia la liberación anticipada del ingrediente microencapsulado y también la pérdida de volátiles (Zakarian y King, 1982). Así, la temperatura de entrada del aire es usualmente determinada considerando la temperatura a la cual pueden ser sometidos los ingredientes sin ser dañados y el costo comparativo de las fuentes de calor (Fogler y Kleinschmidt, 1938).

La temperatura al final de la zona de secado, también llamada en la literatura como temperatura de escape o temperatura de salida del aire, obtenida bajo condiciones dadas, puede ser considerada como el índice de control del secador. De forma contrapuesta a la temperatura de entrada del aire, este parámetro no puede ser controlado directamente ya que depende de las características de secado de los ingredientes y de la temperatura de entrada del aire. La temperatura de salida del aire adecuada para la microencapsulación de ingredientes alimentarios tales como agentes saborizantes se ha informado entre

50-80 °C. Las mejores condiciones de secado por aspersión están relacionadas con una adecuada temperatura del aire, elevadas concentraciones de sólidos en la emulsión y fácil pulverización y secado, para obtener partículas finales sin expansión ni grietas (Bimbenet y col., 2002).

El proceso de “spray drying” aplicado en la obtención de ingredientes microencapsulados es económico, flexible y requiere de equipos disponibles en la industria alimentaria. Además, pueden emplearse como materiales de pared una amplia variedad de proteínas y carbohidratos. Sin embargo, el proceso puede no ser reproducible al emplear diferentes equipos. Asimismo, pueden registrarse dificultades en el control del tamaño de partículas obtenido debido a la falta de uniformidad de las condiciones en la cámara de secado (Nedovic y col., 2011). La carga del ingrediente encapsulado (carga útil) usualmente ronda el 20-30 % y en algunos casos, el contenido de aceite superficial puede ser relativamente alto con impacto negativo a nivel sensorial (Jacobsen y col., 2013).

1.1.2. Secado por liofilización

El proceso de liofilización puede emplearse para el secado de ingredientes sensibles ya que es un método de secado suave a baja temperatura. Por lo tanto, constituye un método útil para la preparación de productos que contienen aceites ricos en ácidos grasos ω -3 (Heinzelmann y col., 2000).

La liofilización es un proceso utilizado para la microencapsulación de un gran número de materiales sensibles al calor. Se ha aplicado en la microencapsulación de esencias solubles en agua, aromas naturales e incluso ciertos fármacos (Desai y Park, 2005). En la actualidad, en la industria de alimentos es empleada en productos de alto valor agregado tales como el café, sopas instantáneas y rellenos para bombones (Alvarez Cerimedo, 2013).

En una primera etapa, la emulsión O/W de partida se congela a temperaturas entre -90 y -40° C. La congelación de los productos debe realizarse de manera tal que garantice alteraciones mínimas en el proceso posterior de sublimación. En una segunda etapa, el material congelado es colocado en bandejas para luego ser deshidratado por sublimación del hielo a bajas presiones y temperaturas (entre -90 y -40°C). El flujo de vapor formado pasa de la cámara de liofilización al condensador y el agua resultante se retira del equipo. Durante la

sublimación, la velocidad máxima de remoción del hielo tiene lugar al principio del proceso. Luego, se forma una capa porosa de material seco que opone resistencia al flujo de calor y vapor. La velocidad de sublimación disminuye hasta hacerse cero y en la etapa final el agua se pierde por desorción. Después del secado, se obtiene un sólido frágil que puede romperse en partículas más pequeñas, por ejemplo, mediante trituración. La liofilización ocurre a bajas temperaturas (con el sistema congelado), lo que enlentece cualquier proceso químico de deterioro y entre ellos la mayoría de las reacciones de oxidación (Cerqueira y col., 2007).

Si bien el costo y el tiempo de procesamiento de la liofilización son mayores que el secado por aspersion, esta técnica no genera condiciones oxidativas lo cual la hace adecuada para el tratamiento de ingredientes sensibles de alto valor. De esta manera, el aumento en el costo del proceso puede compensarse con un mejor perfil organoléptico del producto y la obtención de un polvo de mejor calidad (Zuidam y Shimoni, 2010; Jacobsen y col., 2013).

1.2. Materiales de pared

La obtención de microcápsulas con buena estabilidad oxidativa a partir de un proceso con alta eficiencia de microencapsulación, están estrechamente relacionados con la composición del material de pared (Gharsallaoui y col., 2007). Este proceso a menudo se realiza usando biopolímeros de diferentes fuentes, como gomas naturales, proteínas, maltodextrinas con diferente equivalente de dextrosa (DE), ceras y sus mezclas.

Los carbohidratos son buenos agentes encapsulantes, ya que poseen buena solubilidad y baja viscosidad a elevados contenidos de sólidos. Sin embargo, exhiben bajas propiedades interfaciales las cuales son importantes para obtener una alta eficiencia de microencapsulación. Por esta razón, los carbohidratos en general se utilizan en combinación con otros materiales tales como proteínas o gomas. El carácter anfífilico y las propiedades emulsificantes de las proteínas ofrecen las características necesarias para encapsular aceites con alto contenido de ácidos grasos ω -3. Por ello, la aplicación de mezclas proteínas-carbohidratos como materiales de pared pueden ser una excelente opción (Gharsallaoui y col., 2007).

Los criterios para la selección de un material de pared se basan principalmente en las propiedades físico-químicas tales como la solubilidad, peso

molecular, transición vítrea, cristalinidad, capacidad de difusión, formación de películas y propiedades emulsificantes, debiéndose considerar también los costos.

En los últimos años, se han desarrollado novedosos métodos de microencapsulación basados en la tecnología de ingeniería interfacial con el fin de mejorar la calidad de los polvos. Entre ellos, la técnica de deposición electrostática “*layer-by-layer*” se ha implementado de manera efectiva para lograr emulsiones O/W estables desde el punto de vista fisicoquímico e ingredientes microencapsulados mediante membranas interfaciales multicapa (Gharsallaoui y col., 2012).

1.3. Oxidación de lípidos en aceites microencapsulados

La oxidación lipídica de aceites microencapsulados es un proceso complejo que puede presentar diferencias respecto del aceite a granel. La ocurrencia del mismo depende de ciertos factores tales como los materiales constituyentes de la microcápsula, la presencia de antioxidantes, el contenido de humedad. Así, la oxidación de lípidos provenientes de leche microencapsulados en una matriz de maltodextrina y caseinato de sodio ocurrió de forma más lenta que la registrada en los lípidos como tales, ya sea en presencia de luz o de oscuridad (Hardas y col., 2002). Ahora bien, la diferenciación entre el aceite libre y el aceite encapsulado, así como el control de la estabilidad oxidativa de ambos, son datos útiles para comprender la oxidación lipídica en aceite microencapsulado en polvo y extender su vida útil.

En comparación con las emulsiones O/W, los aceites microencapsulados pueden presentar una mayor estabilidad oxidativa. Sin embargo, estos sistemas pueden ser propensos a registrar oxidación lipídica debido a la imposibilidad de obtener un 100% de eficiencia de microencapsulación, una relación grande de área superficial/volumen de aceite y un tamaño variable de vacuolas en las partículas de polvo. Por ello, los polvos de aceite microencapsulados producidos a partir de emulsiones O/W estabilizadas por una membrana interfacial monocapa o multicapa han sido desarrollados para aumentar adicionalmente la estabilidad física y oxidativa de polvos de aceite microencapsulados.

En este Capítulo se investiga la aplicación del proceso de microencapsulación mediante el secado por aspersion de emulsiones O/W

convencionales analizando el efecto de las condiciones del proceso y del empleo de distintos materiales de pared sobre las propiedades fisicoquímicas del material encapsulado. Asimismo, se describe la microencapsulación del aceite de chía mediante el secado por liofilización de emulsiones O/W multicapa, realizando su respectiva caracterización.

2. Materiales y Métodos

2.1. Materiales y reactivos

El aceite de chía empleado en el presente trabajo fue provisto por Nutracéutica Sturla S.R.L. (Argentina). El aceite fue obtenido por prensado en frío y almacenado a $4\pm 1^\circ\text{C}$ en botellas de vidrio de color ámbar sin cámara de aire. La composición de ácidos grasos del aceite determinada por análisis GC fue la siguiente: 16:0 7,2 %, 18:0 3,8 %, 18:1 5,2 %, 18:2 19,1 % y 18:3 64,7 %. El caseinato de sodio y la D-lactosa monohidratada fueron adquiridos a Sigma Chemical Company (St. Louis, MO) y Anedra (Argentina), respectivamente. El quitosano (Ch) fue suministrado por Sigma Chemical Company (St. Louis, MO), la maltodextrina DE 13-17% (M) por Productos de Maíz S.A. (Argentina) y la lecitina nativa de girasol de la industria aceitera local Vicentin S.A.I.C. (Argentina). Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

El mucílago (Mg) y una fracción rica en proteínas (PRF) de chía fueron obtenidos mediante las metodologías propuestas por Segura-Campos y col. (2014) y Vázquez-Ovando y col. (2012), respectivamente. La composición proximal del Mg y de la PRF se determinaron de acuerdo con los procedimientos estándar de la AOAC (AOAC, 1995) previamente descriptos en el **Capítulo 2, sección 2.1**.

Las lecitinas modificadas de girasol (fracción enriquecida en fosfatidilcolina (FPC) y la lecitina de girasol “deoiled” LGD), fueron obtenidas de acuerdo a la metodología descrita por Cabezas (2010) como se detalló en el **Capítulo 3, sección 2.2**. La composición de fosfolípidos de las lecitinas de girasol modificadas fue determinada mediante ^{31}P NMR y expresadas en términos de concentración molar (mol/100 mol de lecitina), las mismas se presentaron en el **Capítulo 3, sección 2.2.1**.

2.2. Obtención de microcápsulas de aceite de chía

2.2.1. Microencapsulación de aceite de chía mediante secado por aspersión de emulsiones O/W convencionales

A fin de evaluar la influencia de las condiciones operativas involucradas en la obtención de microcápsulas de aceite de chía, se prepararon emulsiones O/W convencionales que posteriormente fueron deshidratadas mediante secado “spray” aplicando las condiciones de homogeneización y secado que se detallan en la

Tabla 4.1. Se obtuvieron emulsiones O/W con 10% p/p de aceite de chía, 10% p/p de caseinato de sodio y 10% de lactosa tal como se describió previamente en el **Capítulo 2, sección 2.2**. Se aplicaron dos etapas de homogeneización usando un Ultraturrax T25 (Janke & Kunkel GmbH, Staufen, Alemania) (10.000 rpm, 60 s) y un homogeneizador a válvula de alta presión (Panda 2K, GEA Niro Soavi, Parma, Italia) a dos niveles de presión de homogeneización (400 ó 600 bar). Seguidamente, las emulsiones O/W fueron secadas por aspersion en un secador “spray” Buchi Mini B-191 (Buchi Labortechnik, Flawil, Suiza) equipado con una boquilla de 0,5 mm de diámetro. La velocidad de alimentación fue de 0,6 L/h y se emplearon dos combinaciones de temperaturas de entrada/salida del aire 135/70°C y 170/90 °C.

Tabla 4.1. Codificación de las muestras y condiciones operativas empleadas en las etapas de homogeneización y secado por aspersion durante la obtención de microcápsulas con aceite de chía (CS, caseinato de sodio; L, lactosa)

Condiciones de emulsificación	Condiciones de secado	Concentración % p/p		
		CS	L	Aceite de chía
Presión de homogeneización (bar)	T entrada/salida de aire (°C)			
400	135/70	10	10	10
400	170/90	10	10	10
600	135/70	10	10	10
600	170/90	10	10	10

Análogamente, se obtuvo una nueva serie de microcápsulas con aceite de chía mediante el empleo de diferentes materiales de pared, evaluando el efecto de los mismos sobre las propiedades fisicoquímicas de los polvos.

A tal fin, se prepararon emulsiones O/W con aceite de chía utilizando diferentes composiciones de la fase acuosa (**Tabla 4.2**) mediante homogeneización en dos etapas como se detalló en el **Capítulo 2, sección 2.2**. Se empleó un equipo Ultraturrax (9.500 rpm, 1 min) y posteriormente un equipo Panda 2K-GEA Niro Soavi con válvula de alta presión (4 ciclos, 600 bar). Las emulsiones fueron secadas por aspersion empleando un equipo Buchi (Mini Spray drier B-191) con una boquilla de 0,5 mm de diámetro. Las temperaturas del aire de entrada y salida fueron 170 ± 5 y 90 ± 5 °C, respectivamente.

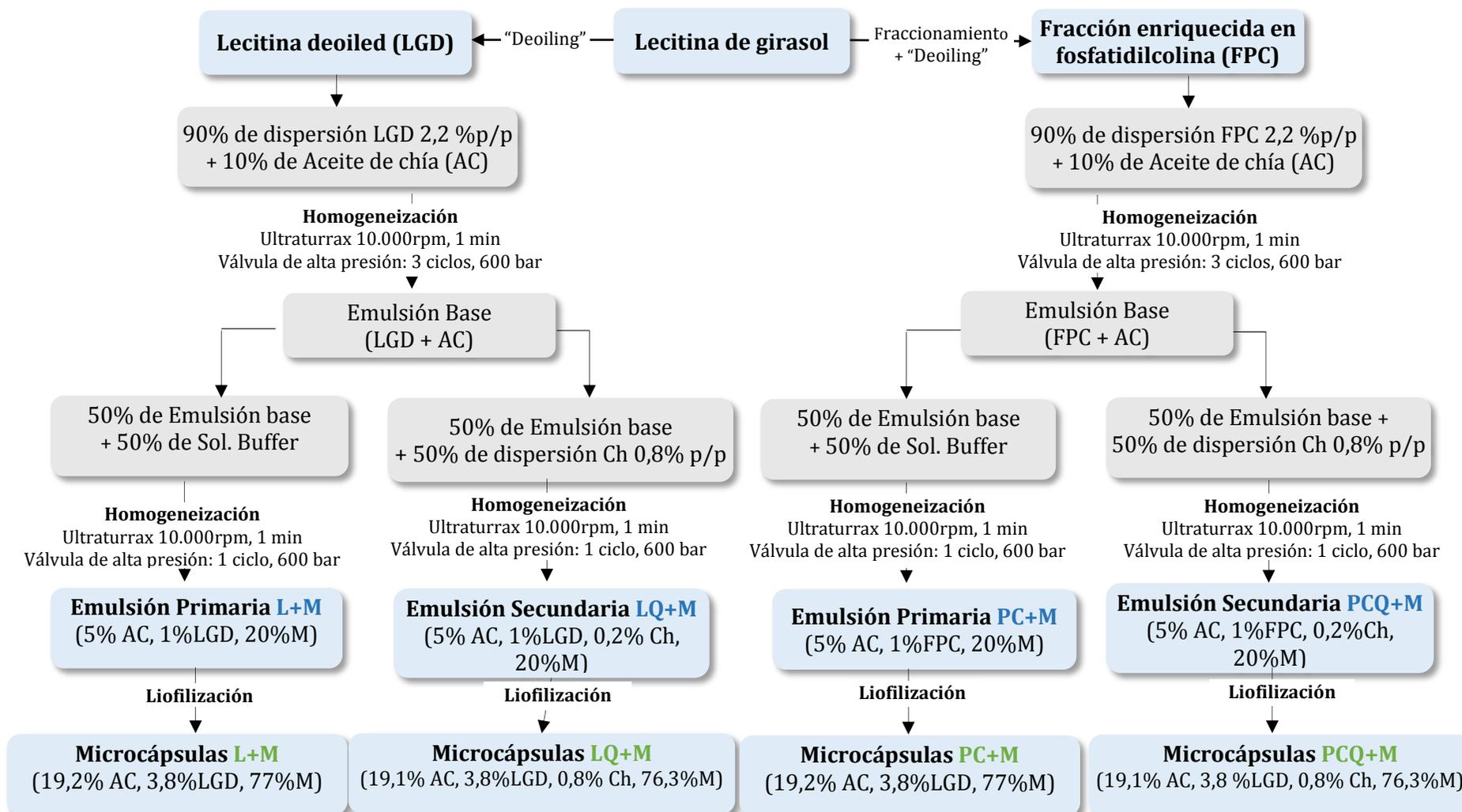
Tabla 4.2. Diseño experimental correspondiente a las diferentes formulaciones empleadas para la obtención de microcápsulas a partir del secado por aspersión de emulsiones O/W con aceite de chía

Ingredientes %p/p	Sistemas					
	1	2	3	4	5	6
Aceite de chía	10	10	10	10	10	10
Agua	70	70	70	70	70	70
FRP de chía	-	-	10	-	-	10
Caseinato de sodio	10	10	-	10	10	-
Maltodextrina	-	10	10	-	9,8	9,8
Lactosa	10	-	-	9,8	-	-
Mucílago de chía	-	-	-	0,2	0,2	0,2
Código	CL	CM	PM	CL+M	CM+Mg	PM+Mg

2.2.2. Microencapsulación de aceite de chía mediante secado por liofilización de emulsiones O/W multicapa

La obtención de microcápsulas con aceite de chía y lecitinas de girasol modificadas, aplicando la técnica de deposición electrostática “*layer-by-layer*”, se llevó a cabo a través de la liofilización de emulsiones O/W mono y multicapa (**Figura 4.1**). Inicialmente, se prepararon emulsiones O/W 95:5% p/p con aceite de chía (30% sólidos totales) y membranas interfaciales mono y bicapa, tal como se detalló en la **sección 2.3** del **Capítulo 3**. Se obtuvieron emulsiones *primarias* (L+M y PC+M) y *secundarias* (LQ+M y PCQ+M) con una concentración final de 5% p/p de aceite de chía, 1% p/p de LGD o FPC, 20% de maltodextrina y 0,2% de quitosano (en emulsiones secundarias) a partir de la homogeneización en un Ultraturrax T-25 (IKA-Labortechnik, GmbH & Co., Staufen, Alemania) (10.000 rpm, 1 min) y un homogeneizador a válvula Panda 2K (GEA Niro Soavi, Parma, Italia) (4 ciclos, 600 bar). Las emulsiones O/W primarias y secundarias se dispusieron en bandejas de 300 x 20 mm y se congelaron a -80 ± 1 °C durante 24 h. Un liofilizador escala piloto (L-A-B4-C, Rificor, Buenos Aires, Argentina) fue empleado para deshidratar las emulsiones congeladas usando 1 atm de presión de vacío durante 48 h. Finalmente, los polvos obtenidos se trituraron y tamizaron (mediante malla plástica equivalente a tamiz ASTM No. 7) a fin de estandarizar el tamaño de las partículas.

Figura 4.1. Esquema de la obtención de microcápsulas de aceite chía mediante el secado de emulsiones O/W multicapa



2.3. Caracterización de las emulsiones O/W previo secado

2.3.1. Distribución de tamaño de partícula y diámetro medio

La distribución de tamaño de partícula y el diámetro medio de las emulsiones O/W de partida fueron determinados mediante la técnica de dispersión estática de luz usando un equipo Malvern Mastersizer 2000E (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido) como se describió previamente en la **sección 2.4.1 del Capítulo 2**.

2.3.2. Propiedades reológicas

Las propiedades reológicas de las emulsiones O/W de partida fueron determinadas a $25 \pm 0,2$ °C en un reómetro oscilatorio Haake RS600 de esfuerzo controlado (ThermoElectron, Alemania) usando un sistema de sensor de platos paralelos con 1 mm de gap entre platos y velocidades de deformación entre 1-500s⁻¹. Los datos obtenidos fueron ajustados a la ley de la Potencia, tal como se describió anteriormente en la **sección 2.4.3 del Capítulo 2**.

2.3.3. Estabilidad global

La estabilidad global de las emulsiones O/W previa al secado se determinó mediante la caracterización óptica de las mismas en un analizador óptico vertical QuickScan (Beckman Coulter, Fullerton, EEUU), tal como se detalló previamente en la **sección 2.4.4 del Capítulo 2**.

2.4. Almacenamiento de las microcápsulas de aceite de chía

La estabilidad de las microcápsulas de aceite de chía en función del almacenamiento fue determinada de la siguiente manera: ~ 10 g de microcápsulas de aceite de chía y 10 g de aceite de chía a granel se colocaron en placas de Petri de vidrio (95 mm x 15 mm). Las muestras se mantuvieron abiertas para permitir el contacto con el aire y se almacenaron en una cámara con solución saturada de MgCl₂ (humedad relativa, HR=33%) a 20 ± 2 °C en oscuridad. El ensayo se llevó a cabo por duplicado, extrayendo muestras periódicamente para su análisis.

2.5. Caracterización fisicoquímica de las microcápsulas de aceite de chía

2.5.1. Contenido de humedad

El contenido de humedad de las microcápsulas de aceite de chía (2 g) se determinó gravimétricamente en una estufa de vacío (Instrumentación Científica S.A., Buenos Aires, Argentina) a 70 °C y 29 mm de Hg durante 24 h (Baik y col., 2004).

2.5.2. Actividad de agua (a_w)

La a_w de los polvos fue determinada por duplicado a $25,0 \pm 0,5$ °C utilizando un equipo Aqua-Lab (Aqua-Lab Activity Meter, Serie 3, Decágono Devices Inc., EEUU).

2.5.3. Análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La temperatura de transición vítrea (T_g) se determinó por calorimetría diferencial de barrido usando un calorímetro diferencial de barrido Q₁₀₀ (TA Instruments, Newcastle, EEUU). Se tomaron 10 mg de cada microcápsula por duplicado, las cuales fueron colocadas y selladas en cápsulas de aluminio y medidas un intervalo de 2-100 °C a una velocidad de calentamiento $\beta = 10$ °C/min en modo modulado. El cambio en la capacidad calorífica de las muestras fue registrado y los resultados fueron analizados mediante el programa TA 2000 (v.4.2E) (TA Instruments, New Castle, EEUU) (Gilles y col., 2012).

2.5.4. Eficiencia de la microencapsulación (EM %)

La fracción de aceite no encapsulado se evaluó de acuerdo al método propuesto por Augustin y col. (2015), el cual consistió en la extracción del aceite superficial (AS), considerando para el cálculo al aceite total (AT) incorporado al inicio del proceso. Para la determinación del AS se pesó 1g de cada polvo en un papel de filtro n° 4 (Whatman, Maidstone, Kent, Reino Unido) y seguidamente se lavó con 5 mL de hexano a través de un embudo. El solvente que pasó sobre la muestra se recogió en un vaso de precipitado previamente pesado, se evaporó a vacío (Buchi Rotavapor R-124, Essen, Alemania) y seguidamente se secó a 102 °C durante 1 h en estufa. El peso final del residuo se registró e informó como el

%aceite libre superficial del polvo. Teniendo en cuenta que el aceite de chía no es volátil, se asumió que el contenido de aceite total fue igual al del aceite inicial. La eficiencia de microencapsulación (%EM) se obtuvo a partir de la **Ec. 4.1**.

$$EM (\%) = (AT - AS)/AT \times 100 \quad \text{Ec. 4.1.}$$

donde:

EM= Eficiencia de microencapsulación

AT = Aceite total

AS = Aceite superficial

2.5.5. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología de las microcápsulas se estudió mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Los polvos se adhirieron a un portaobjeto cubiertos por una fina película de Au/Pd y se examinaron en condiciones de alto vacío a 5 kV en un microscopio electrónico de barrido modelo MA10 (Carl Zeiss SMT Ltd., Cambridge, Reino Unido).

2.5.6. Color

Las muestras se distribuyeron homogéneamente en una placa de Petri de vidrio (diámetro 95 mm) y el color de la microcápsula se midió usando un colorímetro Minolta (CR-400, Konica Minolta Sensing Inc., Japón). El color se registró a través de los parámetros L* (luminosidad), a* (componente rojo-verde) y b* (componente amarillo-azul) de las muestras.

2.5.7. Índice de estabilidad oxidativa acelerada

La estabilidad oxidativa del aceite de chía a granel y de las diferentes microcápsulas fueron evaluadas mediante ensayos acelerados de estabilidad oxidativa determinando los respectivos tiempos de inducción (t_i). Las determinaciones se realizaron en un equipo Rancimat modelo 743 (Metrohm AG, Herisau, Suiza). En forma resumida, 3 g de aceite ó 1,5 g de microcápsulas de chía fueron calentadas a 98 °C bajo un caudal de aire de 20 L/h (Wang y col., 2014). Los productos de oxidación de naturaleza volátil fueron transportados por dicha corriente de aire a una celda de medición donde se dispersaron en una solución de

muy baja conductividad (agua mili-Q). De esta manera, mediante el registro de la conductividad de esta solución en función del tiempo, se obtuvieron las curvas de oxidación, cuyo punto de inflexión se designa como t_i y representa una magnitud característica que permite evaluar la correspondiente estabilidad oxidativa de la muestra en cuestión (**Figura 4.2**).

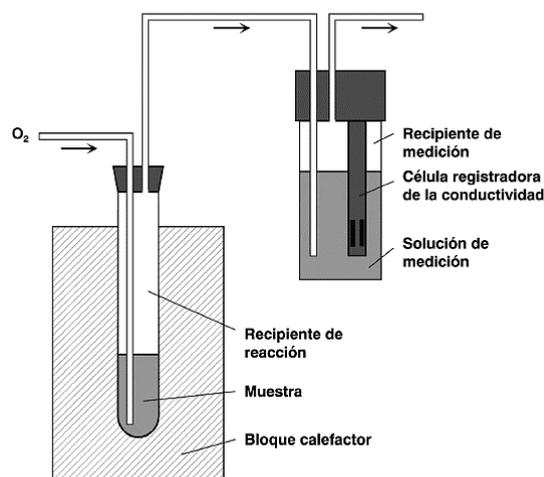


Figura 4.2. Esquema del equipo Rancimat 743 (Metrohm Ion Analytik, 2001)

2.5.8. Dispersabilidad

La dispersabilidad de los polvos se determinó mediante difracción láser aplicando la metodología propuesta por Klinkesorn y col. (2005). Para ello, 150 mg de microcápsulas se dispersaron en 500 mL de agua dentro de la unidad de dispersión del analizador Malvern Mastersizer (Modelo 2000 E, Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) bajo agitación constante a 2000 rpm. Se registró la evolución del porcentaje de oscurecimiento a partir de mediciones de este parámetro cada 10 s durante 5 min.

2.5.9. Distribución de tamaño de partículas, diámetro medio, ζ -potencial y estabilidad física de las emulsiones reconstituidas a partir de las microcápsulas

La reconstitución de las emulsiones se realizó a partir de la dispersión de los diversos polvos en agua destilada hasta alcanzar un contenido de 10 g sólidos/100 g emulsión a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) bajo agitación magnética constante durante 30 min (Klinkesorn y col., 2005).

Las emulsiones reconstituidas se analizaron tal como se describió previamente en el **Capítulo 2, secciones 2.4.1 y 2.4.3**.

2.6. Análisis estadístico

Los resultados experimentales fueron analizados mediante análisis ANOVA ($p \leq 0,05$) utilizando el programa Statgraphics Centurion XV.II para el software de Windows (StatPoint Technologies, Warrenton, VA, EEUU). Las comparaciones múltiples entre medias se llevaron a cabo aplicando la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$). La distribución normal de las variables y la varianza de verificación fueron obtenidas mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Cochran, respectivamente.

3. Resultados y Discusión

3.1. Microencapsulación de aceite de chía mediante secado por aspersión de emulsiones O/W convencionales

3.1.1. Efecto de las condiciones de homogeneización y secado sobre las propiedades fisicoquímicas de microcápsulas con aceite de chía

Caracterización de las emulsiones O/W previo al secado

Polavarapu y col. (2011) han señalado que la preparación de una emulsión estable previo al secado es un punto clave para alcanzar un alto nivel de eficiencia en el proceso de microencapsulación. Así, pequeñas gotas de aceite podrían ser ocluidas e incorporadas más eficientemente dentro de la matriz de material de pared de las microcápsulas y además, la emulsión presentaría una mayor estabilidad durante el proceso de “spray drying” (Jafari y col., 2008a). Los diámetros medios $D [4,3]$ y $D [3,2]$ de las emulsiones O/W homogeneizadas a 400 bar resultaron $0,38 \pm 0,02 \mu\text{m}$ y $0,29 \pm 0,01 \mu\text{m}$, respectivamente. Los mismos, disminuyeron significativamente ($p \leq 0,05$) cuando la presión de homogeneización se incrementó hasta 600 bar ($D [4,3] = 0,23 \pm 0,01 \mu\text{m}$; $D [3,2] = 0,21 \mu\text{m} \pm 0,01 \mu\text{m}$). Las curvas de distribución de tamaño de partículas fueron monomodales en ambos casos (ver **Figura 2.5, Capítulo 2**). De esta manera, los resultados experimentales sugieren que bajo las condiciones aplicadas pueden obtenerse emulsiones O/W con características adecuadas para la microencapsulación por “spray drying”. El tamaño de partícula es un parámetro importante para determinar la estabilidad de una emulsión previo al secado, el cual puede afectar además las características del polvo microencapsulado (Re, 1998).

Las emulsiones O/W obtenidas a 400 y 600 bar exhibieron un comportamiento pseudoplástico (ver **Figura 2.8, Capítulo 2**), característico de la mayor parte de las emulsiones O/W (Polavarapu y col., 2011). Los resultados experimentales correspondientes al análisis reológico se ajustaron al modelo de la ley de la Potencia. Así, los coeficientes de consistencia (K) y los índices de comportamiento de flujo (n) para un intervalo de velocidad de cizallamiento de $1 - 500 \text{ s}^{-1}$ fueron los siguientes, $K = 0,4837 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$, $n = 0,78$ para emulsiones O/W

obtenidas a 400 bar ($R^2 = 0,9989$) y $K = 0,8516 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$, $n = 0,72$ para aquéllas a 600 bar ($R^2 = 0,9990$). Los valores de viscosidad a una velocidad de cizallamiento de 100 s^{-1} fueron $0,164$ y $0,217 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ para las emulsiones preparadas a 400 y 600 bar, respectivamente (ver **Tabla 2.5, Capítulo 2**).

En cuanto a la estabilidad global, los perfiles de “Back Scattering” de todas las emulsiones O/W se mantuvieron constantes hasta alrededor de 25 días luego de su preparación, denotando una alta estabilidad frente al cremado (ver **Figura 2.9.c, Capítulo 2**).

Caracterización de las microcápsulas y emulsiones reconstituidas

En la **Tabla 4.3** se exponen las propiedades fisicoquímicas de los polvos deshidratados con aceite de chía obtenidos a distintas condiciones operativas.

El contenido de humedad y el nivel de a_w de todas las microcápsulas oscilaron entre $1,48$ - $3,52 \text{ g}/100 \text{ g}$ (b.s.) y $0,20$ - $0,32$, respectivamente. Estos parámetros fueron afectados significativamente ($p \leq 0,05$) por la presión de homogeneización, no así por las temperaturas de entrada/salida del aire de secado. La principal contribución del aumento de la presión de homogeneización podría ser atribuido a la estrecha distribución de tamaños de partículas que presentaron las emulsiones, lo que podría incrementar la velocidad de transferencia de masa y la evaporación del agua durante la atomización, lo que concuerda con lo informado por Elversson y col., (2003). Otros autores (Hogan y col., 2001), no registraron un efecto de la presión de homogeneización o la relación aceite/proteína de suero sobre el contenido de humedad de microcápsulas de aceite de soja secadas por aspersion. En cuanto al contenido de humedad de los polvos estudiados en el presente trabajo de Tesis, su nivel se encontró por debajo de la especificación mínima de humedad prevista para estos sistemas en la industria alimentaria (3 - $4 \text{ g}/100 \text{ g}$) (Klinkesorn y col., 2006).

El contenido de aceite encapsulado, expresado como eficiencia de microencapsulación (EM) osciló entre $92,1$ - $97,4\%$ respecto al aceite total (**Tabla 4.3**). Estos valores fueron superiores a los informados por Rodea-González y col. (2012) para aceite de semilla de chía encapsulado con una mezcla binaria de biopolímeros (concentrado de proteínas de suero (WPC) con goma arábica (GA) o goma mezquita MG). Estos autores lograron la máxima eficiencia de encapsulación

(80,7%) partiendo de emulsiones O/W con aceite de chía formuladas con un contenido de sólidos totales de 40% y una relación material de núcleo/pared 1:3. Los mejores niveles de EM alcanzados en los sistemas estudiados en este trabajo de Tesis podrían estar asociados a un menor tamaño de partícula de las emulsiones de partida, las cuales fueron más pequeñas en las emulsiones formuladas con caseinato de sodio y lactosa (0,33-0,40 μm) que en los sistemas WPC/GA y WPC/MG (2,3-3,3 μm). En este sentido, se encuentra bien documentado que el tamaño de gota de una emulsión tiene un efecto sustancial sobre la EM de polvos con diferentes materiales de núcleo durante el secado por aspersión (Soottitantawat y col., 2003; 2005). Estos trabajos de investigación dan cuenta que material encapsulado en polvo con una alta retención de compuestos volátiles y un bajo contenido de aceite no encapsulado a nivel superficial puede obtenerse a partir de la reducción de los tamaños de gota en la emulsión inicial. A su vez, los diferentes materiales de pared empleados -en cada caso- podrían haber influido en la EM. La elección del material de pared es muy importante para la eficiencia de la encapsulación y la estabilidad de las microcápsulas (Gharsallaoui y col., 2007). Según estos investigadores, el uso de ciertos compuestos específicos puede modificar las propiedades de secado de las microcápsulas. Así, la combinación de proteínas-carbohidratos como agentes microencapsulantes se presenta como una excelente opción para la microencapsulación (Young y col., 1993). Rosenberg y Sheu (1996) estudiaron la adición de lactosa a un sistema formulado con proteínas de suero de leche, registrando la efectividad de este azúcar sobre la formación de la pared mejorando las propiedades de secado. El efecto positivo de la lactosa fue atribuido a la formación de una fase vítrea continua de lactosa sobre la cual se dispersan las cadenas de proteínas. Por lo expuesto, los mayores valores de eficiencia de microencapsulación, alcanzados en el presente trabajo, podrían además estar relacionados a la inclusión de lactosa como material constituyente de la pared.

Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre la EM de los polvos obtenidos bajo las cuatro condiciones operativas estudiadas. Esta tendencia fue coincidente con la informada por Hogan y col. (2001) para la EM de aceite de soja con caseinato de sodio, donde presiones de homogeneización > 100 bar no presentaron un efecto significativo. Estos autores sugieren que por encima

de este nivel de presión pueden obtenerse emulsiones estables con tamaños de partículas lo suficientemente pequeñas (< 1,45 μm). Respecto a la temperatura de entrada de aire, Klinkesorn y col. (2006) obtuvieron resultados similares a los encontrados en este trabajo de Tesis estudiando las características de aceite de atún microencapsulado mediante secado “spray” (T de entrada 165, 180, 195 °C) de emulsiones O/W conteniendo jarabe de maíz y aceite, estabilizadas por múltiples membranas interfaciales (lecitina-quitosano).

Tabla 4.3. Propiedades fisicoquímicas de las microcápsulas de aceite de chía

Propiedad ^a	Condiciones operativas			
	400 bar-135/70°C	400 bar-170/90°C	600 bar-135/70°C	600 bar-170/90°C
Humedad (% b.s.)	3,32±0,17 ^b	3,52±0,18 ^b	1,48±0,44 ^a	2,14±0,27 ^a
a_w (25 °C)	0,31±0,01 ^b	0,32±0,01 ^b	0,20±0,02 ^a	0,21±0,02 ^a
EM (%)	95,0±2,1 ^a	92,1±0,7 ^a	97,4±1,2 ^a	94,5±0,5 ^a

^aValores medios (n=2) \pm desviación estándar. Valores medios en una fila seguidos de letras diferentes son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

La forma, tamaño y morfología de las microcápsulas secadas por aspersión fueron estudiados mediante SEM. El análisis de la topología superficial reveló que todas las microcápsulas exhibieron una morfología similar, no siendo afectadas por las condiciones de procesamiento (**Figura 4.2.**). A su vez, las microcápsulas tuvieron una forma aproximadamente esférica, con la presencia de algunos pequeños poros y con diámetros medios en el rango de 3-12 μm . Según Polavarapu y col. (2011), estos poros pueden ser originados ya sea por la aireación de las emulsiones previo al secado por aspersión y/o por la contracción irregular del material durante el periodo final de secado.

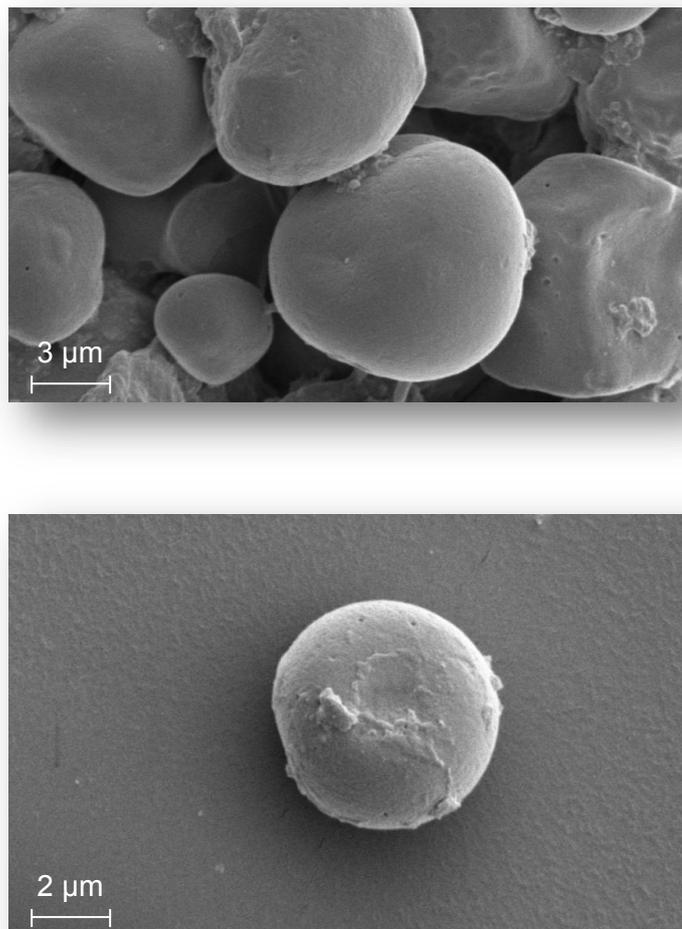


Figura 4.2. Micrográficas SEM correspondientes a microcápsulas de aceite de chía obtenidas mediante secado por aspersion

Seguidamente, se estudió una propiedad funcional relevante de las microcápsulas en aplicaciones prácticas como es su capacidad para formar emulsiones estables cuando son reconstituidas en agua. La velocidad y la eficiencia de la dispersión son características importantes vinculadas a la aplicación de los ingredientes alimentarios en polvo (Klinkesorn y col., 2005). En virtud de ello, la técnica de difracción láser fue empleada a fin de obtener información sobre estos parámetros. La dispersabilidad de las emulsiones O/W en polvo se evaluó mediante la evolución del diámetro medio de las partículas y del oscurecimiento en función del tiempo (**Figura 4.3**). El oscurecimiento es un parámetro sensible a la cantidad total de material dispersado en el fluido, mientras que el valor del $D[4,3]$ es particularmente sensible a la presencia de partículas de mayor tamaño

en una emulsión (Klinkesorn y col., 2005). Los polvos recién obtenidos exhibieron un fuerte incremento en el oscurecimiento en función del tiempo de agitación hasta $\sim 1,5$ min, a partir del cual este parámetro se mantuvo constante (~ 10 y 15% para 600 y 400 bar, respectivamente) (**Figura 4.3.a**). Además, el $D [4, 3]$ luego de 1 min de agitación disminuyó de $0,60$ a $0,46 \mu\text{m}$ y de $0,66$ a $0,53 \mu\text{m}$ en los polvos obtenidos a 400 bar - $135/70^\circ\text{C}$ y a 400 bar - $170/90^\circ\text{C}$, respectivamente. La disminución registrada entre el principio y el final de la agitación fue menor en las partículas constituidas por microcápsulas obtenidas a 600 bar (**Figura 4.3.b**). A tiempos de agitación superiores a 1,5 min, tanto el oscurecimiento como el tamaño medio de partícula permanecieron relativamente constantes. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Klinkesorn y col. (2005) quienes registraron que la rápida disminución del tamaño de partículas y el aumento del oscurecimiento denotan una rápida dispersión de la gran parte de los polvos dando como resultado una suspensión. Ahora bien, luego de 30 días de almacenamiento a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ en HR 33% , los polvos alcanzaron niveles de oscurecimiento constantes luego de $\sim 2,3$ min y la dispersión de las partículas de mayor tamaño requirió un mayor tiempo que las microcápsulas correspondientes al estadio inicial (**Figura 4.3.c, d**). Este hecho, podría estar asociado al colapso de la estructura de las partículas durante el almacenamiento (Klinkesorn y col., 2005). En este sentido, la disminución del área superficial de las partículas de polvo expuesta a la fase acuosa circundante podría estar relacionada con la velocidad de dispersión. Luego de 180 días de almacenamiento, sólo las microcápsulas obtenidas a 400 bar alcanzaron un valor de oscurecimiento constante ($\sim 18\%$), mientras que el $D [4,3]$ disminuyó constantemente de $8-15 \mu\text{m}$ a $2-6 \mu\text{m}$ durante los primeros 5 min de agitación en todos los casos. El incremento de los tiempos de dispersión -en este caso- podría deberse a la formación de agregados en el polvo, los cuales no permitieron una dispersión eficiente del mismo en la fase acuosa (**Figura 4.3.e, f**).

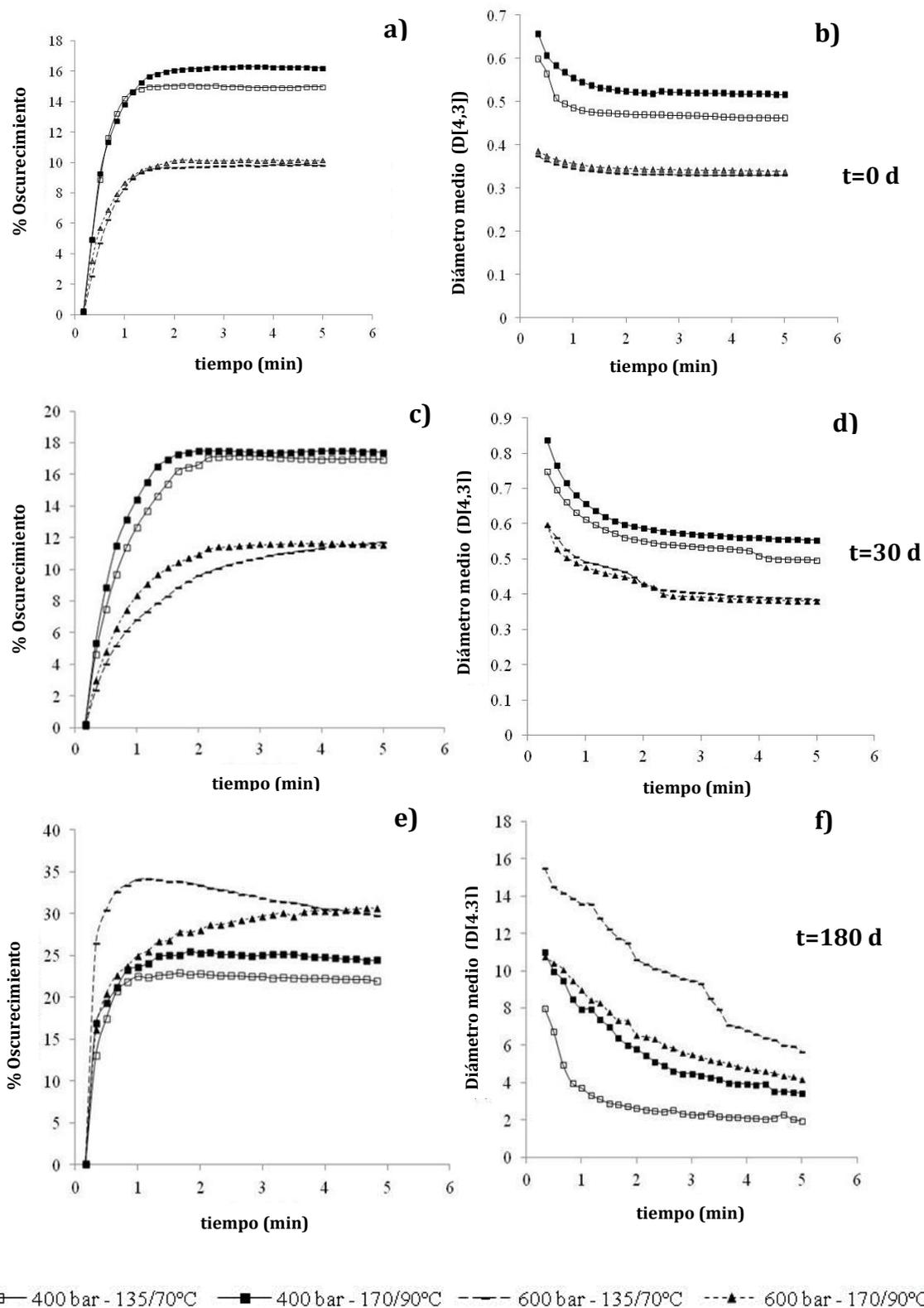


Figura 4.3. Influencia del tiempo de agitación sobre el oscurecimiento y el diámetro medio de aceite microencapsulado de chía (polvo) secado por aspersión y almacenado a 20 ± 2 °C y 33% de HR durante 180 días

El tamaño de partícula de los polvos fue determinado a partir de las respectivas emulsiones reconstituidas (ER) en agua (10 g de sólido/100 g de emulsión) a distintos tiempos de almacenamiento. Inmediatamente luego de su obtención (t=0), los sistemas procesados a 400 bar (135/70 ó 170/90 °C) registraron tamaños de partícula mayores (D [4,3] 0,48-0,54 µm; D [3,2] 0,31-0,33 µm) a los homogeneizados a 600 bar (D [4,3] 0,33 - 0,35 µm, D [3,2] 0,24 - 0,25 µm) (Tabla 4.4). El tamaño de partícula de las muestras obtenidas bajo las diferentes condiciones de procesamiento no presentó cambios significativos (p>0,05) entre 0 y 30 días de almacenamiento. Sin embargo, luego de 180 días de almacenamiento este parámetro registró un incremento (p≤0,05) en todos los casos estudiados.

Tabla 4.4. Tamaño de partículas (D [4, 3] y D [3, 2]) de emulsiones O/W con aceite de chía reconstituidas durante el almacenamiento a 20 ± 2 °C y 33 % HR

Condiciones operativas	D [4,3] (µm)			D [3,2] (µm)		
	tiempo de almacenamiento (d)			tiempo de almacenamiento (d)		
	0	30	180	0	30	180
400bar-135/70°C	0,48±0,03 ^{bA}	0,57±0,02 ^{cA}	1,12±0,19 ^{aB}	0,31±0,01 ^{bA}	0,32±0,01 ^{bA}	0,42±0,01 ^{aB}
400bar-170/90°C	0,54±0,04 ^{bA}	0,53±0,01 ^{cA}	3,00±0,87 ^{abB}	0,33±0,00 ^{bA}	0,33±0,01 ^{bA}	0,98±0,14 ^{aB}
600bar-135/70°C	0,33±0,02 ^{aA}	0,46±0,01 ^{bA}	6,02±2,10 ^{abB}	0,24±0,00 ^{aA}	0,23±0,00 ^{aA}	0,84±0,23 ^{aB}
600bar-170/90°C	0,35±0,04 ^{aA}	0,33±0,01 ^{aA}	18,04±7,47 ^{bB}	0,25±0,01 ^{aA}	0,26±0,01 ^{aA}	2,64±0,60 ^{bB}

^{ab} Valores medios (n=2) ± desviación estándar seguido de diferentes letras minúsculas en cada columna difieren en p ≤ 0,05 entre la condición operativa para cada tiempo de almacenamiento, de acuerdo con la prueba de Tukey (HSD)

^{AB} Valores medios (n=2) ± desviación estándar seguido de diferentes letras mayúsculas en cada fila difieren en p ≤ 0,05 entre el tiempo de almacenamiento para cada condición operativa, de acuerdo con la prueba de Tukey (HSD)

La distribución de tamaño de partículas de las emulsiones reconstituidas al inicio del almacenamiento (t=0) (Figura 4.4.a) fue similar a las de las correspondientes emulsiones de partida (ver Figura 2.12). Sólo una pequeña población de gotas mayores a 1 µm fue observada en la emulsión reconstituida obtenida a 600 bar con respecto a su respectiva emulsión de partida. Después de 30 días de almacenamiento, la distribución del tamaño de partícula de las emulsiones reconstituidas se presentó como bi y multimodal (Figura 4.4.b). Estos

cambios fueron más evidentes en las emulsiones reconstituidas a partir de polvos obtenidos a 400 bar, mostrando un amplio rango de tamaños de gotas, lo que sugiere la formación de algunas partículas más grandes (formación de flóculos o de agregados).

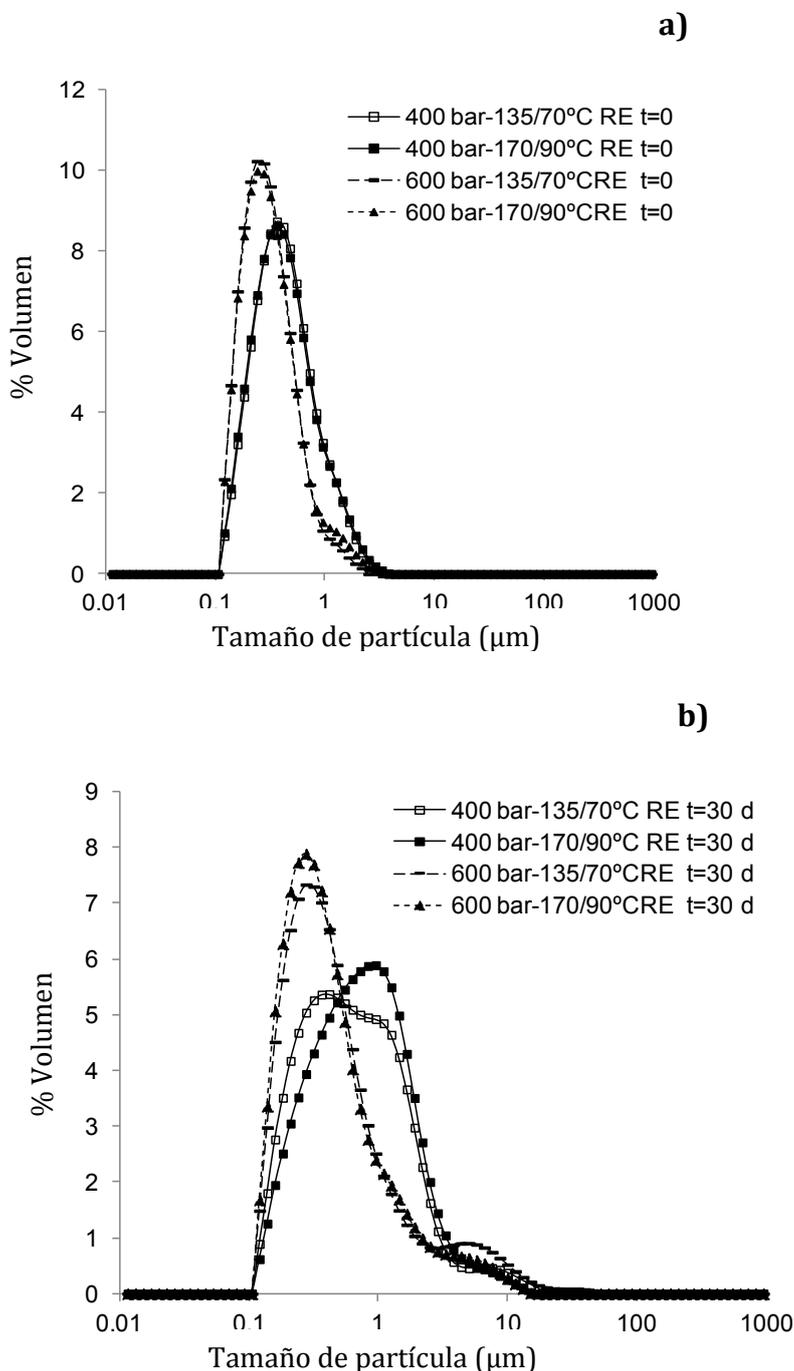


Figura 4.4. Curvas de distribución de tamaño de partículas correspondientes a las emulsiones reconstituidas (RE) a partir de microcápsulas de aceite de chía obtenidos a 400 y 600 bar, deshidratadas a temperaturas de entrada/salida 135/70 °C y 170/90 °C en función del almacenamiento **a)** inicio, **b)** 30 d

La estabilidad física de las emulsiones reconstituidas a partir de los diferentes polvos se estudió mediante el análisis de los perfiles de “Back Scattering” en función de la longitud del tubo y del tiempo mediante un analizador óptico vertical de barrido (QuickScan). La **Figura 4.5** muestra los perfiles obtenidos para las emulsiones reconstituidas a partir de las microcápsulas obtenidas en las diferentes condiciones operativas, almacenadas a 20 ± 2 °C, 33 % HR durante 1 semana.

Los valores medios iniciales de “Back Scattering” en función de la longitud de la celda de medida (BS_{av0} del perfil BS a $t = 0$) correspondiente a los polvos obtenidos a 400 bar-135/70 °C, 400 bar-170/90 °C, 600 bar-135/70 °C y 600 bar-170/90 °C fueron 57,07 %, 60,43 %, 58,42 % y 58,15 %, respectivamente. En cuanto a la distribución de las partículas fue homogénea a lo largo del tubo. Las emulsiones reconstituidas a partir de microcápsulas de 400 bar registraron una desestabilización por cremado y floculación, la cual fue más pronunciada en el caso de las microcápsulas obtenidas a 135/70 °C (**Figuras 4.5. a, b**). Los perfiles en el modo de referencia (Transmitancia y “Back Scattering”) presentaron un pico en la parte inferior del tubo, típico de la migración de partículas pequeñas (datos no mostrados). Luego se registró un gran aumento en el %BS hacia la parte superior del tubo lo que sugiere la migración de agregados/flóculos. En el caso de la emulsión reconstituida a partir de microcápsula obtenidas a 400 bar - 135/70 °C (**Figura 4.5.a**), la misma exhibió una disminución de los valores medios de BS (BS_{av}), lo cual puede relacionarse con un incremento del diámetro medio de las partículas. Este comportamiento puede estar asociado al proceso de floculación (Álvarez Cerimedo y col., 2010). Con respecto al BS, se trata de un parámetro directamente relacionado con el diámetro medio de las partículas. Así, el valor de BS puede presentar cambios con el tamaño de las partículas. Generalmente, el BS aumenta con el diámetro medio de las partículas cuando las mismas son más pequeñas que la longitud de onda incidente (λ) y disminuye con el diámetro medio de las partículas más grandes que la longitud de onda incidente. Por ello, los agregados/flóculos formados durante la desestabilización de las emulsiones reconstituidas podrían tener asociado un tamaño mayor a λ (0,8 μm), lo que causaría la disminución del BS_{av} .

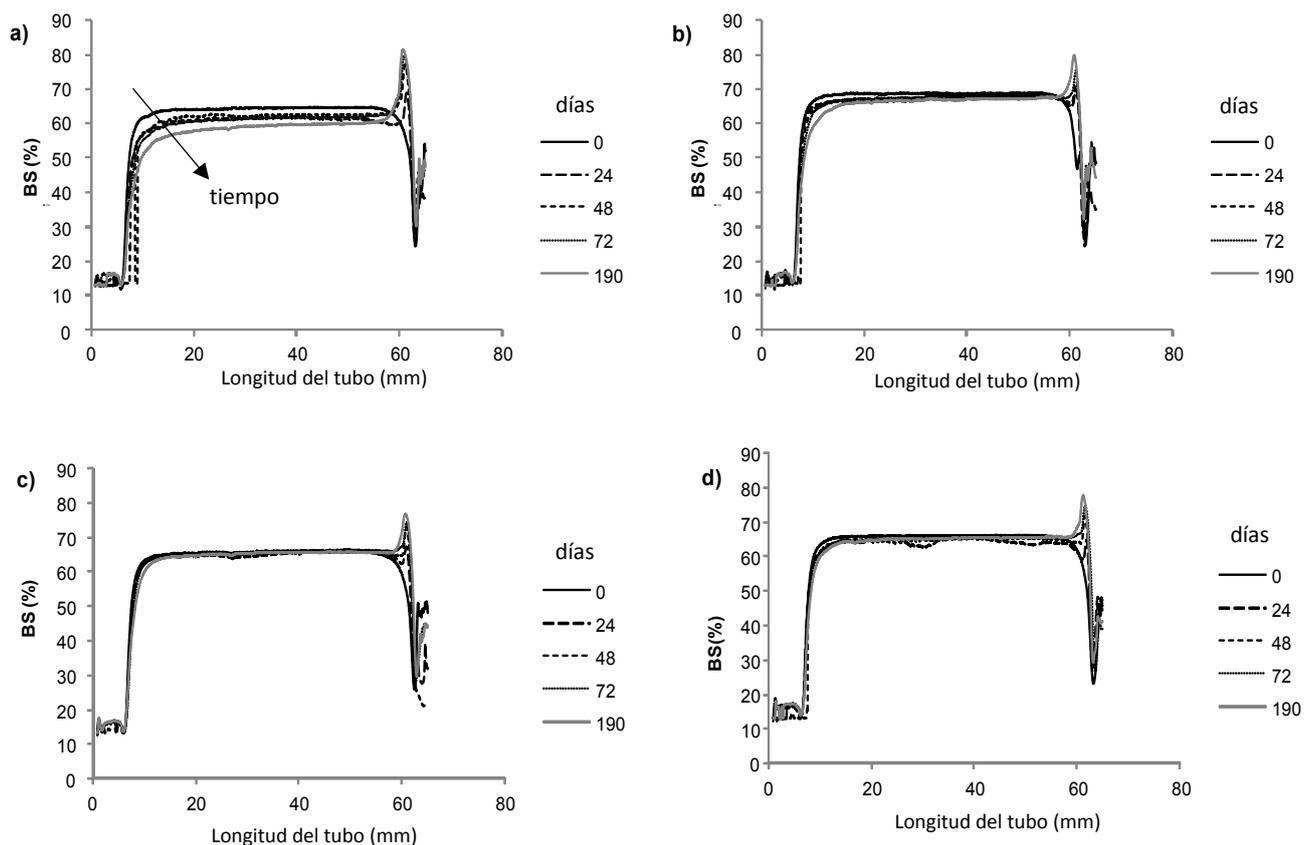


Figura 4.5. Perfiles de “Back Scattering” en función del tiempo de almacenamiento a 20 ± 2 °C, 33 % HR y de la longitud del tubo (~ 0 -65 mm) correspondientes a emulsiones O/W con aceite de chía reconstituidas obtenidas previamente a: **a)** 400 bar - 135/ 70 °C; **b)** 400 bar - 170/ 90 °C; **c)** 600 bar - 135/ 70 °C; **d)** 600 bar - 170/ 90 °C

Los perfiles de BS de las emulsiones reconstituidas a partir de microcápsulas obtenidas a 600 bar (**Figura 4.5. c, d**) evidenciaron un leve grado de cremado. La parte superior del perfil del tubo registró un aumento del BS, el cual puede relacionarse con la migración de partículas individuales. El análisis comparativo de las diversas emulsiones reconstituidas indicó que los sistemas obtenidos a 600 bar resultaron ser los más estables. Estos resultados están relacionados con el menor tamaño de partículas correspondiente a emulsiones reconstituidas a $t = 0$ al aplicar una presión de homogeneización de 600 bar (**Tabla 4.4** y **Figura 4.4**). Cabe señalar que una alta concentración de partículas pequeñas produce un lento proceso de cremado, de acuerdo con la ley de Stokes (McClements, 1999).

La **Figura 4.6** muestra la evolución de PV para el aceite de chía a granel y los distintos polvos de aceite de chía secados por aspersión durante el

almacenamiento a 20 ± 2 °C y 33 % de HR. Los valores de PV oscilaron entre 2,1 y 2,7 meq hidroperóxidos/kg de aceite a $t = 0$, sin registrarse diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las muestras estudiadas. El relativamente bajo nivel de hidroperóxidos de los polvos a tiempo inicial sugiere que el aceite de chía se mantuvo estable – en cada caso - frente a la oxidación lipídica durante el proceso de secado por aspersión. Estos resultados son similares a los informados por Klinkesorn y col., (2005b) en aceite de atún microencapsulado. El aceite de chía a granel mostró un PV significativamente superior al del aceite microencapsulado durante el periodo de almacenamiento estudiado. Las diferencias significativas entre los diversos tratamientos ensayados se observaron luego de 60 días. Así, las microcápsulas obtenidas a 600 bar-170/90 °C presentaron el valor de PV más alto, ($11,7 \pm 0,8$ meq hidroperóxidos/kg de aceite). Después de 100 días de almacenamiento, los niveles de PV de los diversos polvos presentaron el siguiente orden: 600 bar-170/90 °C > 600 bar-135/70 °C > 400 bar-170 /90 °C ~ 400 bar-135/70 °C; las microcápsulas obtenidas a 400 bar registraron PV < 10 meq hidroperóxidos/kg de aceite. Este nivel de PV fue establecido por el *Codex Alimentarius* (1999) como el límite superior de aceptabilidad para los aceites vegetales ricos en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) para el consumo humano no incluidos en las normas estándar (Frankel, 2005).

Por otra parte, Reineccius (2004) indicó que las reacciones de oxidación pueden ser inducidas durante el secado por aspersión. En esta etapa, los productos de oxidación generados se encuentran en la etapa inicial y pueden estar presentes aún en forma de precursores de oxidación o radicales libres. Este hecho se basa en que la exposición de las partículas al calor tiene lugar en un intervalo de pocos segundos. Además, el tamaño de partícula de la emulsión original puede influir en la cantidad de precursores de oxidación formados durante el proceso de secado por aspersión y por lo tanto, en la formación subsiguiente de hidroperóxidos durante el almacenamiento. En virtud de las consideraciones mencionadas, el tamaño de partícula más pequeño asociado a emulsiones obtenidas a 600 bar se traduce en una mayor superficie de contacto a altas temperaturas que aquellas homogeneizadas a 400 bar. Asimismo, gotas más pequeñas tienen una mayor área de interacción entre iones de metales de transición pro-oxidantes e hidroperóxidos de lípidos presentes en la interfase aceite-agua (Jacobsen y col., 2000; Kargar y col.,

2011). Cuando el proceso de secado ha finalizado, el producto está en estado sólido y la velocidad de reacción de oxidación es lenta. A medida que transcurre el almacenamiento, los radicales pre-formados pueden transformarse progresivamente en hidroperóxidos, como puede verse por los cambios en PV durante el tiempo de almacenamiento estudiado. En el caso de las microcápsulas obtenidas a partir de las emulsiones a 600 bar, se registró a su vez un efecto de la temperatura del aire de entrada. Así, un incremento en este parámetro tuvo asociado un mayor nivel en el contenido de hidroperóxidos. Según Tonon y col. (2011), el uso de altas temperaturas en el aire de entrada proporciona más energía disponible para el proceso de oxidación de lípidos, el cual se produce más intensamente, favoreciendo la formación de hidroperóxidos. Estos autores observaron que el contenido de hidroperóxidos de aceite de lino microencapsulado fue mayor cuando la temperatura de entrada se incrementó de 138 a 202 °C.

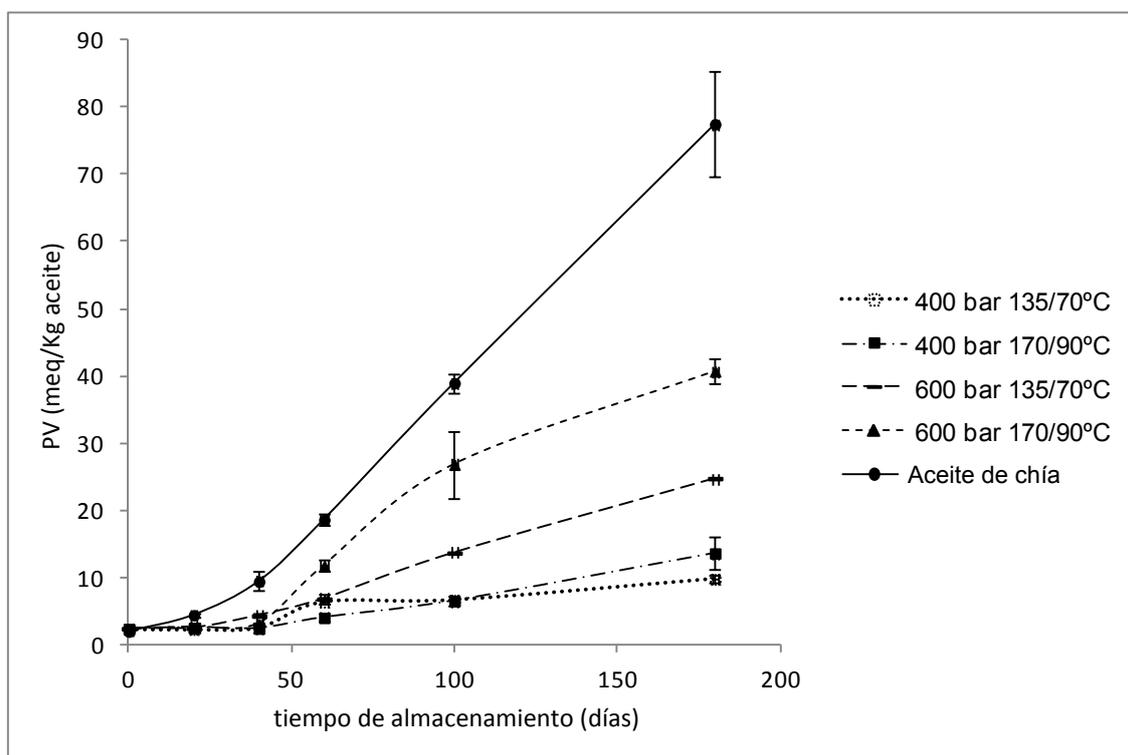


Figura 4.6. Evolución del valor de peróxidos de aceite de chía a granel y microencapsulado mediante secado por aspersión bajo distintas condiciones operativas en función del tiempo de almacenamiento a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 33% de HR

Valores medios ($n = 2$) \pm desviación estándar

3.1.2. Efecto de distintos materiales de pared sobre las propiedades fisicoquímicas de microcápsulas con aceite de chía

Caracterización de las emulsiones O/W previo al secado

Muchos autores han señalado la importancia de las características de la emulsión de partida y su incidencia sobre la eficiencia de microencapsulación (%EM) así como sobre las propiedades fisicoquímicas de los polvos obtenidos. (Sanguansri y Augustin, 2007; Jafari y col., 2008; Jacobsen y col., 2013). Tal como puede visualizarse en la **Tabla 2.2 (Capítulo 2)**, se realizó el estudio correspondiente empleando diversos materiales de pared.

Los resultados experimentales para el diámetro medio de partícula D [3,2] oscilaron entre 0,215 y 0,267 μm en emulsiones estabilizadas con caseinato de sodio, mientras que los correspondientes a los sistemas con PRF fueron significativamente mayores ($p \leq 0,05$) (ver **Tabla 2.7, Capítulo 2**).

Las curvas de distribución de tamaño de partículas fueron monomodales para las emulsiones CL y CL+Mg; bimodales para CM y CM+Mg y trimodales con un desplazamiento hacia tamaños de partículas más grandes al utilizarse PRF (ver **Figura 2.12, Capítulo 2**).

En lo que respecta a la determinación de las propiedades reológicas, los resultados experimentales fueron ajustados al modelo de la ley de la Potencia, obteniéndose valores de coeficiente de determinación (R^2) superiores a 0,98. Las emulsiones con caseinato de sodio previo al secado registraron valores de $n < 1$, denotando un comportamiento pseudoplástico para estos sistemas. Los coeficientes de consistencia (K) para el rango de velocidad de deformación 1 - 500 s^{-1} resultaron 0,234 $\text{Pa}\cdot\text{s}^n$ (CL), 0,537 $\text{Pa}\cdot\text{s}^n$ (CM), 1,007 $\text{Pa}\cdot\text{s}^n$ (CL+Mg) y 3,905 $\text{Pa}\cdot\text{s}^n$ (CM+Mg). Por otra parte, las emulsiones con PRF exhibieron un comportamiento newtoniano ($n \sim 1$). Adicionalmente, los valores de viscosidad a 100 s^{-1} (η_{100}), nivel de velocidad de deformación típico de diversos procesos alimentarios fueron 0,124; 0,173; 0,007; 0,261; 0,464 y 0,015 $\text{Pa}\cdot\text{s}$ para las emulsiones CL, CM, PM, CL+Mg, CM+Mg y PM+Mg, respectivamente. De esta manera, puede observarse que los sistemas constituidos por PRF presentaron valores muy inferiores ($p \leq 0,05$) de este parámetro en comparación con las emulsiones estabilizadas con caseinato de sodio. Además, se observó un aumento de η_{100} cuando la combinación de

materiales de pared fue CM en lugar de CL y también cuando se adicionó mucílago de chía a los diferentes sistemas.

Caracterización de las microcápsulas y emulsiones reconstituidas

En la **Tabla 4.5** se exponen las propiedades fisicoquímicas de las microcápsulas de aceite de chía obtenidas a partir de distintos materiales de pared. El contenido de humedad y de a_w de todas las microcápsulas evaluadas se localizó en un rango de 2,72 a 4,40 g/100g (b.s) y de 0,334 a 0,478, respectivamente. Como puede observarse, estos parámetros no fueron afectados ($p>0,05$) por los tratamientos estudiados. Los resultados obtenidos fueron consistentes con los informados previamente por Dian y col. (1996); Hogan y col. (2001). Cabe destacar que los contenidos de humedad registrados se encuentran en el rango deseable para polvos en alimentos (3-5%) (Bhandari y Adhikari, 2008).

Tabla 4.5. Propiedades fisicoquímicas de microcápsulas de aceite de chía con diferentes materiales de pared

Propiedad	Matriz encapsulante					
	CL	CM	PM	CL+Mg	CM+Mg	PM+Mg
CH (% b.s.)	4,40±0,42 ^a	4,04±0,64 ^a	3,66±0,10 ^a	2,72±0,08 ^a	3,92±0,58 ^a	3,50±0,69 ^a
a_w (25 °C)	0,412 ± 0,013 ^a	0,383 ± 0,010 ^a	0,478 ± 0,027 ^a	0,334 ± 0,001 ^a	0,367 ± 0,082 ^a	0,370 ± 0,012 ^a
Tg (°C)	40,82±8,27 ^a	40,56±0,54 ^a	47,39±5,64 ^a	45,84±0,28 ^a	50,19±1,62 ^a	46,44±0,48 ^a
EM (%)	95,20 ± 0,42 ^d	71,26 ± 0,06 ^b	57,74 ± 3,49 ^a	96,23 ± 0,40 ^d	86,65 ± 0,27 ^c	53,37 ± 0,99 ^a
t_i (h)	5,01±0,08 ^a	13,75 ± 0,03 ^c	7,51± 0,11 ^b	6,51 ± 0,18 ^{ab}	13,90±1,11 ^c	7,66 ± 0,11 ^b

CH: contenido de humedad % b.s.

Valores medios (n=2) ± desviación estándar. Letras diferentes en cada fila indican diferencias a $p\leq 0,05$ entre materiales de pared de acuerdo a la prueba de Tukey (HSD).

La temperatura de transición vítrea (Tg) de los sistemas estudiados presentó valores entre 40,56 y 50,19 °C, sin diferencias significativas ($p>0,05$) para los distintos materiales de pared (**Tabla 4.5**). El contenido de humedad, a_w y Tg son factores importantes a ser considerados ya que están asociados con cambios estructurales de la matriz de las microcápsulas. Después del secado se obtiene una

matriz sólida altamente viscosa en estado amorfo; cuando el contenido de humedad o la temperatura aumenta también lo hace la movilidad de las moléculas debido a que el sólido varía desde el estado vítreo amorfo al gomoso. El límite informado para el apelmazamiento, el punto pegajoso y el colapso de las microcápsulas es $a_w > 0,6$ (Escalona-García y col., 2016). En este sentido, los niveles de a_w encontrados en todos los sistemas estudiados en este trabajo de Tesis fueron inferiores a este valor crítico.

La eficiencia de encapsulación (%EM) refleja la cantidad de aceite libre sobre la superficie de las partículas. Las microcápsulas de aceite de chía formuladas con CL (con o sin adición de mucílago) exhibieron los mayores %ME (95,20-96,23%), seguido por los sistemas $CM+Mg > CM > PM \sim PM+Mg$ (**Tabla 4.5**). Diferencias de %EM entre las microcápsulas obtenidas a partir de las combinaciones de materiales de pared CL y CM también fueron evidenciadas por Calvo y col. (2010). El efecto positivo de la lactosa podría estar relacionado con la formación de una fase cristalina continua del disacárido en el que las cadenas de proteína se dispersan, resultando así en altos valores de %EM (Ixtaina y col., 2015). Además, el efecto del material de pared sobre la %EM podría estar asociado al tamaño y distribución de las gotas y a la estabilidad física de las emulsiones madre. El análisis de los resultados obtenidos evidenció una correlación significativa inversa entre el tamaño de gota de las emulsiones previo al secado y la %EM (D [3, 2] vs. %EM $r=-0,86$; $p=0,0003$). De acuerdo con Jafari y col. (2008), el mayor contenido de aceite libre sobre las microcápsulas provenientes de emulsiones con gotas de mayor tamaño podría atribuirse a la ruptura de estas gotas durante la etapa de atomización. Algunos autores han sugerido que la %EM de aceites y agentes saborizantes puede ser mejorada a través de la disminución del tamaño de las gotas de la emulsión madre y del incremento de su estabilidad física (Jafari y col., 2008; Liu y col., 2001; Tonon y col., 2011). En este sentido, los bajos %EM (53,37 a 57,74%) obtenidos para las formulaciones PM y PM+Mg podrían estar relacionados con el mayor tamaño de gota y la menor estabilidad física registrados para estos sistemas en comparación con aquéllos que contenían caseinato de sodio.

En el caso de CM, la eficiencia de encapsulación fue mayor cuando se adicionó el mucílago de chía. Este hecho puede estar asociado con un aumento de

la viscosidad producido por la adición del mucílago de chía como un agente espesante en este sistema, lo que contribuiría a una mayor estabilidad física de las emulsiones durante el proceso de secado por pulverización, mejorando así la %EM. Por otra parte, un aumento en la viscosidad de la emulsión de partida hasta un punto óptimo está relacionado con una reducción de la circulación interna de las gotas y la rápida formación de la membrana interfacial, lo que resulta en una mejor ME% (Jafari y col., 2008).

En la **Figura 4.7** se presentan las micrografías SEM de los polvos obtenidos mediante el empleo de diferentes materiales de pared. Los polvos presentaron partículas de diversos tamaños, en un rango comprendido entre 2-14 μm . El análisis de las micrografías reveló que la mayoría de las microcápsulas fueron aproximadamente esféricas con paredes continuas, sin fisuras o grietas aparentes. Por otra parte, algunas de las partículas presentaron superficies cóncavas y arrugadas, lo cual es común en microcápsulas producidas mediante secado por aspersión (Tonon y col., 2011). Sin embargo, se encontraron diferencias entre las morfologías de las microcápsulas formuladas con caseinato de sodio y las preparadas con PRF. Las micrografías de polvos con PM y PM+Mg como materiales de pared presentan aglomerados, posiblemente debidos a la presencia de aceite libre en la superficie las partículas (**Figuras 4.7.c y f**). En contraste, los polvos obtenidos con CL, CL+Mg, CM y CM+Mg (**Figuras 4.7 a-b y d-e**) se caracterizaron por la presencia de partículas discretas con ambos tipos de superficies, lisas y rugosas.

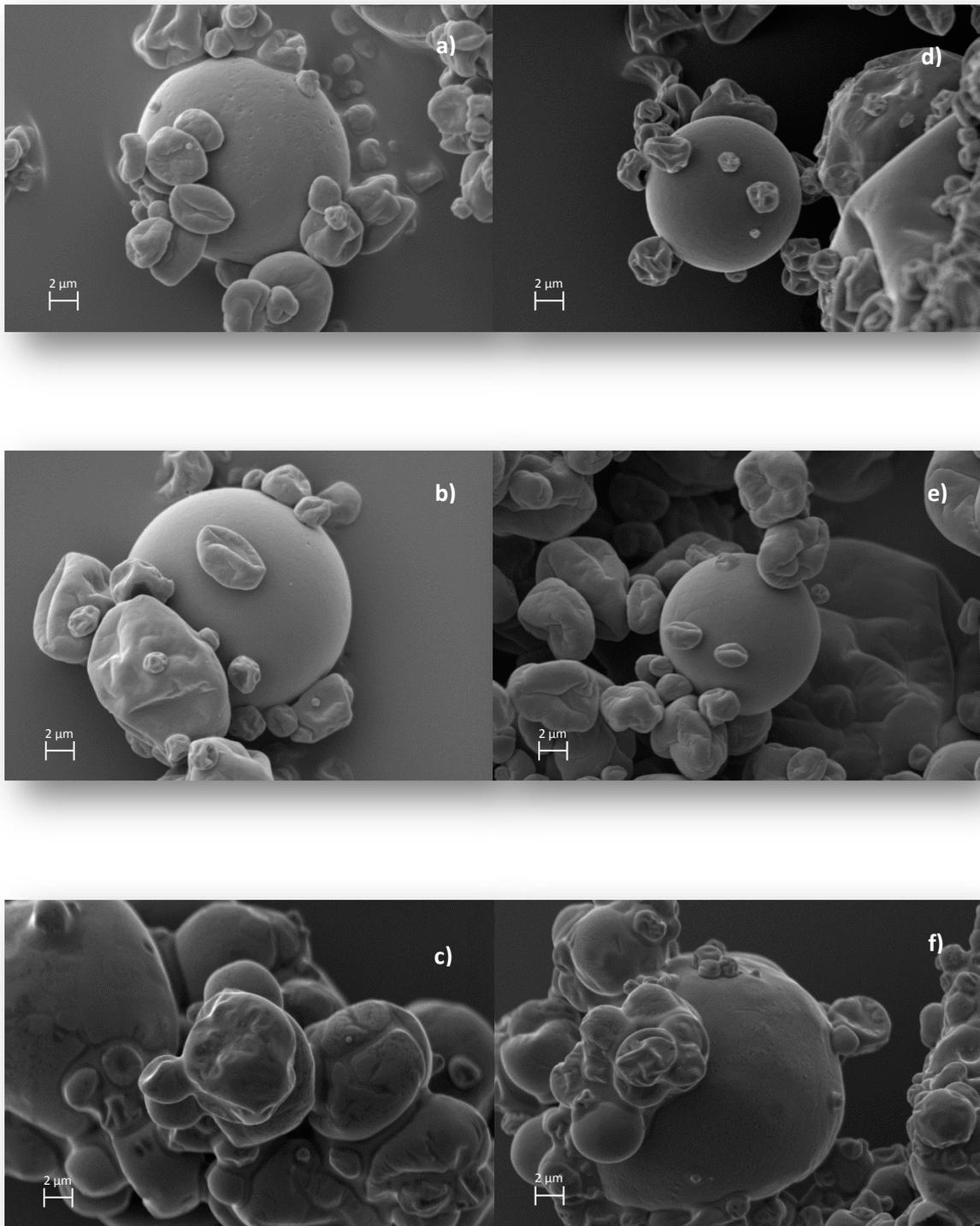


Figura 4.7. Micrografías SEM correspondientes a microcápsulas de aceite de chía obtenidas con diferentes materiales de pared **a)** CL, **b)** CM, **c)** PM, **d)** CL+Mg, **e)** CM+Mg, **f)** PM+Mg

El efecto de los diferentes materiales de pared empleados sobre la estabilidad oxidativa del aceite de chía microencapsulado fue investigado mediante ensayos de Rancimat. Así, pudo observarse que todos los sistemas microencapsulados presentaron tiempos de inducción (t_i) más prolongados que el correspondiente al aceite de chía sin encapsular ($t_i = 2,46 \pm 0,07$ h) por lo cual, puede inferirse un incremento de la estabilidad oxidativa del mismo debido a su microencapsulación a partir del secado por aspersión (**Tabla 4.5**). A partir de los resultados obtenidos se evidenció además que la estabilidad oxidativa no se encontró relacionada con la %EM de las microcápsulas. Por ejemplo, los sistemas CL y CL+Mg presentaron las mayores %EM pero a su vez registraron la menor estabilidad oxidativa. Diversos autores han informado que el deterioro oxidativo del aceite de chía microencapsulado no puede ser totalmente descripto considerando sólo la %EM (Carneiro y col., 2013; Chung y col., 2010; Drusch y Berg, 2008; Hogan y col., 2003). Otra posible explicación para las diferencias de la estabilidad oxidativa de los aceites encapsulados puede relacionarse con la variación del peso molecular de los materiales de pared utilizados. Chung y col. (2010) encontraron una correlación entre la disminución de la cristalinidad, el bajo peso molecular y una menor estabilidad oxidativa de microcápsulas de aceite de pescado a base de caseinato de sodio con almidón modificado empleado como material co-encapsulante. De este modo, la menor estabilidad oxidativa de los sistemas con CL en comparación con los de CM puede deberse a una menor estabilidad estructural de las microcápsulas con lactosa - menor estructura cristalina y peso molecular más bajo - lo que podría permitir un mayor contacto del aceite con el oxígeno, dando lugar a una menor protección contra la oxidación. Cuando se utilizó PM (con o sin Mg) como material de pared, los valores de t_i (7,51 ó 7,66 h) fueron inferiores a los correspondientes a CM y CM+Mg, pero superiores a los de CL y CL+Mg (**Tabla 4.5**). En este sentido, cierto grado de actividad antioxidante podría estar asociado a la presencia de antioxidantes naturales (ácidos cafeico y clorogénico, otros compuestos fenólicos de las semillas de chía) (Capitani y col., 2012; Ixtaina y col., 2011; Taga y col., 1984), los cuales podrían contribuir a proteger el aceite de chía microencapsulado.

Seguidamente, la técnica de difracción láser fue empleada a fin de obtener información sobre la capacidad de redispersión de las microcápsulas de aceite de

chía en agua, importante propiedad funcional para aplicaciones prácticas. La dispersabilidad de los polvos se estudió evaluando la evolución del oscurecimiento en función del tiempo, por ser este parámetro sensible a la cantidad total de material disperso en el fluido (Klinkesorn y col., 2005). Luego de 15d (**Figura 4.8.**), se registró un abrupto incremento del oscurecimiento en función del tiempo de agitación hasta $\sim 1,5-2,0$ min, después de lo cual este parámetro alcanzó un valor constante. Para todos los sistemas estudiados, el aumento rápido del oscurecimiento fue indicativo de una relativamente rápida dispersión de la mayor parte de las partículas del polvo (< 2 min). El tiempo requerido para alcanzar el valor de oscurecimiento constante resultó en el siguiente orden $CL+Mg > CL > CM+Mg > CM > PM+Mg > PM$. Como puede verse, los sistemas con adición de mucílago requirieron un tiempo mayor para ser dispersados respecto de los sistemas sin este ingrediente. Este comportamiento podría atribuirse a una menor solubilidad de las microcápsulas de aceite de chía cuando el mucílago está presente como un componente del material de la pared. La evolución del oscurecimiento en función del tiempo de agitación para microcápsulas almacenadas durante 30 d presentó un comportamiento similar que a 15 d de almacenamiento (datos no mostrados). Este hecho sugiere que la estructura de las microcápsulas no presenta alteraciones importantes después de este periodo de almacenamiento a $20 \pm 2^\circ C$ y HR 33%.

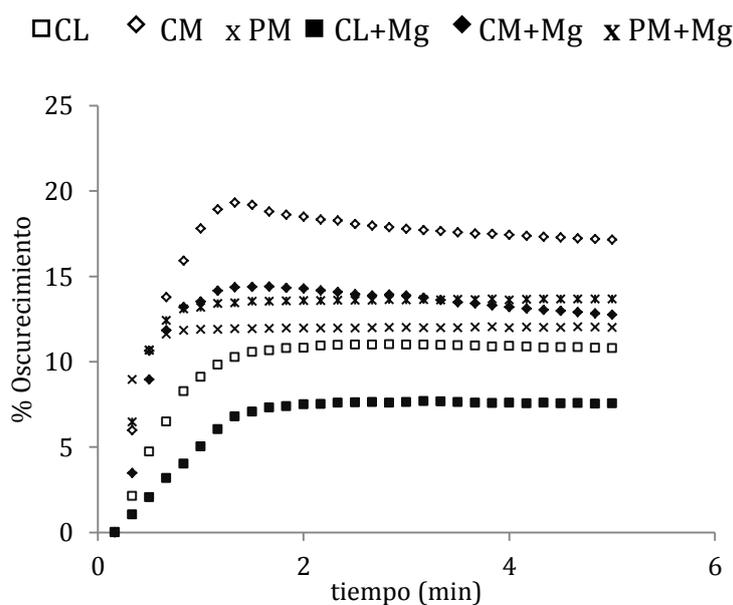


Figura 4.8. Influencia del tiempo de agitación sobre el porcentaje de oscurecimiento de microcápsulas de aceite de chía almacenadas 15 d a $20 \pm 2^\circ C$ y 33% HR

Los resultados experimentales correspondientes al diámetro medio D [3,2] de las partículas de la emulsión secada por aspersión (microcápsulas), almacenadas a 20 ± 2 °C, RH=33% después de su reconstitución en agua a una concentración de 10g sólido /100g pueden verse en la **Tabla 4.6**. Las diferencias encontradas entre los tamaños de partículas al emplear distintos materiales de pared, fueron también detectadas en las emulsiones reconstituidas (ER), observándose mayores valores de D [3,2] en las microcápsulas preparadas con PRF. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tamaños de partículas de las ER y las emulsiones previo al secado en los sistemas obtenidos con caseinato de sodio sin la adición de mucílago de chíá. Los sistemas CM+Mg registraron tamaños de partícula significativamente mayores ($p \leq 0,05$) en las ER después de 30 y 45 días de almacenamiento del polvo. Este hecho podría estar relacionado con una menor solubilidad de las microcápsulas con mucílago de chíá. No obstante, los valores del D [3,2] se mantuvieron en un bajo nivel durante el almacenamiento ($D [3,2] < 0,5 \mu\text{m}$).

Tabla 4.6. D [3,2] correspondiente a emulsiones O/W de aceite de chíá reconstituidas durante el almacenamiento a 20 ± 2 °C, HR 33 %

Emulsión reconstituida	D [3,2] (μm)		
	tiempo de almacenamiento (d)		
	15	30	45
CL	0,252 \pm 0,003 ^{aA}	0,257 \pm 0,001 ^{aA}	0,272 \pm 0,007 ^{abA}
CM	0,312 \pm 0,041 ^{aA}	0,321 \pm 0,115 ^{aA}	0,361 \pm 0,031 ^{abA}
PM	9,721 \pm 0,262 ^{cB}	6,569 \pm 0,037 ^{cA}	6,103 \pm 0,003 ^{cA}
CL +Mg	0,221 \pm 0,003 ^{aAB}	0,225 \pm 0,005 ^{aAB}	0,241 \pm 0,011 ^{aB}
CM +Mg	0,261 \pm 0,001 ^{aB}	0,292 \pm 0,040 ^{aB}	0,442 \pm 0,169 ^{bC}
PM +Mg	7,725 \pm 0,311 ^{bA}	6,090 \pm 0,019 ^{bA}	6,949 \pm 0,001 ^{dA}

Valor medio (n=2) \pm desviación estándar. Diferentes letras minúsculas en cada columna indican diferencias a $p \leq 0,05$ entre los materiales de la pared para cada tiempo de almacenamiento, según la prueba de Tukey (HSD). Diferentes letras mayúsculas en cada fila indican diferencias a $p \leq 0,05$ entre los tiempos de almacenamiento para cada material de la pared, según la prueba de Tukey (HSD).

La comparación entre la distribución del tamaño de partículas de las ER y las correspondientes a las emulsiones previo al secado, puede proporcionar información sobre la estabilidad de las gotas de aceite durante el proceso de

secado (Hogan y col., 2001). En el presente trabajo, la distribución del tamaño de partículas de las ER después de 15 d de almacenamiento (**Figura 4.9.a**) fue similar al de las emulsiones de partida, presentando curvas mono o bimodales para los sistemas con caseinato de sodio y trimodales para emulsiones con PRF. Luego de 45 d de almacenamiento, las ER con caseinato de sodio presentaron gotas en un amplio rango de tamaños, lo que sugiere la formación de partículas de mayor tamaño (gotas floculadas y/o agregadas) (**Figura 4.9. b**).

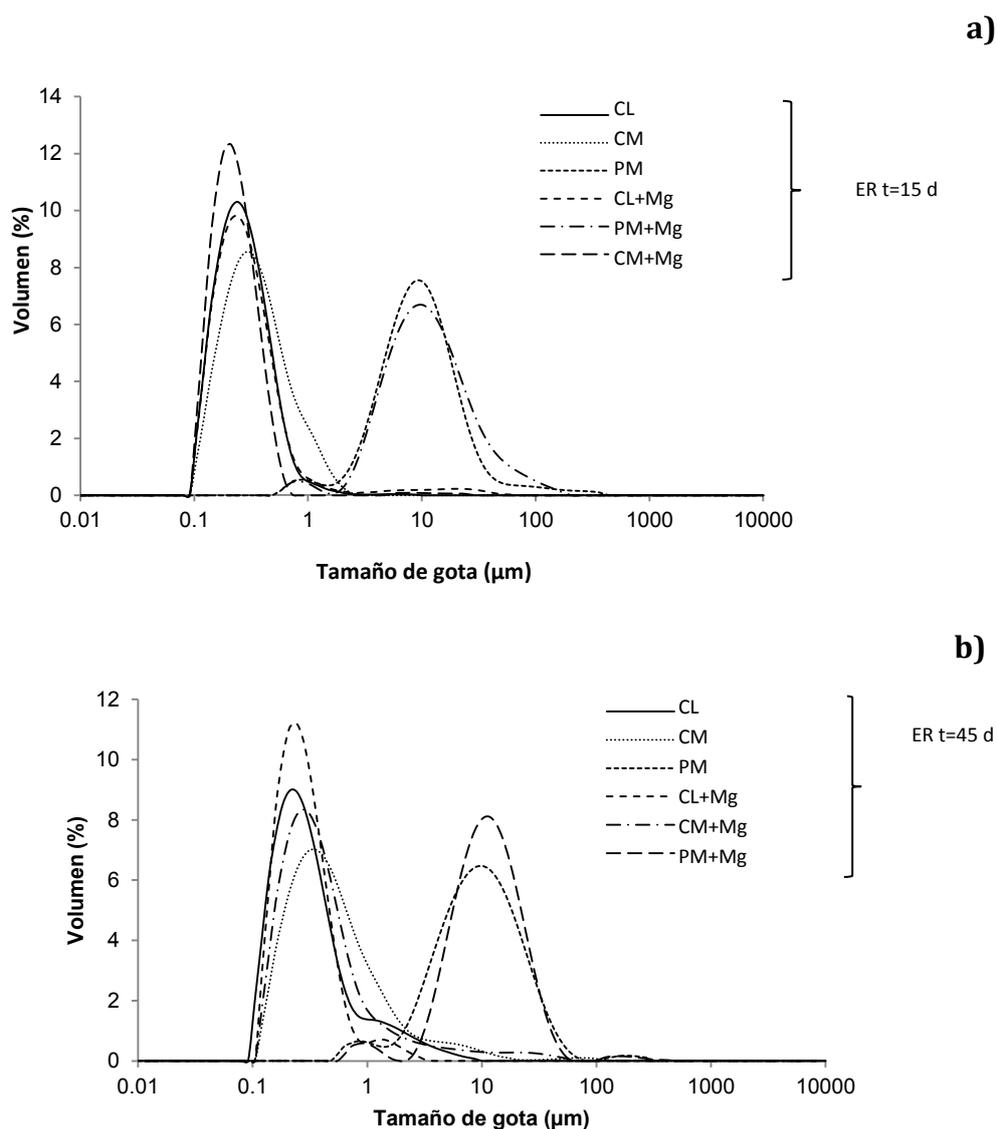


Figura 4.9. Distribución de tamaño de partículas correspondiente a emulsiones reconstituidas (ER) a partir de microcápsulas de aceite de chía almacenadas a $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, HR 33% **a)** 15 d, **b)** 45 d

La estabilidad global de las ER fue monitoreada durante ~30 d después de su reconstitución mediante su respectiva caracterización óptica con un Analizador Vertical de barrido (QuickScan). Los perfiles de “Back Scattering” (BS) de las ER a partir de las microcápsulas CL, CM y PM se presentan en la **Figura 4.10.a, b y c**, respectivamente. Inmediatamente después de la reconstitución ($t=0$), todas las ER fueron estables, con una distribución de partículas homogénea a lo largo del tubo. En cuanto a la estabilidad durante el almacenamiento, las ER a partir de las microcápsulas con caseinato de sodio mostraron una alta estabilidad global sin cambios significativos en los perfiles de BS en función del tiempo de almacenamiento estudiado (**Figura 4.10. a, b**). Este hecho podría estar asociado al menor tamaño de gotas que presentaron estos sistemas. Por otra parte, se detectó un proceso de clarificación en la parte inferior de los tubos de las ER con PRF después de 15 d de almacenamiento (**Figura 4.10.c**). Este comportamiento podría relacionarse con los mayores valores de D [3,2] asociados a estos sistemas y a la libre movilidad de las gotas de aceite debido a las débiles fuerzas viscosas de las fases acuosas de estos sistemas. El mayor tamaño de partículas de los sistemas con PRF puede asociarse al valor medio de “Back Scattering” (BS_{AV}) a lo largo del tubo. En virtud de las consideraciones previamente comentadas, cuando el tamaño de partícula es mayor que la longitud de onda incidente (λ), el BS disminuye con el diámetro medio de las partículas (Mengual y col., 1999). Por lo tanto, los valores inferiores de BS_{AV} de las ER con PRF podrían estar relacionados con la presencia de tamaños de partículas (6,090-6,949 μm , **Tabla 4.6**) mayores que λ (0,8 μm) en contraste con los sistemas con caseinato de sodio. Las ER obtenidas a partir de microcápsulas con mucílago de chíá presentaron perfiles de BS similares a los sistemas sin mucílago (datos no mostrados).

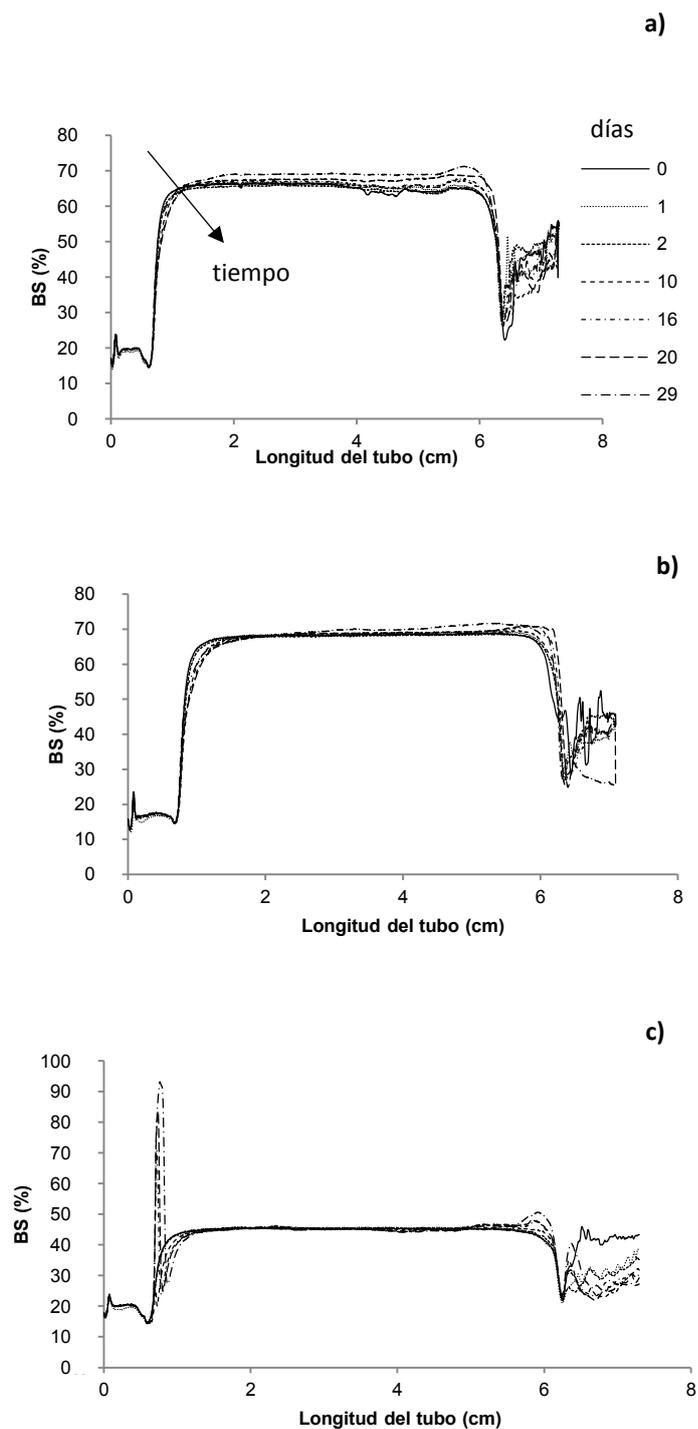


Figura 4.10. Perfiles de “Back Scattering” de emulsiones reconstituidas (ER) (10g sólidos/100g) a partir de microcápsulas de aceite de chía en función del tiempo de almacenamiento ($\sim 0,05$ -29 d) y de la longitud del tubo **a)** CL; **b)** CM; **c)** PM

3.2. Microencapsulación de aceite de chía mediante secado por liofilización de emulsiones O/W multicapa (LBL)

Caracterización de emulsiones previo secado

Las características asociadas a este tipo de emulsiones no convencionales evidenciaron valores del D [3, 2] comprendidos en un rango de 0,365 a 0,607 μm correspondientes a los sistemas L+M y PCQ+M, respectivamente. En cuanto a la polidispersidad (Span), la misma varió entre 1,380 y 9,052 como se observa en la **Tabla 3.3 (Capítulo 3)**. Cabe destacar desde el punto de vista estadístico el efecto significativo asociado al tipo de lecitina modificada de girasol empleado (LGD o FPC), la adición de quitosano (Ch) y a su vez, la interacción entre ambos factores.

Las curvas de distribución de tamaño de partículas correspondientes a emulsiones estabilizadas con LGD presentaron un carácter monomodal (L+M) y bimodal, en el caso de las respectivas emulsiones secundarias (LQ+M). Cuando el tipo de agente emulsificante fue FPC pudo observarse un comportamiento bimodal tanto en las emulsiones primarias (PC+M) como en las secundarias (PCQ+M) (ver **Figura 3.4, Capítulo 3**).

La caracterización reológica y el ajuste de los resultados experimentales según la ley de la Potencia también permitió la obtención de coeficientes de determinación $R^2 > 0,98$. Tanto las emulsiones primarias como las secundarias obtenidas con la presencia de ambos tipos de lecitinas modificadas de girasol exhibieron un comportamiento newtoniano ($n \sim 1$). Por otra parte, es de destacar el efecto significativo sobre la viscosidad (η_{100}) registrado en el caso de la adición de quitosano empleado en la obtención de las emulsiones secundarias (LQ+M, PCQ+M) (ver **Tabla 3.4, Capítulo 3**).

En lo que se refiere a la estabilidad global, las emulsiones primarias presentaron una desestabilización por cremado, la cual fue más evidente en el caso de los sistemas constituidos por FPC y M (PC+M). En contraste, pudo visualizarse una mayor estabilidad asociada a las emulsiones secundarias (PCQ+M, LQ+M) respecto de las primarias, especialmente a través de la evolución del índice de cremado (ver **Figura 3.8, Capítulo 3**).

Caracterización de las microcápsulas y emulsiones reconstituidas

La **Tabla 4.7** resume las propiedades fisicoquímicas correspondientes a las diversas microcápsulas de aceite de chía obtenidas por liofilización. Como puede observarse, el contenido de humedad de las microcápsulas se vio afectado ($p \leq 0,05$) por el tipo de lecitina de girasol modificada y la formación de una bicapa interfacial mediante la adición de quitosano, siendo también significativa la interacción entre ambos factores. Los valores de humedad (% b.s.) se encontraron comprendidos en un rango de 0,016-0,092, los cuales resultan ser inferiores a los requeridos para obtener microcápsulas de aceite de chía con una buena estabilidad durante el almacenamiento (3–4% b.s.) (Klaypradit y Huang, 2008). Las microcápsulas formuladas con LGD registraron niveles de a_w inferiores ($p \leq 0,05$) a los sistemas con FPC. En ambos casos, se evidenció un nivel de a_w adecuado al proceso de liofilización aplicado para la microencapsulación. Así, tanto el nivel de a_w como el contenido de humedad alcanzados podrían ser compatibles con su potencial incorporación en matrices alimentarias deshidratadas (**Tabla 4.7**).

La eficiencia de la microencapsulación (%EM) del aceite de chía fue determinada a través de la cuantificación del aceite extraído por lavado con hexano luego de la liofilización, en cada caso. El aceite liberado brinda información acerca del grado en el que la fase dispersa ha sido encapsulada. Los niveles de %EM obtenidos en todos los sistemas fueron altos, lo cual indica que las emulsiones de partida fueron efectivas en lo que se refiere a la retención de aceite de chía dentro de las micropartículas durante el proceso de microencapsulación, no registrándose pérdidas significativas de aceite a nivel superficial. Como puede ser observado en la **Tabla 4.7**, el tipo de lecitina de girasol modificada empleado tuvo un efecto significativo ($p \leq 0,05$) sobre la %EM. Así, las microcápsulas formuladas con lecitina “deoiled” presentaron una mayor eficiencia de microencapsulación o retención del aceite de chía (~97%) que las preparadas con FPC (~85-89%), si bien en ambos casos los niveles de este parámetros pueden considerarse aceptables. Entre los principales factores que determinan la eficiencia del proceso de microencapsulación pueden mencionarse las propiedades de los materiales de pared y del núcleo así como también, las características de la emulsión de partida y los parámetros del proceso de secado (de Vos y col., 2010). La menor %EM de los sistemas con FPC podría estar vinculada con el proceso de liofilización, debido a

posibles daños de la estructura de la microcápsula causados por la desestabilización de la emulsión durante la congelación y el secado (Klinkesorn y col., 2005).

Tabla 4.7. Propiedades fisicoquímicas de microcápsulas de aceite de chía obtenidas a partir de emulsiones mono (L+M, PC+M) y multicapa (LBL) (LQ+M, PCQ+M)

Microcápsula	Humedad (%b.s.)	a_w (25°C)	EM (%)	D [3,2] (µm)	Polidispersidad (Span)
L+M	0,016±0,001 ^a	0,0651±0,001 ^a	97,683±0,745 ^b	2,392±0,259 ^a	2,368±0,156 ^b
LQ+M	0,048 ±0,003 ^b	0,069±0,007 ^a	97,570±1,204 ^b	0,823±0,019 ^a	3,064±0,547 ^b
PC+M	0,092±0,003 ^c	0,168±0,003 ^b	85,846±4,756 ^a	10,823±0,231 ^b	1,985±0,033 ^a
PCQ+M	0,089±0,002 ^c	0,144±0,011 ^b	89,283±1,398 ^a	10,420±2,544 ^b	1,949±0,096 ^a

Valores medios (n = 2) ± desviación estándar. Diferentes letras en cada columna indican diferencias $p \leq 0,05$ entre las microcápsulas, de acuerdo con la prueba de Tukey (HSD)

La microestructura de las microcápsulas de aceite de chía obtenidas a partir de emulsiones mono (L+M, PC+M) y multicapa (LBL) (LQ+M, PCQ+M) fue investigada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), cuyos resultados se muestran en la **Figura 4.11**. En general, las partículas correspondientes a los diferentes polvos constituidos por aceite microencapsulado de chía exhibieron forma de láminas con una geometría irregular. La topografía externa evidenció un aspecto rugoso, así como la presencia de ciertas protuberancias, especialmente esto último para los sistemas PC+M y PCQ+M. Asimismo, pudo observarse la formación de poros, los cuales podrían estar asociados a la generación de cristales de hielo o burbujas de aire retenidos durante la congelación. Este tipo de estructuras es habitual en el caso de microcápsulas obtenidas por liofilización (Laine y col., 2008; Sousdaleff y col., 2013).

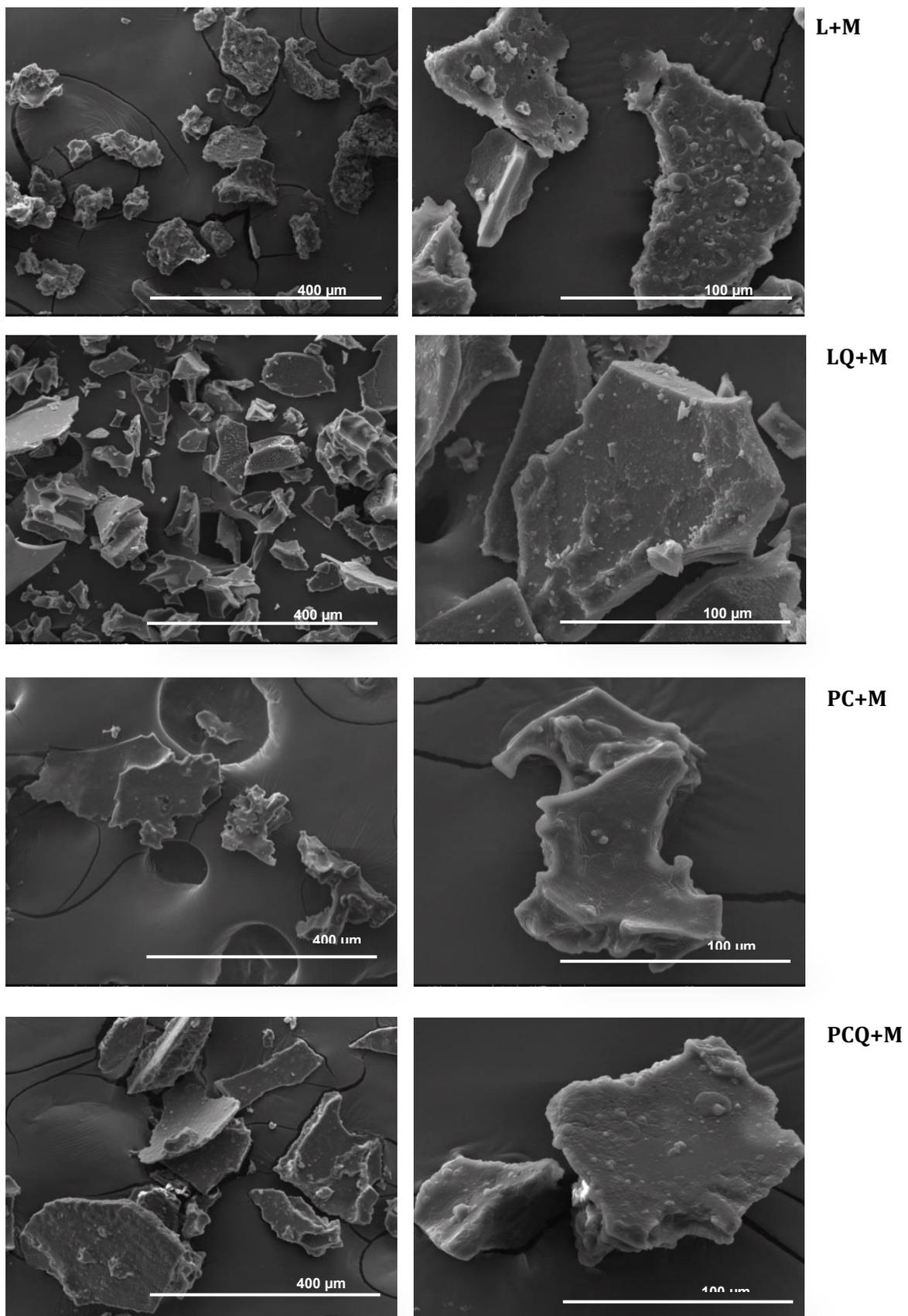


Figura 4.11. Micrografías SEM de microcápsulas de aceite de chía obtenidas mediante liofilización a partir de emulsiones mono (L+M, PC+M) y multicapa (LQ+M, PCQ+M) con una magnificación de 400x (izquierda) y 1600x (derecha)

Si bien la oxidación lipídica está asociada a la modificación del color de las microcápsulas, la caracterización y la evolución de este parámetro durante el almacenamiento es importante considerando su potencial aplicación como ingredientes para obtener productos ricos en ácidos grasos ω -3. El color se determinó a través de los parámetros L (blanco y luminoso), a^* (enrojecimiento) y b^* (amarillento). Los polvos con aceite de chía a tiempo inicial ($t = 0$) exhibieron elevados valores de L y en menor medida de b^* , los cuales no se vieron afectados ($p > 0,05$) por el tipo de lecitina modificada de girasol empleada ni por la adición de quitosano, siendo los valores de a^* bajos en todos los casos (**Tabla 4.8**). Luego de 60 días de almacenamiento a 20 ± 2 °C, HR 33%, los polvos registraron un incremento ($p \leq 0,05$) del parámetro b^* y una leve disminución de L. La evolución de los parámetros de color evidenció una apariencia ligeramente más oscura y amarillenta de las microcápsulas de aceite de chía al final del almacenamiento (**Tabla 4.8**).

Tabla 4.8. Parámetros de color de microcápsulas de aceite de chía obtenidas a partir de emulsiones mono (L+M, PC+M) y multicapa (LBL) (LQ+M, PCQ+M) en función del almacenamiento a 20 ± 2 °C, HR 33%

Microcápsula	t=0 d			t=60 d		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
L + M	91,840 \pm 1,117 ^a	0,365 \pm 0,290 ^b	10,19 \pm 0,877 ^a	89,045 \pm 0,615 ^b	0,485 \pm 0,007 ^b	13,595 \pm 0,092 ^a
LQ + M	91,480 \pm 0,693 ^a	0,485 \pm 0,064 ^b	10,09 \pm 1,018 ^a	89,370 \pm 1,103 ^a	0,455 \pm 0,134 ^b	14,795 \pm 0,870 ^a
PC + M	91,300 \pm 2,843 ^a	-1,335 \pm 0,304 ^a	11,275 \pm 0,332 ^a	91,555 \pm 0,007 ^b	-1,77 \pm 0,113 ^a	15,205 \pm 0,078 ^a
PCQ + M	89,790 \pm 0,679 ^a	-0,785 \pm 1,379 ^a	11,26 \pm 0,297 ^a	85,150 \pm 0,424 ^a	0,615 \pm 0,120 ^b	21,44 \pm 0,099 ^b

Valores medios ($n = 2$) \pm desviación estándar. Diferentes letras minúsculas en cada columna indican diferencias $p \leq 0,05$ entre las microcápsulas, de acuerdo con la prueba de Tukey (HSD).

La dispersabilidad de los diferentes sistemas fue determinada mediante la técnica de difracción láser. En cada medición se registró la fracción de luz perdida del haz del láser principal (oscurecimiento) en función del tiempo de agitación luego de la incorporación de cada muestra a 500 mL de solución buffer acetato de sodio-ácido acético pH 3. Así, a partir de este ensayo fue posible examinar la velocidad y eficiencia de dispersión de cada polvo en agua (Klinkesorn y col., 2005). Al inicio del almacenamiento todos los polvos registraron un incremento

casi inmediato del oscurecimiento (<1 min) en función del tiempo de agitación, alcanzando un valor máximo continuo (**Figura 4.12**).

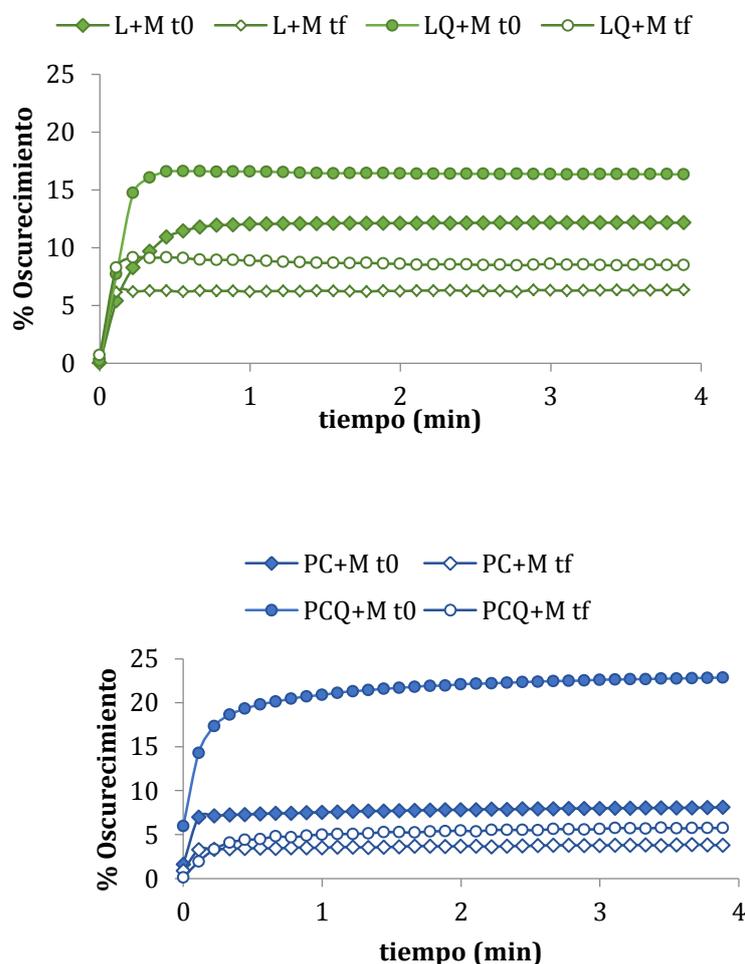


Figura 4.12. Influencia del tiempo de agitación sobre el porcentaje de oscurecimiento de microcápsulas de aceite de chía almacenadas a 20 ± 2 °C y 33% HR evaluada a tiempos inicial (t0) y final (tf 60 d) (n=2)

Las microcápsulas obtenidas a partir de la liofilización de emulsiones secundarias (LQ+M, PCQ+M) presentaron valores de oscurecimiento mayores que los sistemas obtenidos a partir de emulsiones primarias o monocapa (L+M, PC+M). Asimismo, luego de 60 días de almacenamiento a 20 ± 2 °C, HR 33% los polvos registraron un incremento abrupto en el oscurecimiento aunque con niveles significativamente menores a los correspondientes al tiempo inicial. De esta manera, el aumento del oscurecimiento observado en los primeros segundos de agitación en todos los polvos estaría vinculado a la disminución del tamaño de

partícula y sugieren que gran porcentaje de los polvos pudo dispersarse de forma rápida dando lugar a una suspensión (Klinkesorn y col., 2005). Por otra parte, la reducción del nivel de oscurecimiento con respecto al tiempo inicial estaría relacionada con la disminución en la capacidad de rehidratación de los polvos, la cual podría deberse a la formación de agregados. En síntesis, la dispersabilidad podría denotar una rehidratación aceptable de los polvos, siendo este hecho favorable para su posible aplicación en alimentos instantáneos.

Las diferentes emulsiones O/W deshidratadas fueron reconstituidas en forma análoga a lo descrito previamente dispersándolas en solución de buffer acetato de sodio-ácido acético pH 3. Luego, sobre estas emulsiones reconstituidas (ER) se determinaron la distribución de tamaño de partícula, el diámetro medio y el ζ -potencial. En la **Tabla 4.7** pueden verse los valores del diámetro medio D [3,2] y la polidispersidad (Span) correspondientes a las microcápsulas de aceite de chía. Pudo observarse que tanto los tamaños de partículas como los valores de polidispersidad fueron afectados ($p \leq 0,05$) por el tipo de lecitina modificada de girasol empleada en la preparación de las microcápsulas, no así por el agregado de quitosano. Las microcápsulas formuladas con LGD exhibieron diámetros medios menores y valores de polidispersidad (Span) mayores a los obtenidos con PC.

Con respecto al D [3,2], el mismo registró un aumento significativo en todas las emulsiones reconstituidas con una tendencia similar a la informada por Klinkesorn y col. (2005). Estos autores sugieren que este aumento se debe a la floculación y/o la coalescencia producida en las emulsiones después de su reconstitución. En los sistemas con LGD, el agregado de quitosano (emulsiones secundarias) disminuyó la agregación de las gotas. Diversos autores han señalado que la agregación de las gotas de las emulsiones puede ocurrir durante la etapa de congelación y/o el secado. Los posibles mecanismos fisicoquímicos involucrados durante el secado incluyen lo siguiente: (i) cuando el agua se retira, las gotas se acercan más entre sí facilitando la coalescencia; (ii) la deshidratación de las moléculas del agente emulsificante puede promover interacciones entre las mismas adsorbidas sobre diferentes gotas. Además, la estabilidad frente a la coalescencia puede mejorarse mediante la adición de altas concentraciones de carbohidratos previo al secado. Estas sustancias pueden formar una fase vítrea alrededor de las gotas lo que impide su aproximación o bien, establecer enlaces de

hidrógeno con las moléculas del agente emulsificante adsorbidas, evitando así las interacciones entre diferentes membranas (Allison y col., 1998; 1999).

La **Figura 4.13** muestra la distribución de tamaño de partículas de las microcápsulas obtenidas a partir de emulsiones O/W mono y multicapa. Los sistemas en polvo obtenidos a partir de emulsiones primarias (L+M) y/o secundarias con LGD (LQ+M) presentaron una distribución bimodal. En L+M se observó un pico mayoritario y un hombro correspondiente a una población partículas de menor tamaño. En contraste, las ER provenientes de microcápsulas con adición de quitosano evidenciaron de forma más neta la presencia de dos poblaciones de partículas de distinto tamaño.

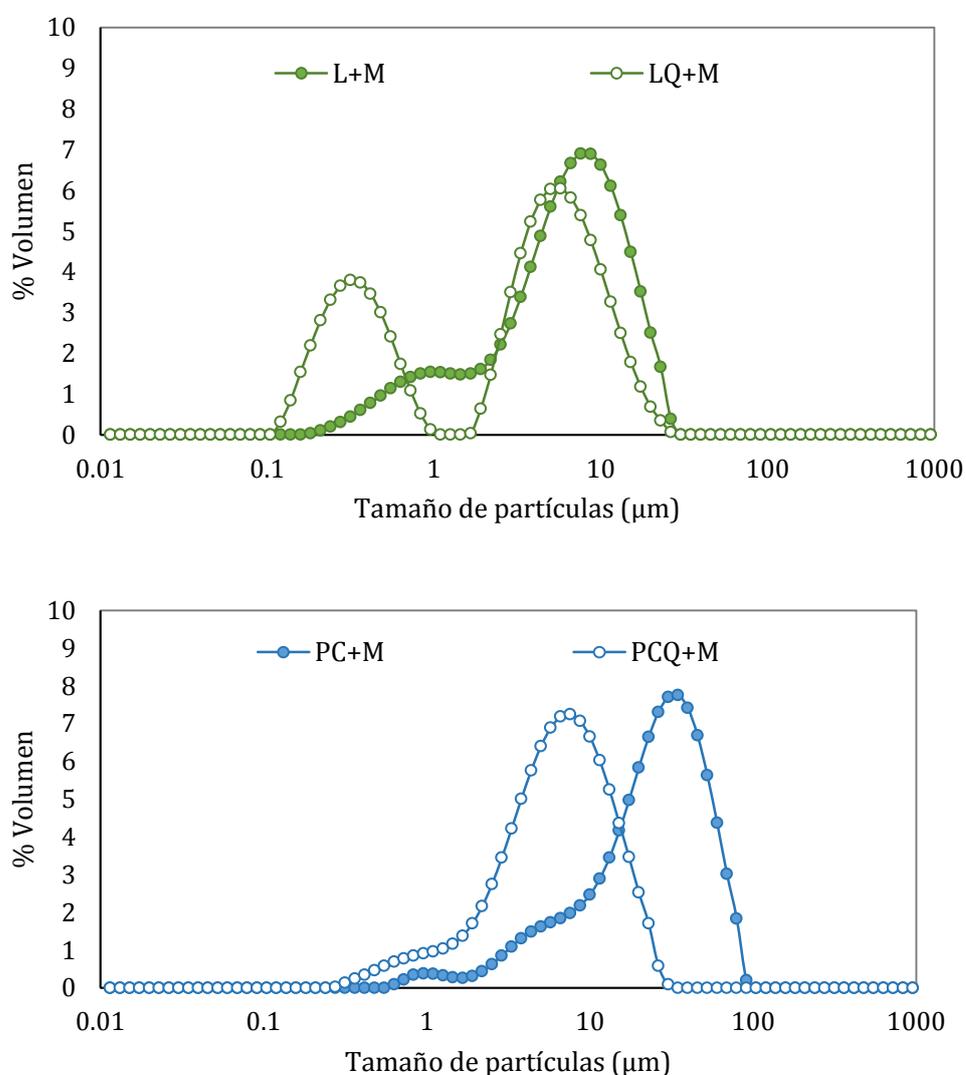


Figura 4.13. Distribución de tamaño de partículas correspondiente a ER provenientes de sistemas en polvo (aceite microencapsulado de chía) obtenidos por liofilización

En cuanto a las emulsiones primarias (PC+M), las mismas exhibieron un pico mayoritario y dos hombros (partículas de menor tamaño) y en el caso de las secundarias (PCQ+M) se registró un pico y un hombro con un desplazamiento hacia un menor tamaño de partículas.

A fin de determinar la capacidad de las membranas interfaciales de las gotas de las emulsiones primarias y secundarias para permanecer intactas tras la reconstitución de las microcápsulas, se realizaron mediciones del ζ -potencial durante el almacenamiento. Las gotas correspondientes a las emulsiones primarias reconstituidas (L+M y PC+M) presentaron una carga superficial de -38 y -33 mV, sin registrar cambios significativos ($p > 0,05$) durante el almacenamiento. La emulsión recubierta con el sistema multicapa (LQ+M, PCQ+M) (emulsiones secundarias) presentaron valores de ζ - potencial de +46 mV durante el periodo estudiado. La carga neta de las gotas correspondientes a las emulsiones primarias fue negativa, lo que indica que ambas lecitinas modificadas de girasol –de carácter aniónico- permanecieron adsorbidas sobre la superficie de las gotas luego de la reconstitución y el almacenamiento. Análogamente, el quitosano –de carácter catiónico- permaneció adherido a la capa de lecitina aniónica, tal como pudo observarse mediante la inversión de carga (valor de ζ -potencial positivo) de las gotas de la emulsión (**Figura 4.14**).

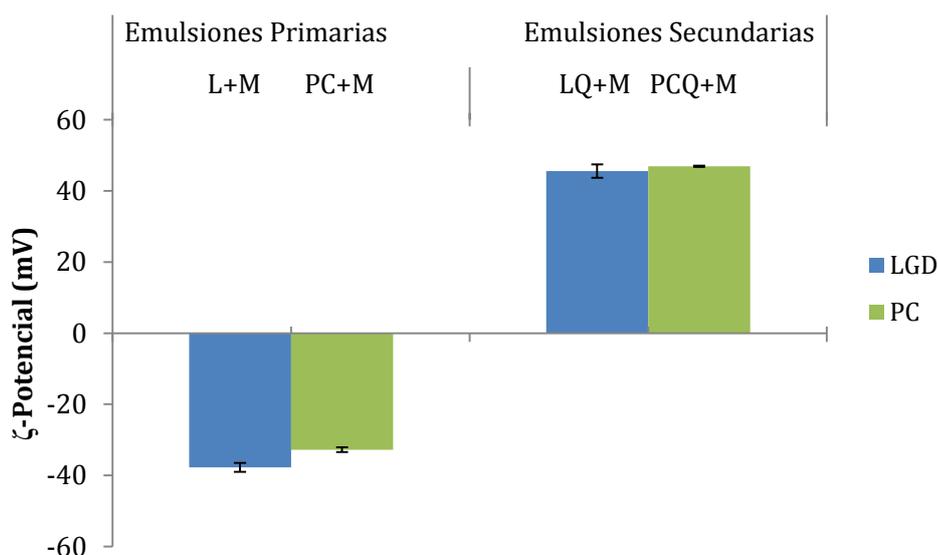


Figura 4.14. ζ -Potencial correspondiente a microcápsulas de aceite de chía obtenidas a partir de emulsiones O/W mono y multicapa reconstituidas

La estabilidad oxidativa del aceite de chía microencapsulado fue evaluada mediante un ensayo acelerado (Rancimat) inmediatamente después del secado ($t = 0$ d) y al cabo de 60 días de almacenamiento. El análisis estadístico brindó como información que el tipo de lecitina de girasol modificada, la adición de quitosano y la interacción de ambos factores afectaron significativamente el tiempo de inducción (t_i) de los sistemas estudiados (**Tabla 4.9**). Los resultados obtenidos evidenciaron una importante incidencia del proceso de microencapsulación aplicado (emulsificación convencional o por la técnica LBL seguida de liofilización) en virtud del importante aumento registrado en los respectivos tiempos de inducción respecto del aceite de chía sin microencapsular ($t_i = 2,62 \pm 0,07$ h). Cabe señalar además, el efecto protector relacionado con la deposición del quitosano para formar la bicapa, lo cual se traduce en un mayor incremento del tiempo de inducción que la contribución registrada en los sistemas monocapa (**Tabla 4.9**). Por otra parte, la influencia del tiempo de almacenamiento se tradujo en una disminución significativa ($p \leq 0,05$) de la estabilidad oxidativa en todos los sistemas estudiados. Estos resultados presentaron una tendencia similar a la informada por Carvalho y col. (2014); Noello y col. (2016).

Tabla 4.9. Tiempos de inducción (t_i) correspondientes a microcápsulas de aceite de chía obtenidas a partir de emulsiones mono y multicapa con lecitinas de girasol modificadas (LGD, FPC)

		tiempo de almacenamiento (días)	
		0	60
control		tiempo de inducción (h)	
Aceite de chía		2,62±0,07	0,03±0,08
Microcápsulas de aceite de chía			
monocapa	L+M	16,56±0,13 ^b	7,64±0,03 ^a
	PC+M	12,57±0,04 ^a	7,13±0,79 ^a
multicapa	LQ+M	27,93±0,65 ^d	13,09±3,35 ^b
	PCQ+M	22,17±0,23 ^c	11,76±1,60 ^b

Valores medios ($n = 2$) \pm desviación estándar. Diferentes letras minúsculas en cada columna indican diferencias $p \leq 0,05$ entre las microcápsulas, de acuerdo con la prueba de Tukey (HSD)

En la **Figura 4.15** puede visualizarse la evolución del valor de peróxidos de aceite de chía a granel y microencapsulado mediante liofilización de emulsiones

primarias (L+M, PC+M) y secundarias (LQ+M, PCQ+M) en función del tiempo de almacenamiento a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, HR 33%. Los resultados obtenidos indicaron una importante protección del aceite de chía debida a la aplicación del proceso de microencapsulación respecto del aceite sin encapsular (**Figura 4.15**). Todos los sistemas microencapsulados no se diferenciaron entre sí ($p>0,05$), registrando valores inferiores a 10 meq hidropéroxidos/kg de aceite durante un periodo de alrededor de 40-45 días de almacenamiento en las condiciones ensayadas.

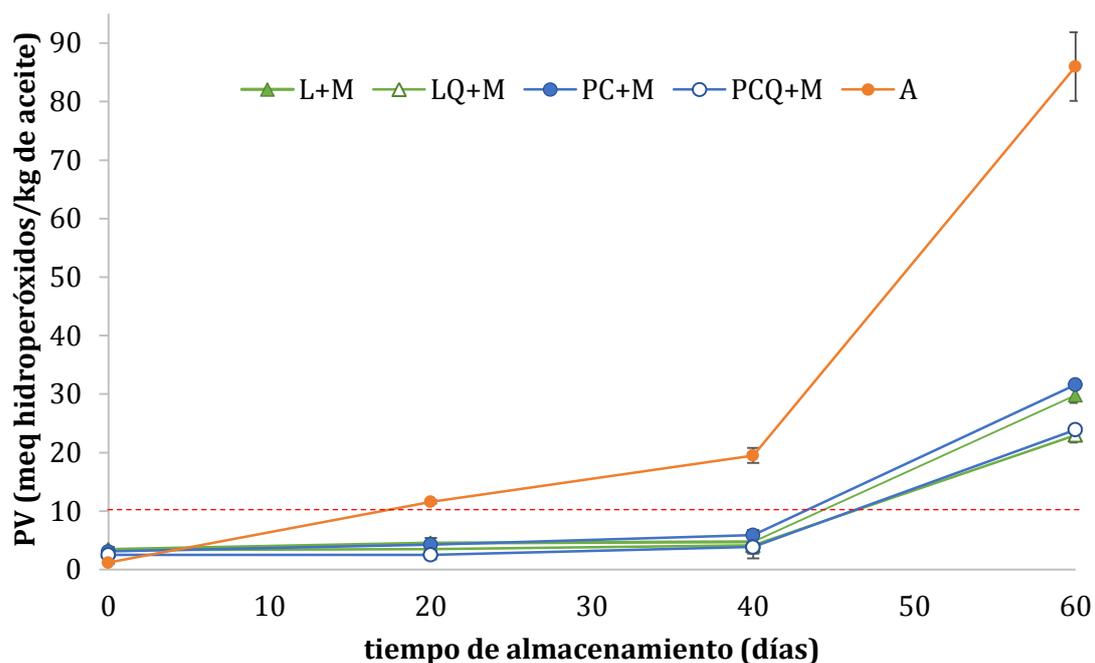


Figura 4.15. Evolución del valor de peróxidos de aceite de chía a granel y microencapsulado mediante liofilización de emulsiones primarias (L+M, PC+M) y secundarias (LQ+M, PCQ+M) en función del tiempo de almacenamiento a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, HR 33%. Valores medios \pm desviación estándar ($n = 2$)

4. Conclusiones Parciales

Microencapsulación de aceite de chía mediante el secado por aspersión de emulsiones O/W convencionales

Efecto de las condiciones de homogeneización y secado sobre las propiedades fisicoquímicas de microcápsulas con aceite de chía

- Los resultados indican que el procedimiento de microencapsulación consistente en **emulsificación** usando **homogeneizador a válvula de alta presión** y posterior **secado por aspersión** es adecuado para la preparación de microcápsulas de caseinato de sodio-lactosa que contienen aceite de chía. Los resultados muestran que el proceso de microencapsulación es eficiente (%EM>90) y permite alcanzar un alto nivel de retención del aceite.
- La **presión de homogeneización** durante la emulsificación tuvo una mayor influencia en las propiedades fisicoquímicas de las microcápsulas y las emulsiones reconstituidas respecto de las **temperaturas de entrada/salida en el secado por aspersión**. El contenido de humedad y de a_w de las microcápsulas fueron menores para niveles de 600 bar de presión durante la emulsificación previo al secado respecto de 400 bar. La estabilidad física de las emulsiones reconstituidas fue mayor a 600 bar.
- Con respecto a la estabilidad oxidativa, la microencapsulación ofreció protección frente a la oxidación lipídica del aceite de chía durante el almacenamiento. A 400 bar, fue posible obtener aceite de chía microencapsulado con PV <10 meq de hidroperóxidos/ kg de aceite al cabo de 150 días de almacenamiento a 20 ± 2 °C, RH 33%.

Efecto de distintos materiales de pared sobre las propiedades fisicoquímicas de microcápsulas con aceite de chía

- El aceite de chía (*Salvia hispanica* L.) fue **microencapsulado** mediante secado por aspersión utilizando diversos **materiales de pared** (mezclas de proteínas e hidratos de carbono) incluyendo subproductos funcionales de la semilla de chía (fracción rica en proteínas y mucílago fibra dietaria soluble).
- Los sistemas en polvo obtenidos exhibieron un bajo contenido de humedad y a_w , partículas de forma esférica sin grietas o fisuras y una rápida dispersión en agua (~1,5-2,0 min). En todos los casos, la estabilidad oxidativa del aceite de chía microencapsulado fue significativamente mayor que la del aceite de chía sin encapsular.
- Los sistemas obtenidos a partir de la combinación CL (con o sin mucílago chía) registraron la mayor eficiencia de microencapsulación del aceite secado por aspersión (> %EM). Si bien los sistemas CM y CM+Mg presentaron una menor %EM, los mismos exhibieron la mayor estabilidad oxidativa en el ensayo de Rancimat. La adición de mucílago de chía mejoró significativamente la %EM en los sistemas CM, alcanzando valores > 85%.
- En comparación a los sistemas con caseinato de sodio, las microcápsulas con PRF mostraron la menor %EM y el mayor contenido de aceite libre a nivel superficial. Sin embargo, el t_i registrado para estos sistemas fue tres veces mayor que el correspondiente al del aceite de chía sin encapsular, lo cual podría indicar que este material de pared es eficiente para evitar la oxidación del aceite de semilla de chía. Una investigación complementaria sería necesaria para estudiar la potencial aplicación de PRF mediante otra combinación de materiales de pared y diferentes técnicas de microencapsulación a fin de obtener mayores %EM.

Microencapsulación de aceite de chía mediante el secado por liofilización de emulsiones O/W multicapa

- Se obtuvieron y caracterizaron *microcápsulas de aceite de chía* a partir de emulsiones con interfases mono y bicapa. La técnica de deposición electrostática “*layer-by-layer*” (*LBL*) de quitosano sobre la membrana interfacial de emulsiones constituidas por lecitinas de girasol modificadas (LGD, FPC) pudo ser evidenciada mediante la inversión de carga eléctrica superficial de las gotas desde ~ -33 y -38 a $\sim +46$ mV.
- Cabe señalar que el contenido de humedad de las microcápsulas se vio afectado ($p \leq 0,05$) por el *tipo de lecitina de girasol modificada* y la formación de una bicapa interfacial debida a la *adición de quitosano*, siendo también significativa la interacción entre ambos factores.
- Los valores de humedad (% b.s.) se encontraron comprendidos en un rango de 0,016 - 0,092, siendo inferiores a los requeridos para obtener microcápsulas de aceite de chía con una buena estabilidad durante las condiciones de almacenamiento estudiadas. Asimismo, se evidenció un nivel de a_w compatible con el proceso de liofilización aplicado durante la microencapsulación.
- El *tipo de lecitina de girasol modificada* empleado tuvo un efecto significativo ($p \leq 0,05$) sobre la %EM. Así, las microcápsulas formuladas con lecitina “deoiled” presentaron una mayor eficiencia de microencapsulación o retención del aceite de chía (~ 97 %) que las preparadas con FPC ($\sim 85-89$ %), si bien en ambos casos los niveles de este parámetro pueden considerarse aceptables.
- La microestructura correspondiente a los diferentes polvos constituidos por aceite microencapsulado de chía exhibieron forma de láminas con una geometría irregular. La topografía externa evidenció un aspecto rugoso, así como la presencia de ciertas protuberancias, especialmente para los sistemas PC+M y PCQ+M.

- Las microcápsulas obtenidas a partir de la liofilización de emulsiones secundarias (LQ+M, PCQ+M) presentaron valores de oscurecimiento mayores que los sistemas obtenidos a partir de emulsiones primarias o monocapa (L+M, PC+M). Asimismo, luego de 60 días de almacenamiento a 20 ± 2 °C, HR 33% los polvos registraron un incremento abrupto en el oscurecimiento aunque con niveles significativamente menores a los correspondientes al tiempo inicial. La dispersabilidad podría denotar una rehidratación aceptable de los polvos, siendo este hecho favorable para su posible aplicación en alimentos instantáneos.
- Los resultados obtenidos evidenciaron una importante incidencia del proceso de microencapsulación aplicado (emulsificación por la técnica LBL seguida de liofilización) en virtud del importante aumento registrado en los respectivos tiempos de inducción (t_i) y un menor aumento del contenido de hidroperóxidos (PV) respecto del aceite de chía sin microencapsular.

En síntesis, el aceite de chía microencapsulado podría utilizarse como agente fortificante en el desarrollo de alimentos funcionales.

5. Difusión de Resultados

Publicaciones científicas en revistas internacionales

- **Physicochemical characterization and stability of chia oil microencapsulated with sodium caseinate and lactose by spray-drying.** Ixtaina, V. Y., Julio, L. M., Wagner, J. R., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2015). *Powder Technology*, 271, 26-34.

Presentaciones en congresos y/o jornadas

- **Desarrollo de emulsiones O/W y microcápsulas con aceite de chía como sistema de incorporación de ácidos grasos omega-3.** Luciana M. Julio, Vanesa Y. Ixtaina, Jorge R. Wagner, Susana M. Nolasco, Mabel C. Tomás. XXI Jornadas Jóvenes Investigadores AUGM - Universidad Nacional del Nordeste, 14 al 16 de Octubre de 2013. Corrientes, Argentina. Trabajo Extendido.
- **Effect of different wall materials on the physicochemical properties of spray-dried microencapsulated chia oil.** Ulil Us-Medina, Vanesa Y. Ixtaina, Luciana M. Julio, Jorge R. Wagner, Susana M. Nolasco, Mabel C Tomás. 106th AOCS Annual Meeting and Industry Showcases, 3 al 6 de Mayo de 2015, Orlando, Florida, USA.
- **Characterization of chia microencapsulated oil from freeze-dried layer-by-layer emulsions with sunflower lecithin.** Luciana M. Julio, Vanesa Y. Ixtaina, Susana M. Nolasco, Mabel C. Tomás. AOCS 2017 Annual Meeting and Industry Showcases, 30 de Abril al 3 de Mayo de 2017, Orlando, Florida, USA.



Conclusiones generales

El presente trabajo de Tesis Doctoral permitió realizar el estudio de la incorporación de subproductos de la semilla de chía (*Salvia hispanica* L.) en alimentos mediante la obtención y caracterización de distintos sistemas de provisión de compuestos funcionales tales como emulsiones O/W y microcápsulas. Dichos sistemas constituyen estrategias innovadoras de inclusión de ácidos grasos omega 3, proteínas, fibra dietética, antioxidantes naturales, lo cual representa un aporte significativo tendiente a la revalorización y adecuada aplicación de esta especie vegetal en la industria alimentaria, mediante el desarrollo de alimentos funcionales, con beneficios potenciales para el consumidor.

En virtud de ello, pueden expresarse las siguientes conclusiones generales:

Emulsiones alimentarias funcionales

Emulsiones O/W con aceite de chía obtenidas mediante técnicas de emulsificación convencionales

- Se obtuvieron y caracterizaron emulsiones O/W con aceite de chía investigando la influencia de la concentración de un agente emulsificante protéico (caseinato de sodio) y la adición de lactosa. Asimismo, se evaluó la incidencia del nivel de la presión como condición operativa del proceso de homogeneización. Estos factores fueron muy relevantes (concentración de caseinato de sodio > presión de homogeneización > adición de lactosa) dado que afectaron la mayoría de las características estudiadas, tales como el diámetro medio de las partículas, las propiedades reológicas, la estabilidad fisicoquímica.
- El estudio llevado a cabo sobre la influencia de la composición de la fase acuosa en las propiedades fisicoquímicas de emulsiones O/W con la incorporación de distintos subproductos de la semilla de chía (aceite con un alto contenido de ácidos grasos ω -3, fracción protéica y/o mucílago) evidenció un comportamiento diferencial de las mismas.

- Se obtuvieron emulsiones de chíá O/W con una alta estabilidad física en el caso de *caseinato de sodio-lactosa* o *caseinato de sodio-maltodextrina*, un pequeño tamaño de partículas, baja polidispersidad, gotas cargadas negativamente (pH ~6,5) y un comportamiento pseudoplástico.
- Los sistemas formulados con la *fracción rica en proteínas de chíá* presentaron una mayor distribución del tamaño de partículas y diámetro medio que las emulsiones con caseinato de sodio, registrando un comportamiento newtoniano, con una estabilidad limitada al cabo de un corto periodo de almacenamiento debido a un proceso de desestabilización por cremado.
- La *adición del mucílago de chíá* -fibra dietética soluble- tuvo un impacto significativo, especialmente sobre las características reológicas de las emulsiones. Así, su incorporación fue relevante en el aumento de la viscosidad de la fase acuosa, lo que pudo relacionarse con la disminución del movimiento de las gotas de aceite y consecuentemente, con la mayor estabilidad de las respectivas emulsiones, lo que sugiere que tiene asociado un interesante rol como agente espesante además de considerar su aporte a nivel nutricional.

Emulsiones O/W obtenidas mediante la técnica de deposición electrostática “layer-by-layer” (LBL) bicapa con aceite de chíá

- Se obtuvieron y caracterizaron emulsiones O/W con aceite de chíá presentando interfases **monocapa** estabilizadas con lecitinas modificadas de girasol por “deoiling” (LGD) o fraccionamiento (FPC) y **bicapa** mediante el agregado de quitosano y la presencia o ausencia de maltodextrina.
- La deposición electrostática de quitosano sobre las membranas interfaciales constituidas por lecitina de girasol “deoiled” (LGD) o la fracción enriquecida en fosfatidilcolina (FPC) pudo ser evidenciada mediante la inversión de

carga eléctrica superficial de las gotas de aceite, la cual varió desde ~ -36 a $\sim +47$ mV ó bien desde ~ -37 a $\sim +55$ mV, respectivamente.

- Las emulsiones O/W primarias estabilizadas con LGD (L, L+M) y las secundarias (LQ, LQ+M) presentaron distribuciones mono y bimodales, respectivamente. El empleo de FPC registró un comportamiento monomodal para los sistemas PC, PCQ; bimodal en el caso de PC+M y trimodal para PCQ+M.
- El diámetro medio de las partículas fue dependiente ($p \leq 0,05$) de la adición de quitosano y de maltodextrina, lo cual produjo un incremento del tamaño de las partículas siendo también significativa la interacción entre los factores tipo de lecitina de girasol modificada - adición de maltodextrina. El agregado de quitosano y el tipo de lecitina de girasol modificada empleado, así como su interacción, tuvieron un efecto significativo sobre la polidispersidad. Un menor nivel de este parámetro se registró en emulsiones monocapa respecto de las emulsiones bicapa.
- Los sistemas estabilizados por bicapas interfaciales presentaron una microestructura más compacta, relacionada con un menor movimiento de las gotas de aceite debida al aumento de la viscosidad de la fase acuosa (adición de quitosano), especialmente en los sistemas LQ+M y PCQ+M.
- La incorporación de quitosano y de maltodextrina tuvieron un efecto significativo ($p \leq 0,05$) sobre todos los parámetros reológicos, mientras que el tipo de lecitina de girasol modificada empleada sólo afectó el índice de comportamiento de flujo. La interacción entre la adición de quitosano y de maltodextrina fue significativa en todos los sistemas estudiados. El agregado de maltodextrina produjo un incremento de la η_{100} de las emulsiones, especialmente notorio en las emulsiones secundarias. Asimismo, las emulsiones bicapa -especialmente las emulsiones con maltodextrina (LQ+M, PCQ+M)- presentaron niveles de η_{100} significativamente mayores ($p \leq 0,05$) respecto a los sistemas monocapa.

- Las emulsiones bicapa (LQ, LQM, PCQ, PCQ+M) registraron valores de $n < 1$ denotando un comportamiento pseudoplástico asociado al agregado de quitosano a la fase acuosa de estos sistemas. Por otra parte, los sistemas monocapa (L, L+M, PC, PC+M) presentaron un comportamiento newtoniano con valores de $n \sim 1$.
- Las emulsiones O/W bicapa registraron una mayor estabilidad global respecto de las monocapa, lo cual podría estar relacionado con el mayor nivel de viscosidad aportado por la adición de quitosano. En términos de estabilidad oxidativa, las emulsiones bicapa presentaron un mayor nivel de este parámetro que los sistemas monocapa y el aceite de chía sin emulsionar. La bicapa interfacial ofreció protección frente a la oxidación lipídica actuando como barrera ante la penetración y difusión de agentes prooxidantes (metales de transición) debido a su mayor espesor y la naturaleza catiónica de las gotas de aceite, generando fuerzas de repulsión.
- Las emulsiones O/W con aceite de chía estabilizadas por membranas interfaciales lecitinas de girasol modificadas-quitosano pueden ser empleadas para producir emulsiones de buena estabilidad física y oxidativa.

Aceite de chía microencapsulado

Aceite microencapsulado de chía obtenido mediante secado por aspersión de emulsiones O/W convencionales

- El estudio del efecto de las *condiciones de homogeneización y el secado* sobre las propiedades fisicoquímicas de microcápsulas de caseinato de sodio-lactosa con aceite de chía evidenciaron que la microencapsulación (emulsificación con homogeneizador a válvula de alta presión - secado por aspersión) resultó adecuada (%EM >90).

- La presión de homogeneización durante la emulsificación fue el factor de mayor influencia sobre las propiedades fisicoquímicas de las microcápsulas respecto de las temperaturas de entrada/salida del secado por aspersión estudiadas. A 600 bar de presión el contenido de humedad y de a_w de las microcápsulas fue menor que para los menores niveles de presión ensayados (400 bar). Además, la estabilidad física de las emulsiones reconstituidas fue mayor a 600 bar.
- La microencapsulación ofreció protección frente a la oxidación del aceite durante el almacenamiento. A 400 bar, fue posible obtener aceite de chía microencapsulado con PV <10 meq/kg de aceite al cabo de 150 días de almacenamiento a 20 ± 2 ° C y RH 33%.
- La investigación del efecto de distintos materiales de pared sobre las propiedades fisicoquímicas de microcápsulas con aceite de chía obtenido mediante secado por aspersión involucró diversas mezclas de proteínas e hidratos de carbono, incluyendo subproductos funcionales de la semilla de chía (fracción rica en proteínas y mucílago, fibra dietaria soluble).
- Los sistemas en polvo obtenidos exhibieron un bajo contenido de humedad y a_w , partículas de forma esférica sin grietas o fisuras y una rápida dispersión en agua (~1,5-2,0 min). La estabilidad oxidativa del aceite de chía microencapsulado fue significativamente mayor que la del aceite de chía libre.
- Los sistemas obtenidos a partir de la combinación CL (con y sin mucílago chía) registraron la mayor eficiencia de microencapsulación del aceite secado por aspersión, en términos de %EM. Si bien los sistemas CM y CM+Mg presentaron una menor %EM, los mismos exhibieron la mayor estabilidad oxidativa en el ensayo de Rancimat. La adición de mucílago de chía mejoró significativamente la %EM en los sistemas CM, alcanzando valores > 85%.

- Las microcápsulas con PRF mostraron la menor %EM. Sin embargo, el t_i registrado para estos sistemas fue tres veces superior al del aceite de chía sin encapsular, lo que sugiere que una investigación complementaria sería necesaria para estudiar su potencial aplicación mediante otra combinación de materiales de pared y/o diferentes técnicas de microencapsulación

Microencapsulación de aceite de chía mediante secado por liofilización de emulsiones O/W multicapa

- Se obtuvieron y caracterizaron microcápsulas de aceite de chía a partir de emulsiones con interfases mono y bicapa mediante la técnica de deposición electrostática “*layer-by-layer*” (LBL) de quitosano sobre membranas interfaciales de lecitinas de girasol modificadas (LGD o FPC) y maltodextrina (M), seguido de secado por liofilización.
- El contenido de humedad y el nivel de a_w de las microcápsulas de aceite de chía fue compatible con los asociados para lograr una buena estabilidad durante las condiciones de almacenamiento estudiadas. Ambos factores fueron afectados ($p \leq 0,05$) por el tipo de lecitina de girasol modificada, la adición de quitosano y la interacción entre ellos.
- El tipo de lecitina de girasol modificada empleado tuvo un efecto significativo ($p \leq 0,05$) sobre la %EM; los niveles de este parámetro pueden considerarse aceptables en ambos casos. Así, las microcápsulas formuladas a partir de lecitina “deoiled” o de FPC presentaron una retención de aceite de chía de ~97 y de ~85-89 %, respectivamente.
- La microestructura de los diferentes sistemas constituidos por aceite microencapsulado de chía exhibieron forma de láminas con una geometría irregular y un aspecto rugoso.

- La dispersabilidad de los sistemas en polvo denotó una rehidratación aceptable de los mismos, siendo este hecho favorable para su posible aplicación en alimentos instantáneos.
- El proceso de microencapsulación aplicado (emulsificación por la técnica LBL seguida de liofilización) registró un importante aumento de los respectivos tiempos de inducción (t_i) y un menor aumento del contenido de hidroperóxidos (PV) respecto del aceite de chía sin microencapsular en función del almacenamiento.

En síntesis, los resultados obtenidos sugieren que tanto las emulsiones O/W convencionales como las bicapa y el aceite microencapsulado constituyen sistemas alternativos “*delivery systems*” para la vehiculización de ácidos grasos ω -3 y otros subproductos de la semilla de chía, permiten mejorar la estabilidad del aceite de chía frente a la oxidación lipídica y en ambos casos, brindan una potencial aplicación en el desarrollo de alimentos funcionales.



Perspectivas futuras

Cabe señalar que uno de los desafíos asociados al desarrollo de alimentos funcionales a partir del sustrato que nos ocupa está relacionado con la adecuada preservación del alto tenor de ácidos grasos poliinsaturados ω -3 PUFAs presentes en el aceite de chía debido a su alta susceptibilidad de registrar rancidez oxidativa. Así, las formulaciones conteniendo este tipo de aceites deben alcanzar niveles de calidad, aspectos tecnológicos y sensoriales (apariencia, textura, flavor) que aseguren la aceptación de los consumidores con un conocimiento más profundo de su estabilidad fisicoquímica.

En función de los resultados obtenidos, se propone continuar con el desarrollo de sistemas de provisión o vehiculización de compuestos esenciales y sensibles provenientes de la semilla de chía a fin de lograr el enriquecimiento de alimentos. A tal efecto, se plantea la aplicación de tecnologías innovadoras (nanotecnología) para desarrollar alimentos de un valor agregado aún superior, que satisfagan la demanda local y mundial, según las recomendaciones aceptadas a nivel nutricional.

Para ello, se propone la obtención y caracterización de nanoemulsiones O/W funcionales con aceite de chía monocapa y multicapa (técnica LBL), a partir de diversas formulaciones, condiciones del entorno químico (pH, fuerza iónica), evaluando la incidencia de las variables operativas del proceso de homogeneización (microfluidización) sobre su estabilidad fisicoquímica. Asimismo, se estudiará la aplicación potencial de las proteínas y del mucílago de chía como agentes emulsificantes y espesantes en la preparación de las nanoemulsiones mencionadas.

Paralelamente, se estudiarán alternativas de preservación de las emulsiones O/W con aceite de chía previamente mencionadas, del deterioro oxidativo mediante la adición de antioxidantes naturales (extractos de romero-manzanilla, aceites esenciales).

Seguidamente, se propone aplicar micro/nanoemulsiones mono o multicapa en un producto lácteo funcional (símil queso crema) como sistemas de provisión de compuestos funcionales y bioactivos de chía evaluando su calidad y atributos sensoriales.

Además, se proseguirá investigando la capacidad del mucílago (fibra dietaria soluble) como material con propiedades encapsulantes -simulando una estructura análoga a la de la semilla- que permita ocluir al aceite de chía.

En virtud de lo expuesto, las investigaciones planteadas contemplan el empleo de una materia prima de disponibilidad regional -que permite la diversificación de la producción agropecuaria principalmente de la región noroeste de nuestro país- para el desarrollo de alimentos con un mejor perfil nutricional, funcional y de mayor valor agregado implementando técnicas innovadoras, todo lo cual puede además ser transferido al sector socio-productivo.



Bibliografía

Ai H, Fang M, Jones SA, Lvov YM (2002). Electrostatic layer-by-layer nanoassembly on biological microtemplates: platelets. *Biomacromolecules* 3(3): 560-4.

Ai H, Jones SA, Lvov YM (2003). Biomedical applications of electrostatic layer-by-layer nano-assembly of polymers, enzymes, and nanoparticles. *Cell Biochem Biophys* 39(1): 23-43.

Allison SD, Randolph TW, Manning MC, Middleton K, Davis A, Carpenter JF (1998). Effects of drying methods and additives on structure and function of actine: Mechanisms of dehydration-induced damage and its inhibition. *Arch Biochem Biophys* 358: 171-181.

Allison SD, Chang B, Randolph TW, Carpenter JF (1999). Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding. *Arch Biochem Biophys* 365: 289-298.

Álvarez Cerimedo MS (2013). Estabilidad de emulsiones y encapsulación de aceites con propiedades nutraceuticas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires (FCEyN-UBA).

Álvarez Cerimedo MS, Huck-Iriart C, Candal RJ, Herrera ML (2010). Stability of emulsions formulated with high concentrations of sodium caseinate and trehalose. *Food Res Int* 43(5): 1482-1493.

American Heart Association (1999). Functional foods: position of ADA. *J Am Diet Assoc* 99: 1278-1285.

American Journal of Pharmacy (1885). Material medical of the new Mexican pharmacopoeia, part I. *Am J Pharm* 57: 5-7.

Anal AK, Singh H (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends Food Sci Tech* 18: 240-251.

AOCS (1995). Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. AOCS Press, Champaign, USA.

Aoki T, Decker EA, McClements DJ (2005). Influence of environmental stresses on stability of O/W emulsions containing droplets stabilized by multilayered membranes produced by a layer-by-layer electrostatic deposition technique. *Food Hydrocolloid* 19(2): 209–20.

Atarés L, Marshall LJ, Akhtar M, Murray BS (2012). Structure and oxidative stability of oil in water emulsions as affected by rutin and homogenization procedure. *Food Chem* 134(3): 1418–1424.

Augustin MA, Bhail S, Cheng LJ, Shen Z, Øiseth S, Sanguansri L (2015). Use of whole buttermilk for microencapsulation of omega-3 oils. *J Funct Foods* 19: 859-867.

Augustin MA, Hemar Y (2008). Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chem Soc Rev* 38: 902-912.

Autino H (2009a). Prólogo. En *Temas Selectos en Aceites y Grasas*. Eds. JM Block y D Barrera Arellano, Ed. Blücher, San Pablo, Brasil, pp. 9-10.

Autino H (2009b). Capítulo 2. Preparación de semillas oleaginosas. En *Temas Selectos en Aceites y Grasas*. Ed. JM Block y D Barrera Arellano, Ed. Blücher, San Pablo, Brasil, pp. 31-95.

Awika J, Rooney L, Wu X, Prior R, Cisneros-Zevallos L (2003). Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *J Agr Food Chem* 51: 6657–6662.

Ayerza R (1995). Oil Content and Fatty Acid Composition of Chia (*Salvia hispanica* L.) from Five Northwestern Locations in Argentina. *J Am Oil Chem Soc* 72: 1079-1081.

Ayerza R, Coates W (1996). Nuevos cultivos industriales: Proyecto Regional del Noroeste de Argentina. En Progreso en nuevos cultivos. Ed. J. Janick, ASHS Press, Alexandria, USA, pp. 45-51.

Ayerza R, Coates W (2001). Chia seeds: natural source of ω -3 fatty acids. Abstracts of The Annual Meeting of the Association for the Advancement of Industrial Crops. Atlanta, Georgia. USA, pp. 17.

Ayerza R, Coates W (2004). Protein and oil content, peroxide index and fatty acid composition of chia (*Salvia hispanica* L.) grown in six tropical and subtropical ecosystems of South America. *Trop Sci* 44:131-135.

Ayerza R, Coates W (2005). Chia. Rediscovering a Forgotten Crop of the Aztecs. 1st ed. The University of Arizona Press, Tucson, USA, pp. 197.

Baik MY, Suhendro EL, Nawar WW, McClements DJ, Decker EA, Chinachoti P (2004) Effects of antioxidants and humidity on the oxidative stability of microencapsulated fish oil, *J Am Oil Chem Soc* 81: 355–360.

Benichou A, Aserin A, Garti N (2002). Protein-polysaccharide interactions for stabilization of food emulsions. *J Disper Sci Technol* 23(1–3): 93–123.

Bhandari BR, Adhikari BP (2008). Water activity in food processing and preservation: Blackwell Publishing: Oxford, UK.

Bimbenet JJ, Bonazzi C, Dumoulin E (2002). Drying of foodstuffs. Drying 2002. In Proceeding of the 13th International Drying Symposium, pp. 64-80.

Bockisch M (1998). Extraction of vegetable oils. En Fats and Oils Handbook. AOCS Press, Champaign, USA.

Brown J (2003). Chia seed and meal data. International Flora Technologies, Inc., Gilbert, Arizona, USA.

Buck RP, Lindner E (1994). Recommendations for nomenclature of ionselective electrodes (IUPAC Recommendations 1994). *Pure Appl Chem* 66(12): 2527–2536.

Bushway AA, Belyea PR, Bushway RJ (1981). Chia seed as a source of oil, polysaccharide and protein. *J Food Sci* 46: 1349–1350.

Busilacchi H, Qüesta T, Zuliani S (2015). La chía como una nueva alternativa productiva para la región pampeana. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario. *Agromensajes* 41: 37–46.

Cabezas DM (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).

Cahill JP (2004). Genetic diversity among varieties of chia (*Salvia hispanica* L.). *Genet Resour Crop Ev* 51: 773.

Cahill JP (2005). Human selection and domestication of chia (*Salvia hispanica* L.). *J Ethnobiol* 25: 155-174.

Calvo P, Remunan Lopez C, Vila Jato JL, Alonso MJ (1997). Development of positively charged colloidal drug carriers: chitosan coated polyester nanocapsules and submicronemulsions. *Colloid Polym Sci* 275(1): 46–53.

Calvo P, Hernández T, Lozano M, González-Gómez D (2010). Microencapsulation of extra-virgin olive oil by spray-drying: Influence of wall material and olive quality. *Eur J Lipid Sci Tech.* 112(8): 852-858.

Campbell I, Norton I, Morley W (1996). Factors controlling the phase inversion of oil-in-water emulsions. *Neth Milk Dairy J* 50:167-182.

Capitani M, Spotorno V, Nolasco SM, Tomás MC (2012). Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. *LWT-Food Sci Technol* 45(1): 94-102.

Capitani MI, Ixtaina VY, Nolasco SM, Tomás MC (2013). Microstructure, chemical composition and mucilage exudation of chia (*Salvia hispanica* L.) nutlets from Argentina. *J Sci Food Agric* 93: 3856–3862.

Carneiro HC, Tonon RV, Grosso CR, Hubinger MD (2013). Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *J Food Eng* 115(4): 443-451.

Caruso F, Mohwald H (1999a). Preparation and characterization of ordered nanoparticle and polymer composite multilayers on colloids. *Langmuir* 15(23): 8276–81.

Caruso F, Mohwald H (1999b). Protein multilayer formation on colloids through a stepwise self-assembly technique. *J AmChem Soc* 121(25): 6039–46.

Caruso F, Susha AS, Giersig M, Mohwald H (1999a). Magnetic core-shell particles: preparation of magnetite multilayers on polymer latex microspheres. *Advater* 11(11): 950.

Caruso F, Caruso RA, Mohwald H (1999b). Production of hollow microspheres from nanostructured composite particles. *Chem Mater* 11(11): 3309–14.

Caruso F, Trau D, Mohwald H, Renneberg R (2000). Enzyme encapsulation in layer-by-layer engineered polymer multilayer capsules. *Langmuir* 16(4): 1485–8.

Carvalho AGS, Silva VM, Hubinger MD (2014). Microencapsulation by spray drying of emulsified green coffee oil with two-layered membranes. *Food Res Int* 61: 236-245.

Cerdeira M, Palazolo GG, Candal RJ, Herrera ML (2007). Factors affecting initial retention of a microencapsulated sunflower seed oil/milk fat fraction blend. *J Am Oil Chem Soc* 84(6): 523-531.

Chandrapala, J, Wijayasinghe, R, Vasiljevic T (2016). Lactose crystallization as affected by presence of lactic acid and calcium in model lactose systems. *J Food Eng* 178: 181-189.

Chapkin RS (1992). Reappraisal of the essential fatty acids. En *Fatty Acids in Foods and their Health Implications*. Ed. CK Chow, Dekker, New York, USA, pp. 429-436.

Chung C, Sanguansri L, Augustin MA (2010). Resistant starch modification: Effects on starch properties and functionality as co-encapsulant in sodium caseinate-based fish oil microcapsules. *J Food Sci* 75(9).

Ciftci ON, Przybylski R, Rudzinska M (2012). Lipid components of flax, perilla and chia seeds. *Eur J Lipid Sci Tech* 114: 794–800.

Codex Alimentarius (1999). Codex standard for edible fats and oils not covered by individual standards, Codex Stan, pp. 19-1981.

Codex Alimentarius Commission (2012). Codex Stan 19. Edible fats and oils not covered by individual standards. http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do. (acceso 15/10/2016)

Codex Mendoza (1542). Ed Francisco del Paso y Troncoso (1925). Museo Nacional de Arqueología, Historia y Etnografía, México DF, México.

Código Alimentario Argentino (2008). Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos y Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. www.anmat.gov.ar/codigoa/Capitulo_XI.pdf (acceso 20/07/2010).

Comisión de las Comunidades Europeas (2009). Diario Oficial de la Unión Europea L 294/14.

Comisión de las Comunidades Europeas (2013). Diario Oficial de la Unión Europea L 21/34.

Cortéz y Larraz P (1958). Descripción geográfico-moral de la diócesis de Goathemala. Vol. 20. Guatemala City: Sociedad de Geografía e Historia de Guatemala.

Coupland JN, McClements DJ (1996). Lipid oxidation in food emulsions. *Trends Food Sci Technol* 7(3): 83-91.

Creamer LK, Berry GD (1975). A study of the properties of dissociated bovine casein micelles. *J Dairy Res* 42: 169-183.

Dagleish DG, Tosh SM, West S (1996). Beyond homogenization: The formation of very small emulsion droplets during the processing of milk by a Microfluidizer. *Neth Milk Dairy J* 50: 135-148.

Damodaran S (1997). Amino acids, peptides, and proteins. En: Food Chemistry. Ed. Fennema, O.R., Marcel Dekker Inc., New York, USA, pp. 321-430.

Darr JA, Poliakoff M (1999). New Directions in Inorganic and Metal-Organic Coordination Chemistry in Supercritical Fluids. *Chem Rev* 99: 495.

Davidovich LA, Sulé CL, Lupín HM (1980). Kinetics of fish meal oxidation. *J Am Oil Chem Soc* 57: 43-47.

Davis HT (1994). Factors determining emulsion type: hydrophile-lipophile balance and beyond. *Colloid Surface A* 91:9-24.

Day L, Xu M, Hoobin P, Bugar I, Augustin M (2007). Characterisation of fish oil emulsions stabilised by sodium caseinate. *Food Chem* 105: 469–479.

de Vos P, Faas MM, Spasojevic M, Sikkema J (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *Int Dairy J* 20(4): 292-302.

Decher G, Hong JD (1991). Buildup of ultrathin multilayer films by a selfassembly process. 2. Consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles and polyelectrolytes on charged surfaces. *Ber Bunsenges Phys Chem Chem Phys* 95(11): 1430–4.

Decher G, Hong JD, Schmitt J (1992). Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process. 3. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films* 210(1–2): 831–5.

Demarco A (2009). Capítulo III: Extracción por solvente. En *Temas Selectos en Aceites y Grasas*. Ed. JM Block y D Barrera Arellano, Ed. Blücher, San Pablo, Brasil, pp. 67-95.

Desai KGH, Park HJ (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Dry Technol* 23(7): 1361-1394.

Dian NLHM, Sudin N, Yusoff MSA (1996). Characteristics of microencapsulated palm-based oil as affected by type of wall material. *J Sci Food Agr* 70(4): 422-426.

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, Golding M, Povey MJW (1997). Creaming and flocculation of oil-in-water emulsions containing sodium caseinate. *J Colloid Interf Sci* 185(2): 515–529.

Dickinson E, James JD (2000). Influence of high-pressure treatment on betalactoglobulin–pectin associations in emulsions and gels. *Food Hydrocolloid* 14(4): 365–76.

Dickinson E, McClements DJ (1995). *Advances in Food Colloids*. Ed. Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK.

Dickinson E, Radford SJ, Golding M (2003). Stability and rheology of emulsions containing sodium caseinate: combined effects of ionic calcium and non-ionic surfactant. *Food Hydrocolloid* 17: 211-220.

Diehl BWK (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 BWK (2001). High resolution NMR spectroscopy. *Eur J Lipid Sci Technol* 103: 830-834.

Dimakou CP, Kiokias SN, Tsaprouni IV, Oreopoulou V (2007). Effect of processing and storage parameters on the oxidative deterioration of oil-in-water emulsions. *Food Biophys* 2: 38-45.

Djordjevic D, Cercaci L, Alamed J, McClements D, Decker E (2007). Chemical and physical stability of citral and limonene in sodium dodecyl sulfate chitosan and gum arabic-stabilized oil-in-water emulsions. *J Agr Food Chem* 55: 3585–3591.

Donath E, Sukhorukov GB, Caruso F, Davis SA, Mohwald H (1998). Novel hollow polymer shells by colloid-templated assembly of polyelectrolytes. *Angew Chem Int Ed* 37(16): 2202–5.

Drusch S (2006). Sugar beet pectin: A novel emulsifying wall component formicroencapsulation of lipophilic food ingredients by spray-drying. *Food hydrocolloid* 21(7): 1223-1228.

Drusch S (2007). Sugar beet pectin: a novel emulsifying wall component for microencapsulation of lipophilic food ingredients by spray-drying. *Food Hydrocolloid* 21(7): 1223–8.

Drusch S, Berg S (2008). Extractable oil in microcapsules prepared by spray-drying: localisation, determination and impact on oxidative stability. *Food Chem* 109(1): 17-24.

Drusch S, Schwarz K (2006). Microencapsulation properties of two different types of α -D-glucopyranosylsuccinate-derivatised starch. *Eur Food Res Technol* 222(1–2): 155–64.

Drusch S, Serfert Y, Scampicchio M, Schmidt-Hansberg B, Schwarz K (2007). Impact of physicochemical characteristics on the oxidative stability of fish oil microencapsulated by spray-drying. *J Agr Food Chem* 55(26): 11044-11051.

Dubernet C, Benoit JP (1986). La microencapsulation: Ses techniques et ses applications en biologie. *Actual Chim* (10): 19–28.

Dziezak JD (1988). Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technol* 42(4): 136–151.

EFSA (2005). Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to the safety of chia (*Salvia hispanica* L.) seed and ground whole chia seed as a novel food ingredient intended for use in bread. *EFSA Journal*, 1-12.

EFSA (2009). Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies on a request from the European Commission on the safety of 'Chia seed (*Salvia hispanica* L.) and ground whole Chia seed' as a food ingredient. *EFSA Journal*, 1-2.

Elversson J, Millqvist-Fureby A, Alderborn G, Elofsson U (2003). Droplet and particle size relationship and shell thickness of inhalable lactose particles during spray drying, *J Pharm Sci* 92(4): 900–910.

Escalona-García L, Pedroza-Islas R, Natividad R, Rodríguez-Huezo ME, Carrillo-Navas H, Pérez-Alonso C (2016). Oxidation kinetics and thermodynamic analysis of chia oil microencapsulated in a whey protein 20 concentrate-polysaccharide matrix. *J Food Eng* 175: 93-110.

Espinosa B (2001). Procesamiento supercrítico de productos naturales. Modelado, Análisis y Optimización. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur (UNS).

Faldt P, Bergenstahl B, Claesson PM (1993). Stabilization by chitosan of soybean oil emulsions coated with phospholipid and glycocholic acid. *Colloids Surf A* 71(2): 187–95.

FAO/WHO Food Agricultural Organization/World Health Organization of the United Nations (1993). Joint FAO/WHO Food Standards Programme: Codex Alimentarius Commission: Fats, oils and related products, Codex standard for named vegetable oils, Codex-STAN 210, vol 8, 2nd Ed., Rome, Italy.

Faraji H, McClements DJ, Decker EA, (2004). Role of continuous phase protein on the oxidative stability of fish oil-in-water emulsions. *J Agric Food Chem* 52 (14): 4558–4564.

Florence AT, Rieg F (1983). L' instabilité des émulsions, en Agents de surface et émulsions: les systèmes dispersés. Ed. Puisieux, F. y Seillier, M., Lavoisier, Paris, Francia, pp. 321-342.

Fogler BB, Kleinschmidt RV (1938). Spray drying. *Ind Eng Chem* 30(12): 1372–1384.

Food and Drug Administration (FDA) (2009). Listing of Food Additive. www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/FoodAdditives/ucm191033.htm. (acceso 20/12/2016).

Ford L, Borwankar R, Martin RW, Holcomb DN (1997). Dressing and sauces. En: Food Emulsions, 3th edition, revised and expanded. Ed. Friberg, SE, Larsson K, Marcel Dekker Inc., New York, USA, pp. 361-412.

Fox PF, McSweeney, PL (1998). H: Dairy Chemistry and Biochemistry. Blackie Academic & Professional, London, UK.

Frankel E (2005). Lipid Oxidation, 2nd Ed. The Oily Press, Bridgewater, UK.

Frankel E (1993). Formation of Headspace Volatiles by Thermal-Decomposition of Oxidized Fish Oils Vs Oxidized Vegetable-Oils. *J Am Oil Chem Soc* 70: 767-772.

Garti N, Reichman D, Hendrickx HACM, Dickinson E, Jackson LK, Bergenstahl B (1993). Hydrocolloids as food emulsifiers and stabilizers. *Food Struct* 12(4): 411-26.

Gaybor Tobar M, Casas Velasquez N (2008). Estudio de factibilidad para la implementación de una planta industrial de elaboración de premezclas para pan en la Industria Harinera S.A., Tesis de grado, Universidad San Francisco de Quito (USFQ).

Genovese DB, Lozano JE, Rao MA (2007). The rheology of colloidal and noncolloidal food dispersions. *J Food Sci* 72(2): R11-20.

Georgieva R, Moya S, Hin M, Mitlohner R, Donath E, Kiesewetter H (2002). Permeation of macromolecules into polyelectrolyte microcapsules. *Biomacromolecules* 3(3): 517-24.

Gharsallaoui A, Roudaut G, Beney L, Chambin O, Voilley A, Saurel R (2012). Properties of spray-dried food flavours microencapsulated with two-layered membranes: roles of interfacial interactions and water. *Food Chem* 132(4): 1713–1720.

Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O, Voilley A, Saurel R (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Res Int* 40(9): 1107–1121.

Gilles KK, Vinod KT, Christopher LM, Tarab A, Mark SB, Netkal MG, Ronald JT (2012). Nano-microencapsulation and controlled release of linoleic acid in biopolymer matrices: Effects of the Physical State, Water Activity, and Quercetin on Oxidative Stability. *JEAS*, 2012.

Gu YS, Decker EA, McClements DJ (2004). Influence of iota-carrageenan on droplet flocculation of beta-lactoglobulin-stabilized oil-in-water emulsions during thermal processing. *Langmuir* 20(22): 9565–70.

Gu YS, Regnier L, McClements DJ (2005). Influence of environmental stresses on stability of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by beta-lactoglobulin–iota-carrageenan membranes. *J Colloid Interface Sci* 286(2): 551–8.

Gunstone FD (2006). Minor Specialty Oils. Nutraceuical and Specialty Lipids and their Co-Products vol. 5. En Nutraceuical Science and Technology Series, Ed. F. Shahidi, Taylor and Francis Ed., Boca Ratón, USA, pp. 91-125.

Guzey D, Kim HJ, McClements DJ (2004). Factors influencing the production of O/W emulsions stabilized by beta-lactoglobulin–pectin membranes. *Food Hydrocolloid* 18(6): 967–75.

Guzey D, McClements DJ (2006). Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. *Adv Colloid Interfac* 128–130: 227–248.

Hall SM, Cooke AW, Pacek AJ, Rothman D (2011). Scaling up of silverson rotor-stator mixers. *Can J Chem Eng* 89(5): 1040–1050.

Hardas N, Danviriyakul S, Foley JL, Nawar WW, Chinachoti P (2002). Effect of relative humidity on the oxidative and physical stability of encapsulated milk fat. *J Am Oil Chem. Soc* 79(2): 151–158.

Harnsilawat T, Pongsawatmanit R, McClements DJ (2006). Influence of pH and ionic strength on formation and stability of emulsions containing oil droplets coated by α -lactoglobulin–alginate interfaces. *Biomacromolecules* 7(6): 2052–2058.

Heinzelmann K, Franke K, Velasco J, Márquez-Ruiz G (2000). Microencapsulation of fish oil by freeze-drying techniques and influence of process parameter on oxidative stability during storage. *Eur Food Res Technol* 211(4): 234–239.

Hicks S (1966). Desert plants and people. Naylor Company, San Antonio, USA.

Hogan SA, O'Riordan ED, O'Sullivan M (2003). Microencapsulation and oxidative stability of spray-dried fish oil emulsions. *J Microencapsul* 20(5): 675–688.

Hogan SA, McNamee BF, O'Riordan ED, O'Sullivan M (2001). Microencapsulating properties of sodium caseinate. *J Agric Food Chem* 49(4): 1934–1938.

Holsinger VH (1988). Lactose. In: *Fundamentals of Dairy Chemistry* 3rd ed. Ed. Wong NP, Jenness R, Keeney M, Marth EH, Aspen Publishers Inc., Gaithersburg Maryland, USA, pp. 279–342.

Horn AF (2012). Factors Influencing the Effect of Milkbased Emulsifiers on Lipid Oxidation in Omega-3 Emulsions. Ph.D. Thesis. Technical University of Denmark (DTU).

Horn AF, Nielsen NS, Jensen LS, Horsewell A, Jacobsen C (2012). The choice of homogenisation equipment affects lipid oxidation in emulsions. *Food Chem* 134(2): 803–810.

Hou Z, Gao Y, Yuan F, Liu Y, Li C, Xu D (2010). Investigation into the physicochemical stability and rheological properties of beta-carotene emulsion stabilized by soybean soluble polysaccharides and chitosan. *J Agr Food Chem* 58(15): 8604–8611.

Howell RW, Collins FI (1957). Factors affecting linolenic and linoleic acid content of soybean. *Agron J* 49: 593-597.

Hu Z, Zhong Q (2010). Determination of thiobarbituric acid reactive substances in microencapsulated products. *Food Chem* 123(3): 794-799.

Hu M, McClements DJ, Decker EA (2003). Lipid oxidation in corn oil-in-water emulsions stabilized by casein, whey protein isolate, and soy protein isolate. *J Agric Food Chem* 51(6): 1696–1700.

Huang D, Ou B, Prior R (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agr Food Chem* 53: 1841–1856.

Huck-Iriart C, Álvarez-Cerimedo MS, Candal RJ, Herrera ML (2011). Structures and stability of lipid emulsions formulated with sodium caseinate. *Curr Opin Colloid In* 16(5): 412–420.

Huck-Iriart C, Rincón-Cardona JA, Herrera ML (2014). Stability of whey protein concentrate/sunflower oil emulsions as affected by sucrose and xanthan gum. *Food Bioprocess Technol* 7(9): 2646-2656.

Hunter RJ (1986). *Foundations of Colloid Science*. Oxford: Oxford University Press, UK.

Instituto Nacional de Alimentos (2003). Análisis fisicoquímico de semillas de chía. Buenos Aires, Argentina, pp. 1.

Iqbal S, Bhanger M, Anwar F (2005). Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan. *Food Chem* 93: 265–272.

Israelachvili JN (1992). Intermolecular and Surface Forces, Academic Press, London, UK.

IUPAC (1992). Standard Methods for the Analysis of oils, Fats and Derivates 7th ed. B. S. P. I. Paquot C, Hautffenne A. International Union of Pure and Applied Chemistry, ed., Oxford, UK.

Ixtaina VY, Martínez ML, Spotorno V, Mateo CM, Maestri DM, Diehl BWK, Tomás MC (2011). Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. *J Food Comp Anal* 24(2): 166-174.

Ixtaina VY (2010). Caracterización de la semilla y el aceite de chía (*Salvia hispanica* 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 VY, Julio LM, Wagner JR, Nolasco SM, Tomás MC (2015). Physicochemical characterization and stability of chia oil microencapsulated with sodium caseinate and lactose by spray-drying. *Powder Technol* 271: 26-34.

Ixtaina VY, Nolasco SM, Tomás MC (2008). Physical properties of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Ind Crop Prod* 28: 286-293.

Ixtaina VY, Nolasco SM, Tomás MC (2012). Oxidative stability of chia (*Salvia hispanica* L.) seed oil: effect of antioxidants and storage conditions. *J Am Oil Chem Soc* 89: 1077–1090.

Jacobsen C, Hartvigsen K, Lund P, Thomsen MK, Skibsted LH, Adler-Nissen J, Hølmer G, Meyer AS (2000). Oxidation in fish oil-enriched mayonnaise 3. Assessment of the influence of the emulsion structure on oxidation by discriminant partial least squares regression analysis. *Eur Food Res Technol* 211(2): 86–98.

Jacobsen C, Nielsen NS, Horn AF, Sørensen ADM (2013). Food enrichment with omega-3 fatty acids. Elsevier. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK.

Jafari SM, Assadpoor E, Bhandari B, He Y (2008a). Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying. *Food Res Int* 41(2): 172–183.

Jafari SM, Assadpoor E, He YH, Bhandari B (2008b). Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. *Food Hydrocolloid* 22(7): 1191–1202.

Jafari SM, He Y, Bhandari B (2007). Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques. *J Food Eng* 82(4): 478–488.

Jamboonsri W, Phillips TD, Geneve RL, Cahill JP, Hildebrand DF (2012). Extending the range of an ancient crop, *Salvia hispanica* L. - new ω 3 source. *Genet Resour Crop Evol* 59: 171/8.

Jansen P, Lemmens R, Oyen L, Siemonsma J, Stavast F, van Valkenburg J (1991). Plant resources of South-East Asia basic list of species and commodity grouping Pudoc, Wageningen, The Netherlands.

Julio LM, Ixtaina VY, Fernández MA, Sánchez Torres RM, Wagner JR, Nolasco SM, Tomás MC (2015). Chia seed oil-in-water emulsions as potential delivery systems of ω -3 fatty acids. *J Food Eng* 162: 48-55.

Julio LM, Ixtaina VY, Segura-Campos MR, Nolasco SM, Betancur-Ancona D, Tomás MC (2014). Evaluación de las propiedades emulsificantes de fracciones proteicas de chía (*Salvia hispanica* L.). XXII Jornadas de Jóvenes Investigadores AUGM, Valparaíso, Chile.

Kamal-Eldin A (2006). Effect of fatty acids and tocopherols on the oxidative stability of vegetable oils. *Eur J Lipid Sci Tech* 108: 1051-1061.

Kargar M, Spyropoulos F, Norton IT (2011). The effect of interfacial microstructure on the lipid oxidation stability of oil-in-water emulsions. *J Colloid Interface Sci* 357(2): 527–533.

Kinsella JE (1984). Milk proteins: physicochemical and functional properties. *Crit Rev Food Sci* 21: 197-262.

Kiokias S, Dimakou C, Oreopoulou V (2007). Effect of heat treatment and droplet size on the oxidative stability of whey protein emulsions. *Food Chem* 105: 94-100.

Klaypradit W, Huang YW (2008). Fish oil encapsulation with chitosan using ultrasonic atomizer. *LWT-Food Sci Technol* 41(6): 1133-1139.

Klinkesorn U, Sophanodora P, Chinachoti P, Decker EA, McClements DJ (2006). Characterization of spray-dried tuna oil emulsified in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition, *Food Res Int* 39 (4): 449–457.

Klinkesorn U, Sophanodora P, Chinachoti P, McClements DJ (2004) Stability and rheology of corn oil-in-water emulsions containing maltodextrin. *Food Res Int* 37: 851–859.

Klinkesorn U, Sophanodora P, Chinachoti P, McClements DJ, Decker EA (2005). Stability of spray-dried tuna oil emulsions encapsulated with two-layered interfacial membranes, *J Agric Food Chem* 53(21): 8365–8371.

Klinkesorn U, Sophanodora P, Chinachoti P, Decker EA, McClements DJ (2005a). Encapsulation of emulsified tuna oil in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition. *Food Hydrocolloid* 19(6): 1044–53.

Klinkesorn U, Sophanodora P, Chinachoti P, McClements DJ, Decker EA (2005b). Increasing the oxidative stability of liquid and dried tuna oil-in-water emulsions with electrostatic layer-by-layer deposition technology. *J Agric Food Chem* 53(11): 4561–6.

Klinkesorn U, Sophanodora P, Chinachoti P, McClements DJ, Decker EA (2005c). Stability of spray-dried tuna oil emulsions encapsulated with two-layered interfacial membranes. *J Agric Food Chem* 53(21): 8365–71.

Kralovec JA, Zhang S, Zhang W, Barrow CJ (2012). A review of the progress in enzymatic concentration and microencapsulation of omega-3 rich oil from fish and microbial sources. *Food Chem* 131(2): 639-644.

Labuza TP, Nayli L, Gallagher D, Hawekes J, Hurtado F (1972). Stability of intermediate moisture foods. 1. Lipid Oxidation. *J Food Sci* 37: 154-159.

Laine P, Kylli P, Heinonen M, Joupilla K (2008). Storage stability of microencapsulated cloudberry (*Rubus chamaemorus*) phenolics. *J Agric Food Chem* 56: 11251–11261.

Leong, T, Ashokkumar M, Kentish S (2011). The fundamentals of power ultrasound—A review. *Acoust Aust* 39(2): 54–63.

Let MB, Jacobsen C, Sørensen ADM, Meyer AS (2007). Homogenization conditions affect the oxidative stability of fish oil enriched milk emulsions: Lipid oxidation. *J Agr Food Chem* 55: 1773-1780.

Lethuaut L, Métro F, Genot C (2002). Effect of droplet size on lipid oxidation rates of oil-in-water emulsions stabilized by protein. *J Am Oil Chem Soc* 79(5): 425–430.

Liang Y, Gillies G, Patel H, Matia-Merino L, Ye A, Golding M (2014). Physical stability, microstructure and rheology of sodium-caseinate-stabilized emulsions as influenced by protein concentration and non-adsorbing polysaccharides. *Food Hydrocolloid* 36: 245–255.

Lifran EV, Hourigan, JA, Sleight RW, Johnson RL (2000). New wheys for lactose. *Food Aust* 53 (4): 120–126.

Lin KY, Daniel JD, Whistler RL (1994). Structure of chia seed polysaccharide exudate. *Carbohydr Polym* 23: 13-18.

Liu XD, Atarashi T, Furuta T, Yoshii H, Aishima S, Ohkawara M (2001). Microencapsulation of emulsified hydrophobic flavours by spray drying. *Dry Technol* 19(7): 1361–1374.

Liu Z, Zhou J, Zeng Y, Ouyang X (2004). The enhancement and encapsulation of *Agaricus bisporus* flavor. *J Food Eng* 65(3): 391–396.

Lucassen-Reynders EH (1993). Interfacial viscoelasticity in emulsions and foams. *Food Struct* 12: 1-12.

Magdassi S, Bach U, Mumcuoglu KY (1997). Formation of positively charged microcapsules based on chitosan–lecithin interactions. *J Microencapsul* 14(2): 189–95.

Mann JI, Cummings JH (2009). Possible implications for health of the different definitions of dietary fibre. *Nutr Metab Cardiovas* 19: 226–229.

Mao LK, Yang J, Xu DX, Yuan F, Gao YX (2010). Effects of homogenization models and emulsifiers on the physicochemical properties of carotene nanoemulsions. *J Disper Sci Technol* 31: 986-993.

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, Campinhas, Sao Paulo, Brasil.

Márquez-Ruiz G, Velasco J, Dobarganes C (2003). Oxidation in dried encapsulated oils. In: Kamal-Eldin, A. (Ed.), *Lipid Oxidation Pathways*. AOCS Press, Champaign, Illinois, pp. 245–264.

Martínez M (1959). *Plantas Útiles de la Flora Mexicana*. Ed. de Botas, DF, México, pp. 198-202.

Matsuno R, Adachi S (1993). Lipid encapsulation technology – techniques and applications to food. *Trends Food Sci Technol* 4(8): 256–261.

McClements DJ (1999). *Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques*. Ed. CRC Press, New York, USA.

McClements DJ (2004). Protein-stabilized emulsions. *Curr Opin Colloid In* 9(5): 305–313.

McClements DJ (2005). *Food emulsions: principles, practices, and techniques*, CRC Press, New York, USA.

McClements DJ (2005a). Context and background. In: Food emulsions, principles, practices and techniques, second edition. Ed. CRC Press, New York, USA, pp. 1-26.

McClements DJ (2005b). Emulsion Stability. In: Food emulsions, principles, practices and techniques, second edition. Ed. CRC Press, New York, USA, pp. 269-339.

McClements DJ (2007). Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability. *Crit Rev Food Sci* 47(7): 611-649.

McClements DJ (2010). Emulsion design to improve the delivery of functional lipophilic components. *Annu Rev Food Sci Technol* 1: 241-269.

McClements DJ (2016). Food emulsions: principles, practices, and techniques, 3th Edition, Ed. CRC Press, New York, USA.

McClements DJ, Decker EA (2000). Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *J Food Sci* 65(8): 1270-82.

McClements DJ, Weiss J (2005). Lipid Emulsions. Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Sixth Edition, Vol 6. Set. Ed. Fereidoon Shahidi, John Wiley and Sons, Inc., NJ, USA, pp. 457-502.

Mead JF, Alfin-Slater RB, Howton DR, Popjat G (1986). Lipids: chemistry, biochemistry and nutrition. Plenum Press, New York, USA, pp. 486.

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(2): 445-456.

Mootoosingh KS, Rousseau D (2006). Emulsions for the delivery of nutraceutical lipids. In *Nutraceutical and Specialty Lipids and Their Co-products*. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, pp. 281–300.

Moreau L, Kim HJ, Decker EA, McClements DJ (2003). Production and characterization of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by beta-lactoglobulin–pectin membranes. *J Agric Food Chem* 51(22): 6612–7.

Moreau RA, Kamal-Eldin A (2009). *Gourmet and Health-Promoting Specialty Oils*. Ed. Moreau RA, Kamal-Eldin A, AOCS Press, Champaign, USA, pp. 587.

Muñoz LA, Cobos A, Diaz O, Aguilera JM (2012). Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration. *J Food Eng* 108: 216-224.

Muñoz, LA, Cobos A, Diaz O, Aguilera JM (2013). Chia seed (*Salvia hispanica*): an ancient grain and a new functional food. *Food Rev Int* 29(4): 394-408.

Nakaya K, Ushio H, Matsukawa S, Shimizu M, Ohshima T (2005). Effects of droplet size on the oxidative stability of oil-in-water emulsions. *Lipid* 40 (5): 501–507.

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 WW (1996). Lipids. En *Food Chemistry*, Cap. 15. Ed. Fennema O., Marcel Dekker Inc., New York, USA.

Nazir A, Schroen K, Boom R (2010). Premix emulsification: A review. *J Membrane Sci* 362(1–2): 1–11.

Nedovic V, Kalusevic A, Manojlovic V, Levic S, Bugarski B (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Sci* 1: 1806–1815.

Nielsen NS, Horn AF, Jacobsen C (2013). Effect of emulsifier type, pH and iron on oxidative stability of 5% fish oil-in-water emulsions. *Eur J Lipid Sci Technol* 115(8): 874-889.

Nisisako T (2008). Microstructured devices for preparing controlled multiple emulsions. *Chem Eng Technol* 31(8): 1091–1098.

Noello C, Carvalho AGS, Silva VM, Hubinger MD (2016). Spray dried microparticles of chia oil using emulsion stabilized by whey protein concentrate and pectin by electrostatic deposition. *Food Res Int* 89: 549-557.

O'Dwyer SP, O'Beirne D, Eidhin DN, O'Kennedy BT (2013). Effects of sodium caseinate concentration and storage conditions on the oxidative stability of oil-in-water emulsions. *Food Chem* 138 (2–3): 1145–1152.

Ogawa S, Decker EA, McClements DJ (2003). Production and characterization of O/W emulsions containing cationic droplets stabilized by lecithin–chitosan membranes. *J Agric Food Chem* 51(9): 2806–12.

Ogawa S, Decker EA, McClements DJ (2004). Production and characterization of O/W emulsions containing droplets stabilized by lecithin–chitosan–pectin multilayered membranes. *J Agric Food Chem* 52(11): 3595–600.

Olivos-Lugo B, Valdivia-López M, Tecante A (2010). Thermal and physicochemical properties and nutritional value of the protein fraction of Mexican chia seed (*Salvia hispanica* L.). *Food Sci Technol Int* 16(1): 89-96.

Oomah BD, Kenasehuk EO (1995). Cultivars and agronomic aspects. En *Flaxseed in Human Nutrition*. Eds. SC Cunnane and LU Thompson. AOCS Press, Champaign, USA, pp. 43-45.

Palazolo GG (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).

Parker TD, Adams DA, Zhou K, Harris M, Yu L (2003). Fatty acid composition and oxidative stability of cold-pressed edible seed oils. *J Food Sci* 68: 1240-1243.

Perry L, Metzger J (1980). Medicinal plants of East and Southeast Asia: attributed properties and uses. The MIT Press, Cambridge, UK.

Polavarapu S, Oliver CM, Ajlouni S, Augustin MA (2011). Physicochemical characterisation and oxidative stability of fish oil and fish oil–extra virgin olive oil microencapsulated by sugar beet pectin. *Food Chem* 127(4): 1694-1705.

Poptoshev E, Schoeler B, Caruso F (2004). Influence of solvent quality on the growth of polyelectrolyte multilayers. *Langmuir* 20(3): 829–34.

Porzio MA (2007). Flavour delivery and product development. *Food Technol* 1: 22–29.

Prosise WE (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.

Qian C, McClements DJ (2011). Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: factors affecting particle size. *Food Hydrocolloid* 25 (5): 1000–1008.

Raghavan SL, Ristic RI, Sheen DB, Sherwood JN, Trowbridge L, York P (2000). Morphology of crystals of α -lactose hydrate grown from aqueous solution. *J Phys Chem B* 104: 12256–12262.

Ramamoorthy TP (1985). *Salvia* L. En Flora Fanerógama del Valle de México. Vol. II (Dicotiledóneas). Eds. J Rzedowski, GC De Rzedowski, Instituto Politécnico Nacional de México, DF, México, pp. 298-310.

Re M (1998). Microencapsulation by spray drying. *Dry Technol* 16(6): 1195–1998.

Reineccius GA (2004). Multiple-core encapsulation: the spray drying of food ingredients. Vilstrup PE (Ed.), *Microencapsulation of Food Ingredients*, Leatherhead International Limited, Cambridge, UK, pp. 151–185.

Relkin P, Sourdet S (2005). Factors affecting fat droplet aggregation in whipped frozen protein-stabilized emulsions. *Food Hydrocolloid* 19:503–511.

Reyes-Caudillo E, Tecante A, Valdivia-López M (2008). Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chem* 107: 656–663.

Ribotta P, De Alcantara Pessoa Filho P, Tadini C (2009). Alternativas tecnológicas para la elaboración y la conservación de productos panificados. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, pp. 13-59.

Rinaudo M (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Pro Polym Sci* 31(7): 603-632.

Rodea-González DA, Cruz-Olivares J, Román-Guerrero A, Rodríguez-Huezo ME, Vernon-Carter EJ, Pérez-Alonso C (2012) Spray-dried encapsulation of chia essential oil (*Salvia hispanica* L.) in whey protein concentrate–polysaccharide matrices. *J Food Eng* 111(1): 102–109.

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.

Roos Y (1993). Melting and glass transitions of low molecular weight carbohydrates. *Carbohyd Res* 238: 39-48.

Rosenberg M, Kopelman IJ, Talmon Y (1990). Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. *J Agr Food Chem* 38(5): 1288–1294.

Rosenberg M, Sheu TY (1996). Microencapsulation of volatiles by spray-drying in whey protein-based wall systems. *Int Dairy J* 6(3): 273–284.

Rulfo JM (1937). La chia. *Agricultura* (México), 1: 129-137.

Sahagún B (1579). Historia general de las cosas de Nueva España (Codex Florentino). Eds. AM Garibay, 1989. Editorial Porrúa, DF, México.

Sandoval-Oliveros MR, Paredes-López O (2012). Isolation and characterization of proteins from chia seeds (*Salvia hispanica* L.). *J Agr Food Chem* 61: 193–201.

Sanguansri L, Augustin MA (2007). Microencapsulation and delivery of omega-3 Fatty Acids. *Food Sci Aus* 297-320.

Saura-Calixto F, Goñi I (2006). Antioxidant capacity of the spanish mediterranean diet. *Food Chem* 94: 442–447.

Scalise J (2014). Caracterización y diagnóstico de la cadena de valor de la chía en la argentina. Unidad para el Cambio rural (UCAR) - Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación Argentina. Buenos Aires. *Informe*

Schmitt C, Sánchez C, Desobry-Banon S, Hardy J (1998). Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 38(8): 689–753.

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.

Schönhoff M (2003). Layered polyelectrolyte complexes: physics of formation and molecular properties. *J Phys Condens Matter* 15: 781–808.

Schrooyen PM, Van der Meer R, De Kruif CG (2001). Microencapsulation: its application in nutrition. *P Nutr Soc* 60(04): 475-479.

Schuler C, Caruso F (2001). Decomposable hollow biopolymer-based capsules. *Biomacromolecules* 2(3): 921–6.

Schubert H (1997). Advances in the mechanical production of food emulsions. In *Engineering and Food*, R. Jowitt, ed., Sheffield Academic Press, Sheffield, UK, pp. 82–102.

Schubert H, Ax K, Behrend O (2003). Product engineering of dispersed systems. *Trends food Sci Tech* 14(1–2): 9–16.

Schultz, SG, Wagner K, Ulrich J (2004). High-pressure homogenization as a process for emulsion formation. *Chem Eng Technol* 27(4): 361–368.

Segura-Campos MR, Ciau-Solís N, Rosado-Rubio G, Chel-Guerrero L, Betancur-Ancona D (2014). Chemical and functional properties of chia seed (*Salvia hispanica* L.) gum. *Int J Food Sci* 2014: 1-5.

Shahidi F (1997). Natural antioxidants: an overview. En *Natural Antioxidants*, Chap. 1. Ed. Shahidi F., AOCS Press, Champaign, Illinois, USA.

Shahidi F, Han XQ (1993). Encapsulation of food ingredients. *Crit Rev Food Sci* 33(6): 501–547.

Shantha NC, Decker EA (1994). Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *J AOAC Int* 77(2): 421–424.

Shaw L, McClements DJ, Decker E (2007). Spray-dried multilayered emulsions as a delivery method for ω -3 fatty acids into food systems. *J Agr Food Chem* 55: 3112–3119.

Simopoulos AP (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother* 56(8): 365-379.

Simopoulos AP (2004). Omega-6/omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases. *Food Rev Int* 20: 77-90.

Singh RP, Heldman DR (2013). Introduction to food engineering. Academic Press, London, UK.

Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de plagas (2014). *Salvia hispanica*. (<http://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/salvia-hispanica>) (acceso 20/10/2016)

Song JH, 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.

Soottitantawat A, Bigeard F, Yoshii H, Furuta T, Ohkawara M, Linko P (2005). Influence of emulsion and powder size on the stability of encapsulated D-limonene by spray drying, *Innov Food Sci Emerg Technol* 6(1): 107–114.

Soottitantawat A, Yoshii H, Furuta T, Ohkawara M, Linko P (2003). Microencapsulation by spray drying: influence of emulsion size on the retention of volatile compounds. *J Food Sci* 68(7): 2256–2262.

Sousdaleff M, Baesso ML, Medina Neto A, Nogueira AC, Marcolino VA, Matioli G (2013). Microencapsulation by freeze-drying of potassium norbixinate and

curcumin with maltodextrin: stability, solubility, and food application. *J Agric Food Chem* 61: 955–965.

Srinivasan M (1998). Formation and stability of oil-in-water caseinate emulsions. Institute of food, nutrition and human health. Doctoral Thesis. Massey University. Palmerston North. New Zeland.

Stang M, Karbstein H, Schubert H (2001). Emulsification in high pressure homogenizers. *Eng Life Sci* 1: 151–162.

Stauffer CE (1999). Emulsifiers, Eagen Press Handbook, St. Paul, Minnesota, USA.

Steitz R, Leiner V, Siebrecht R, von Klitzing R (2000). Influence of the ionic strength on the structure of polyelectrolyte films at the solid/liquid interface. *Colloids Surface A* 163: 63–70.

Sugihara N, Tsuruta Y, Date Y, Furuno K, Kohashi K (1994). High peroxidative susceptibility of fish oil polyunsaturated fatty acid in cultured rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharm* 126: 124-128.

Surh J, Gu YS, Decker EA, McClements DJ (2005). Influence of environmental stresses on stability of OM emulsions containing cationic droplets stabilized by SDS–fish gelatin membranes. *J Agric Food Chem* 53(10): 4236–44.

Taga MS, Miller EE, Pratt DE (1984). Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *J Am Oil Chem Soc* 61(5): 928-931.

Taneja A, Singh H (2012). Challenges for the delivery of long-chain n-3 fatty acids in functional foods. *Annu Rev Food Sci Technol* 3: 105–123.

Taupin C (1983). Mècanisme de la stabilité des émulsions et micro-émulsions. En: Agents de surface et émulsions: les systèmes dispersés. Ed. Puisieux, F. y les

systemes dispersés. Ed. Puisieux, F. y Seillier, M., Lavoisier, Paris, Francia, pp. 303-320.

Tecante A (2010). Comunicación personal.

Timilsena YP, Adhikari R, Kasapis S, Adhikari B (2016). Molecular and functional characteristics of purified gum from Australian chia seeds. *Carbohydr Polym* 136: 128–136.

Ting IP, Brown JH, Naqvi J, Kumamoto J, Matsumura M (1990). Chia: a potential oil crop for arid zones. Proceedings of the First International Conference on New Industrial Crops and Products. Eds. HH Naqvi, A Estilai and IP Ting. Association for the Advancement of Industrial Crops, Riverside, USA, pp. 197-202.

Tironi VA (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).

Tonon RV, Grosso CRF, Hubinger MD (2011). Influence of emulsion composition and inlet air temperature on the microencapsulation of flaxseed oil by spray drying, *Food Res Int* 44(1): 282–289.

Trau D, Renneberg R (2003). Encapsulation of glucose oxidase microparticles within a nanoscale layer-by-layer film: immobilization and biosensor applications. *Biosens Bioelectron* 18(12): 1491–9.

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.

Urban, KG. Wagner D. Schaffner D. Roglin, Ulrich J. (2006). Rotor-stator and disc systems for emulsification processes. *Chem Eng Technol* 29(1): 24–31.

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. *Feet/Lipid* 100: 282-291

van Nieuwenhuyzen W, Tomás MC (2008). Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies. *Eur J Lipid Sci Technol* 110: 472-486.

Vázquez-Ovando A, Betancur-Ancona D, Chel-Guerrero L (2012). Physicochemical and functional properties of a protein-rich fraction produced by dry fractionation of chia seeds (*Salvia hispanica* L.). *CyTA-J Food* 11(1): 75-80.

Vázquez-Ovando A, Rosado-Rubio G, Chel-Guerrero L, Betancur-Ancona D (2009). Physicochemical properties of a fibrous fraction from chia (*Salvia hispanica* L.). *LWT – Food Sci Techn* 42: 168 – 173.

Vega C, Roos YH (2006). Invited review: spray-dried dairy and dairy-like-emulsions compositional considerations. *J Dairy Sci* 89(2): 383–401.

Velasco J, Dobarganes C, Márquez-Ruiz G (2003). Variables affecting lipid oxidation in dried microencapsulated oils. *Grasas y aceites* 54: 304-314.

Vladisavljevic GT, Williams RA (2005). Recent developments in manufacturing emulsions and particulate products using membranes. *Adv Colloid Interfac* 113(1): 1–20.

Wagner JR (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. In: Encyclopedia of Emulsion Technology: Basic Theory. Ed. Becher, P., Marcel Dekker Inc., New York, USA, pp. 57-127.

Walstra P (1996). Emulsion stability. En: Encyclopedia of Emulsion Technology, Vol. 4. Ed. Becher, P., Marcel Dekker Inc., New York, USA.

Walstra P (1999). Casein sub-micelles: do they exist? *Int Dairy J* 9: 189-192.

Walstra P, Smulder PEA. (1988). Emulsion formation. In Modern Aspects of Emulsion Science, B. P. Binks, ed. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 56-99.

Wang B, Adhikari B, Barrow CJ (2014). Optimisation of the microencapsulation of tuna oil in gelatin-sodium hexametaphosphate using complex coacervation. *Food Chem* 158: 358-365.

Wang Y, Li D, Wang LJ, 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.

Wang, YJ, Wang L (2000). Structures and properties of commercial maltodextrins from corn, potato, and rice starches. *Starch-Stärke* 52(8-9): 296-304.

Watson G (1938). Nahuatl word in American English. *Am Speech* 13: 108-121.

Wendel A (2000). Lecithin: the first 150 years Part I: From discovery to early commercialization. *Inform*, 11: 885-892.

Ye A, Singh H (2001). Interfacial composition and stability of sodium caseinate emulsions as influenced by calcium ions. *Food Hydrocolloid* 15: 195-207.

Young SL, Sarda X, Rosenberg M (1993). Microencapsulating properties of whey proteins. Combination of whey proteins with carbohydrates, *J Dairy Sci* 76(10): 2878-2885.

Zakarian JA, King CJ (1982). Volatiles loss in the nozzle zone during spray drying of emulsions. *Ind Eng Chem Proc Dd* 21(1): 107-113.

Zbicinski I, Delag A, Strumillo C, Adamiec J (2002). Advanced experimental analysis of drying kinetics in spray drying. *Chem EngJ* 86(1): 207-216.

Zuidam NJ, Shimonie. (2010). Overview of microencapsulates for Use in food products or processes and methods to make them. Bindorff CM, Zuidam NJ (Eds.). Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing. Springer New York, USA, pp. 3-29.

*“Solo hace falta mirar para atrás
para ver todo lo que has conseguido”*

